

**Untersuchung der potentiell  
entzündungsfördernden Eigenschaften der *unique*  
*region* im VP1-Protein des Parvovirus B19**



**Diplomarbeit im Fach Biologie**

**Durchgeführt am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der**

**Universität Regensburg**

**Betreuung: Prof. Dr. Susanne Modrow**

**Vorgelegt von Christian Eichinger**

**im August 2003**

# Inhaltsverzeichnis

## Inhaltsverzeichnis .....II

### A. Einleitung.....1

A.1. PARVOVIRUS B19 UND SEINE SYSTEMATISCHE EINORDNUNG.....	1
A.2. AUFBAU DES VIRUS UND STRUKTURELLE MERKMALE.....	2
A.2.1. Kapsidstruktur.....	2
A.2.2. Genomaufbau und Proteine.....	3
A.2.3. VP1-unique region.....	5
A.3. INFEKTIONSZYKLUS.....	6
A.4. KRANKHEITSBILDER.....	8
A.4.1. Allgemein.....	8
A.4.2. Parvovirus B19 und Autoimmunerkrankungen.....	8
A.5. IMMUNREAKTION.....	10
A.6. DIAGNOSE UND THERAPIE.....	11
A.7. POTENTIELLE ROLLE DER VP1-UNIQUE REGION BEI DER INDUKTION VON AUTOIMMUNERKRANKUNGEN.....	12
A.7.1. Mechanismen der Induktion von Autoimmunerkrankungen.....	12
A.7.2. Die VP1-unique region und ihre potentielle Rolle bei Inflammationen und Autoimmunerkrankungen.....	14
A.7.2.1. Arachidonsäure-abhängige Prozesse.....	14
A.7.2.2. Arachidonsäure-unabhängige Prozesse.....	15
A.8. ZIELSETZUNG.....	16

### B. Material und Methoden.....17

B.1. MATERIAL.....	17
B.1.1. Geräte und technische Hilfsmittel.....	17
B.1.2. Chemikalien und Biochemikalien.....	18
B.1.3. Puffer und Lösungen.....	20
B.1.4. Bakterien und Zellen.....	22
B.1.5. Proteine.....	22
B.1.5.1. Antikörper.....	22
B.1.5.2. Sonstige.....	22
B.1.6. Versuchstiere.....	23
B.1.7. Kits.....	23
B.1.8. Sonstige Hilfsmittel.....	23
B.2. METHODEN.....	24
B.2.1. Proteinchemische Methoden.....	24
B.2.1.1. Proteinexpression und Reinigung.....	24
B.2.1.2. Weitere proteinchemische Verfahren.....	25
B.2.1.2.1. SDS-PAGE.....	25
B.2.1.2.2. Silberfärbung der Proteine.....	25
B.2.1.2.3. Western Blot ( <i>recomBlot</i> ).....	26
B.2.1.2.4. Aufkonzentrieren der Proteinlösungen.....	27
B.2.1.2.5. Dialyse.....	27
B.2.1.2.6. Bestimmung der Proteinkonzentration.....	27
B.2.1.3. Phospholipase A <sub>2</sub> -Enzym-Test.....	28
B.2.2. Immunologische Methoden.....	29
B.2.2.1. Versuche mit Mäusen.....	29
B.2.2.1.1. Haltung der Mäuse.....	29
B.2.2.1.2. Inokulation der Mäuse.....	30
B.2.2.1.3. Retrobulbäre Blutabnahme.....	30
B.2.2.1.4. Milzpräparation.....	30
B.2.2.2. Etablierung und Durchführung von ELISAs.....	31
B.2.2.2.1. Detektion von Antikörpern gegen die immunisierten Antigene.....	31

B.2.2.2.2. ELISA zur Detektion von Anti-Phospholipid-Antikörpern .....	32
B.2.2.2.3. <i>Screen</i> zur Detektion weiterer Anti-Phospholipid-Antikörper .....	32
B.2.2.3. Cytokinmessung per Luminex ( <i>Bio-Plex Cytokine Assay</i> ) .....	32
B.2.3. <i>Molekularbiologische Methoden</i> .....	35
B.2.3.1. DNA-Isolierung .....	35
B.2.3.1.1. DNA-Isolierung aus Serum .....	35
B.2.3.1.2. DNA-Isolierung aus Synovialflüssigkeit .....	35
B.2.3.2. <i>Real-time</i> quantitative PCR (TaqMan) .....	35
B.2.4. <i>Zellbiologische Methoden</i> .....	37
B.2.4.1. Zellkulturtechniken .....	37
B.2.4.1.1. Zellkultur .....	37
B.2.4.1.2. Zelldifferenzierung und -synchronisierung .....	37
B.2.4.1.3. Zählen der Zellen in der Neubauer-Kammer .....	38
B.2.4.1.4. Einfrieren der Zellen .....	38
B.2.4.1.5. Auftauen der Zellen .....	39
B.2.4.2. Zellbindungsstudien .....	39
B.2.4.2.1. Proteinmarkierung .....	39
B.2.4.2.2. Bindungsversuche .....	40
B.2.4.3. Fluoreszenzmikroskopie .....	40
<b>C. Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>42</b>
C.1. ALLGEMEINE VORGEHENSWEISE .....	42
C.2. UNTERSUCHUNG DER ANTIGENEN EIGENSCHAFTEN DER VP1- <i>UNIQUE REGION</i> IN MÄUSEN .....	43
C.2.1. <i>Gewinnung und Charakterisierung der Proteinantigene</i> .....	43
C.2.2. <i>Charakterisierung der Immunreaktion nach Inokulation der Proteinantigene in Mäuse</i> .....	49
C.2.2.1. <i>Nachweis proteinspezifischer Antikörper</i> .....	51
C.2.2.2. <i>Nachweis von Anti-Phospholipid-Antikörpern</i> .....	55
C.2.2.3. <i>Nachweis von Cytokinen</i> .....	58
C.2.3. <i>Diskussion der Mausexperimente</i> .....	59
C.3. UNTERSUCHUNG DER ANTIGENEN EIGENSCHAFTEN VON PARVOVIRUS B19 IN RHEUMAPATIENTEN .....	65
C.3.1. <i>Charakterisierung des Infektionsstatus</i> .....	65
C.3.2. <i>Nachweis von Cytokinen</i> .....	68
C.3.3. <i>Diskussion der Experimente</i> .....	69
C.4. PARVOVIRUS B19 IN INFLAMMATION UND AUTOIMMUNERKRANKUNGEN .....	71
C.5. BINDUNG DER VP1- <i>UNIQUE REGION</i> AN ZELLOBERFLÄCHEN .....	73
C.5.1. <i>Gewinnung markierter Proteine</i> .....	74
C.5.2. <i>Bindung der VP1-unique region an synchronisierte Zellen</i> .....	75
C.5.3. <i>Bindung der verschiedenen Abschnitte der VP1-unique region an Zelloberflächen</i> .....	76
C.5.4. <i>Diskussion der Ergebnisse</i> .....	79
<b>D. Zusammenfassung .....</b>	<b>81</b>
<b>E. Verzeichnisse .....</b>	<b>83</b>
E.1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	83
E.2. LITERATURVERZEICHNIS .....	86
<b>F. Selbständigkeitserklärung .....</b>	<b>103</b>
<b>G. Danksagung .....</b>	<b>104</b>

## **A. Einleitung**

### **A.1. Parvovirus B19 und seine systematische Einordnung**

Das Parvovirus B19 ist seinem Namen entsprechend (*lat. parvus* - klein) das kleinste bisher bekannte humanpathogene Virus. Entdeckt wurde es per Zufall bei einer routinemäßigen Untersuchung von Blutkonserven auf das Vorhandensein von Hepatitis B-Viren. Der Name beruht neben der geringen Größe des Virus auf der Tatsache, dass der Erreger bei den Untersuchungen an der 19. Stelle auf Platte B entdeckt wurde (Cossart YE *et al.*, 1975). Elektronenmikroskopische Untersuchungen deuteten auf eine Ähnlichkeit mit tierischen Parvoviren hin. Weiter stellte sich bei der DNA-Extraktion heraus, dass die Genome als DNA-Einzelstränge von etwa 5,5 kb beider Orientierungen separat in den Viruspartikeln verpackt sind (Summers J *et al.*, 1983). Da das aus den Strukturproteinen VP1 und VP2 aufgebaute Kapsid nicht von einer Membran umhüllt ist, erweist sich das Virus als äußerst resistent gegenüber Hitze und Detergenzien (Schwarz TF *et al.*, 1992).

Einige Jahre später wurde bekannt, dass das Parvovirus B19 mit aplastischen Krisen in Patienten mit Sichelzellanämie in Verbindung steht und ursächlich für die meist mild verlaufende Kinderkrankheit der Ringelröteln (*Erythema infectiosum*) ist (Pattison JR *et al.*, 1981; Serjeant GR *et al.*, 1981; Anderson MJ *et al.*, 1983 und 1984). Parvovirus B19-Infektionen - die Durchseuchungsrate liegt in den Industrieländern bei etwa 40-60% im jungen Erwachsenenalter – verlaufen meist asymptomatisch oder zeigen nur milde Erkrankungsanzeichen. Jedoch werden mittlerweile eine ganze Reihe, teilweise sehr schwerer Krankheitsbilder mit akuten und chronischen Infektionen assoziiert (Kerr J *et al.*, 1996).

Die Familie der *Parvoviridae* unterteilt sich in zwei Unterfamilien, die *Parvovirinae*, welche Vertebraten infizieren und die *Densovirinae*, die Invertebraten als ihren Wirt haben (s. Tabelle 1). Der hinsichtlich seiner Molekularbiologie am besten untersuchte Vertreter des Genus Parvovirus ist das *minute virus of mice*, welches 50%-ige Sequenzhomologie zu Parvovirus B19 zeigt. Viele Fragestellungen zur Replikation und Transkription von Parvoviren wurden an ihm aufgeklärt. Auch die tierpathogenen Vertreter in Hund, Katze und Schwein gehören dieser Gattung an.

Unterfamilie	Genus	Mensch	Tier
Parvovirinae	<i>Parvovirus</i>		felines Panleukopenievirus Nerzenteritisvirus canines Parvovirus Virus der Aleutenkrankheit der Nerze porcines Parvovirus minute virus of mice Gänseparvovirus
	<i>Erythrovirus</i>	Parvovirus B19	Parvovirus der Javaneraffen Parvovirus der Rhesusaffen (Simian) Parvovirus der Schweinsaffen Parvovirus der Streifenhörnchen (Manchurian chipmunks)
	<i>Dependovirus</i>	Adenoassoziierte Viren (AAV-2, -3, -5)	bovines AAV AAV-1, AAV-4 (Affen)
Densovirinae	<i>Densovirus</i>		Culex-pipiens-Densovirus
	<i>Iteravirus</i>		Bombyx-mori-Densovirus
	<i>Contravirus</i>		Aedes aegypti-Densovirus

**Tabelle 1: Einteilung der *Parvoviridae*.** (nach Modrow S, Falke D, Truyen U. Molekulare Virologie, 2003)

Zur Einleitung eines produktiven Infektionszyklus, sind die Dependoviren, wie ihr Name vermuten lässt, von Helferviren wie Adeno-, Vaccinia- oder Herpesviren abhängig (Buller RM *et al.*, 1981). Sie können sich nur bei gleichzeitiger Infektion einer Zielzelle mit einem weiteren Virus vermehren und sind auch für den Menschen infektiös.

Das humanpathogene Parvovirus B19 wird auf Grund seines engen Zelltropismus für sich teilende erythroide Vorläuferzellen den Erythroviren zugeordnet. Später wurde diese Gattung um die tierpathogenen Parvoviren der Rhesusaffen und Streifenhörnchen erweitert (O'Sullivan MG *et al.*, 1994; Yoo BC *et al.*, 1999).

## **A.2. Aufbau des Virus und strukturelle Merkmale**

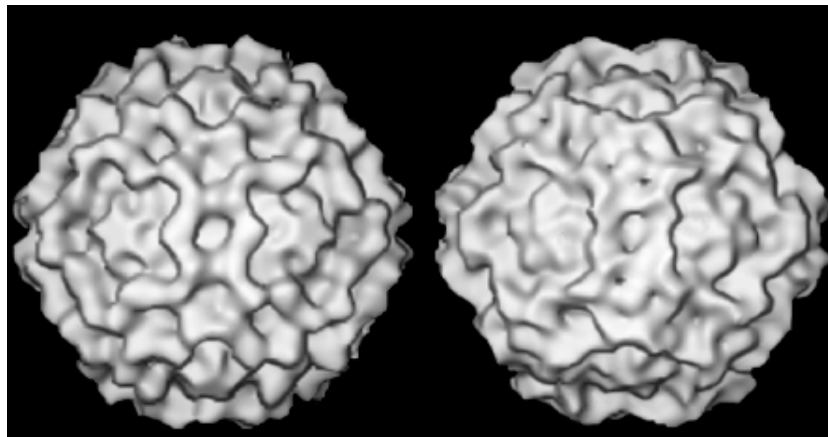
### **A.2.1. Kapsidstruktur**

Charakteristisch für die Familie der Parvoviren ist ihre erstaunliche Stabilität gegenüber Detergenzien und äußeren physikalischen Einflüssen wie hohen Temperaturen. Ein Grund dafür ist, dass die Viruspartikel nicht von einer Membran umhüllt sind.

Das Parvovirus B19 besitzt die Strukturproteine VP1 (83 kDa) und VP2 (58 kDa), wobei VP2 sequenzidentisch mit dem carboxyterminalen Teil von VP1 ist und von diesem um einen Abschnitt von 227 zusätzlichen Aminosäuren am aminoterminalen Ende überragt wird. Dieser

dem Strukturprotein VP1 „einzigartige“ Teil mit einem Molekulargewicht von 25 kDa wird als VP1-*unique region* (VP1n) bezeichnet.

Die aus 60 Untereinheiten ikosaedrisch aufgebauten Kapside sind mit ihrem Durchmesser von 18-26 nm elektronenmikroskopisch darstellbar (s. Abb. 1) und bestehen zu 95% aus VP2-Protein, während VP1-Protein einen Anteil von nur 5 % ausmacht. Ihr Molekulargewicht liegt bei  $4,2 \cdot 10^6$  Da ohne bzw.  $5,5 - 6,2 \cdot 10^6$  Da mit eingelagerter DNA. Es konnte gezeigt werden, dass Kapside aus ausschließlich rekombinanten VP2-Proteinen gentechnologisch produziert werden können (Brown CS *et al.*, 1991). Dies spricht dafür, dass in der Sequenz des VP2-Proteins alle für die Bildung von Viruspartikeln benötigten Bereiche enthalten sind. Der in den in Abb. 1 gezeigten Partikeln nicht enthaltene, VP1-spezifische Teil ragt vermutlich aus den kugelförmigen Kapsiden heraus (Rosenfeld SJ *et al.*, 1992).

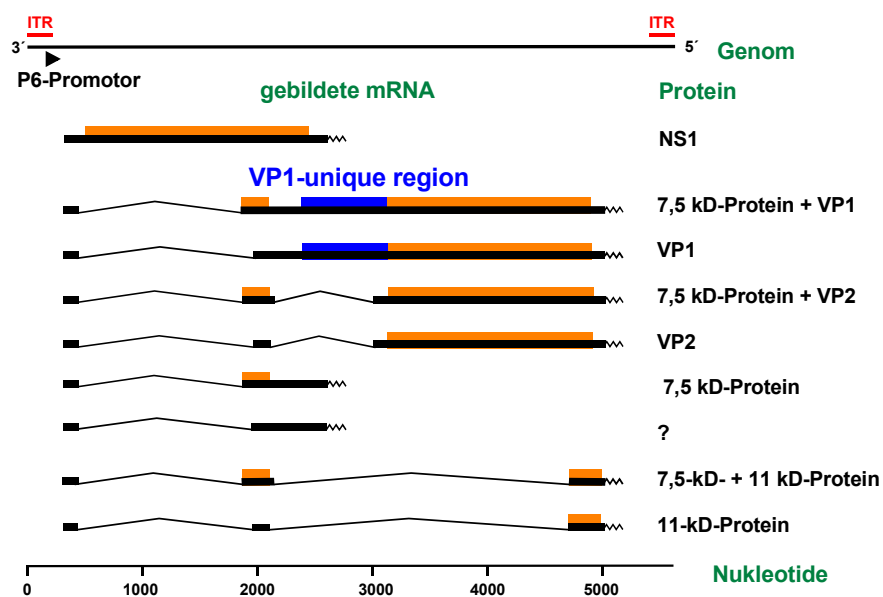


**Abbildung 1: VP2-Kapside des Parvovirus B19.** Gezeigt sind nach kryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen erstellte Modelle von VP2-Kapsiden, rechts im Komplex mit dem als zellulärer Rezeptor beschriebenen P-Antigen (Chipman PR *et al.*, 1996).

### **A.2.2. Genomaufbau und Proteine**

Parvoviren besitzen ein für die Familie typisches einzelsträngiges, lineares DNA-Genom, das bei Parvovirus B19 eine Länge von 5594 Basen aufweist und im Kapsidinneren mit VP2-Strukturproteinen komplexiert ist. An den 5'- und 3'-Enden befinden sich als *inverted terminal repeats* (ITR) bezeichnete, 383 Basen lange, palindromische Abschnitte. Diese erlauben eine Faltung zu doppelsträngigen Haarnadelstrukturen, welche eine Initiation der DNA-Replikation ohne die normalerweise dafür nötigen RNA-Primer ermöglichen (Shade *et al.*, 1986; Deiss *et al.*, 1990). Insgesamt werden ausgehend von einem einzigen Promotor, dem p6-Promotor, neun verschiedene RNA-Transkripte gebildet, die für fünf verschiedene

Proteine kodieren (Ozawa K *et al.*, 1987a). Neben den bereits beschriebenen Strukturproteinen VP1 und VP2 werden fünf Nichtstrukturproteine exprimiert: NS1-Protein, 7,5-kD-Protein und eine Familie dreier 11-kD-Proteine (s. Abb. 2). Das NS1-Protein kann mit seiner speziellen Lokalisierungssequenz in den Zellkern eindringen und spielt dort zusammen mit anderen, zellulären Faktoren als Transaktivator eine entscheidende Rolle bei der Transkription des viralen Genoms (Doerig C *et al.*, 1990; Gareus R *et al.*, 1998; Raab U *et al.*, 2001). Auch zelluläre Gene wie IL-6 und TNF- $\alpha$  sowie Promotoren anderer Viren wie HIV können durch NS1-Proteine induziert werden (Moffatt S *et al.*, 1996; Sol N *et al.*, 1999; Fu Y *et al.*, 2002; Sol N *et al.*, 1993). Weiter besitzt das NS1-Protein eine ATPase- und Helicaseaktivität und ist zudem am Zellzyklusstopp sowie bei der Einleitung apoptotischer Prozesse beteiligt. Letztere führen schließlich zum Tod der Wirtszelle sowie zur Freisetzung von Viruspartikeln und vermutlich auch von NS1-Proteinen (Raab U *et al.*, 2002; Moffat S *et al.*, 1998; Yaegashi N *et al.*, 1999).



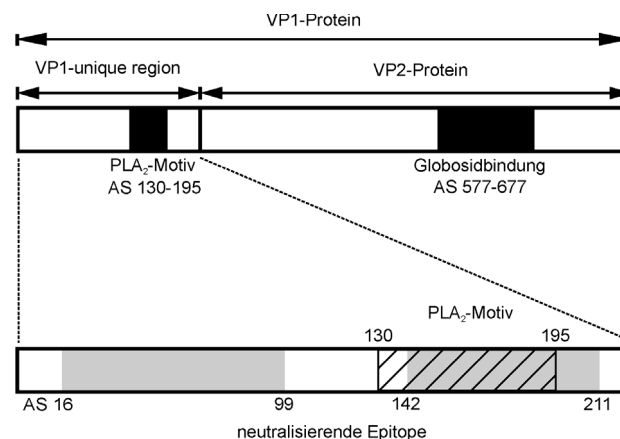
**Abbildung 2: Transkriptionskarte von Parvovirus B19.** Gezeigt ist das B19-Genom mit den ITR-Sequenzen und dem p6-Promotor. Exons sind durch dicke Balken, herausgespleißte Introns durch dünne Linien dargestellt. Offene Leserahmen und somit potentiell gebildete Proteine sind farblich dargestellt. Gezackte Linien weisen auf 3'-Polyadenylierungsregionen hin (Modrow S *et al.*, 2003).

Über die Funktion des 7,5-kD-Protein und der drei 11-kD-Proteine ist bisher noch sehr wenig bekannt. Letztere werden durch Verwendung alternativer Startcodons gebildet und weisen drei prolinreiche Abschnitte auf, die es ihnen eventuell ermöglichen, an SH3-Domänenproteine anzudocken. Eine Wechselwirkung mit dem *growth factor receptor-binding protein 2* (Grb2), das dem Signaltransduktionsweg der Rezeptor-Tyrosinkinasen

angehört, lässt vermuten, dass die 11-kD-Proteine in die zellulären Prozesse infizierter Zellen eingreifen (Fan *et al.*, 2001). Die Bildung dieser kleinen Nichtstrukturproteine konnte in infizierten peripheren Monozyten (7,5 kD) und leukämischen Knochenmarkszellen (11 kD) nachgewiesen werden (Luo W und Astell CR, 1993; St.-Amand J und Astell CR, 1993).

### A.2.3. VP1-unique region

Wie bereits angedeutet besitzen wenige der 60 Kapsidproteine eine N-terminale Verlängerung, die sogenannte VP1-*unique region* (s. Abb. 3). Im Falle des *minute virus of mice* ist diese für die Infektiosität der Viren nicht erforderlich, allerdings spielt sie eine kritische Rolle zu Beginn des Infektionszyklus (Tullis GE *et al.*, 1993; Zadori *et al.*, 2001). Die VP1-*unique region* liegt oberflächenexponiert vor und ist Angriffspunkt für neutralisierende Immunreaktionen. Dabei gilt der N-terminale Abschnitt als immundominant, allerdings weist auch die C-terminale Hälfte Epitope auf, gegen die neutralisierende Antikörper gerichtet sind (Musiani M *et al.*, 2000).



**Abbildung 3: Das VP1-Protein mit seiner *unique region* und den darin enthaltenen funktionellen Domänen.** Dargestellt ist das VP1-Protein mit seinem mit VP2 identischen Teil und der *unique region*. Im VP2-Anteil befindet sich die Bindestelle für den Rezeptor Globosid (schwarz). In der VP1-*unique region* befinden sich mehrere Epitope, welche die Bildung neutralisierender Antikörper induzieren (grau), sowie das Phospholipase A<sub>2</sub>-Motiv (gestreift).

Kürzlich konnte eine Phospholipase A<sub>2</sub>-ähnliche Aktivität, die auf Grund von Sequenzhomologien mit dem aktiven Zentrum eukaryotischer Phospholipasen A<sub>2</sub> bereits vermutet wurde, für die VP1-*unique region* nachgewiesen werden (Li Y *et al.*, 2001; Zadori Z *et al.*, 2001; Dorsch S *et al.*, 2002).

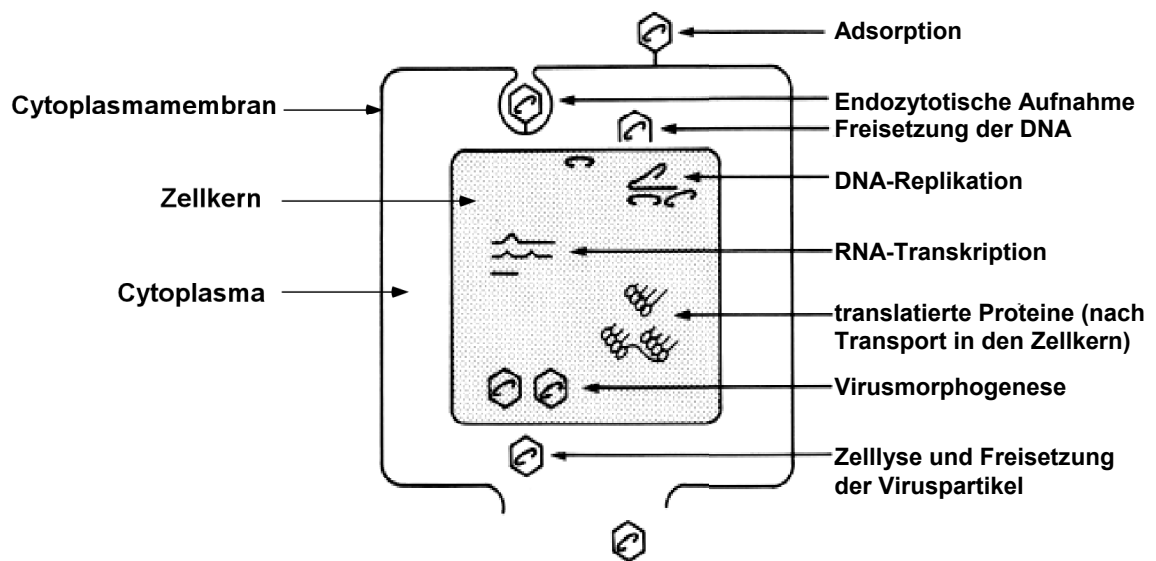
Ferner legt die exponierte Lage eine entscheidende Rolle der VP1-*unique region* bei der Anheftung an Zielzellen nahe. So wird vermutet, dass dieser Abschnitt die Bindungsregion

für einen Co-Rezeptor enthält. Zwar ist bekannt, dass eine Region im VP2-Teil an das als primärer Rezeptor dienende P-Antigen, auch Globosid genannt, andockt und dieses somit Voraussetzung für eine Infektion ist (Brown KE *et al.*, 1993 und 1994). Der enge Zelltropismus des Parvovirus B19 kann damit jedoch nicht zufriedenstellend erklärt werden, da bestimmte Zellpopulationen wie Megakaryozyten, Endothelzellen und fötale Myozyten das Blutgruppenantigen P auf ihrer Oberfläche präsentieren, gleichzeitig aber für die Virusinfektion nicht permissiv sind (Rouger P *et al.*, 1987). Zudem korreliert die Menge an präsentierten P-Antigenen nicht mit der viralen Bindungseffizienz an die Zielzellen (Weigel-Kelley KA *et al.*, 2001).

### **A.3. Infektionszyklus**

Das Parvovirus B19 wird in erster Linie durch Tröpfcheninfektion übertragen und gelangt dabei zunächst auf die Schleimhäute des Mund- und Rachenbereiches. Auch die Ansteckung über kontaminierte Blutproben sowie die Übertragung des Virus über die Plazenta von der Mutter auf den Fötus ist möglich. Für das Andocken an seine Zielzellen ist das Blutgruppen-Antigen P, ein Glycosphingolipid, erforderlich, welches sich auf der Oberfläche vieler Zelltypen befindet. Auf Grund des engen Wirtsspektrums des Parvovirus B19 sowie seiner ausschließlichen Infektion sich teilender Zellen der Stadien BFU-E (erythrocyte burst forming unit) bis CFU-E (erythrocyte colony forming unit) wird die Existenz eines Co-Rezeptors postuliert (Ozawa K *et al.*, 1986). Neuen Ergebnissen zu Folge vermittelt  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin als zellulärer Co-Rezeptor den Eintritt von Parvovirus B19 in erythroide Vorläuferzellen (Weigel-Kelley KA *et al.*, 2003).

Auch die anschließende Aufnahme des Virus in die Zielzelle ist weitgehend unklar, vermutet wird ein endozytotischer Prozess, der im Fall des caninen Parvovirus nach Bindung an einen Transferrin-Rezeptor über einen Dynamin-abhängigen, Clathrin-vermittelten Prozess abläuft (Parker SJ *et al.*, 2000 und 2001). Beim Parvovirus B19 könnte dies theoretisch durch Bindung an einen Phospholipase A<sub>2</sub>-Rezeptor geschehen. Über den Transport des B19-Genoms in den Zellkern ist bisher sehr wenig bekannt. Eine Beteiligung der viralen Phospholipase A<sub>2</sub> am Transfer des viralen Genoms vom späten Endosom/Lysosom in den Kern sowie bei der Initiation der Replikation wurde jedoch sowohl für das Parvovirus B19 als auch für das Adeno-assoziierte Virus Typ 2 gezeigt (Zadori Z *et al.*, 2001; Girod A *et al.*, 2002).



**Abbildung 4: Möglicher Infektionszyklus des Parvovirus B19 in erythroiden Vorläuferzellen.** Ähnlich anderen Viren ohne Hülle, könnte das Parvovirus B19 nach Bindung an einen zellulären Rezeptor endozytisch aufgenommen und sein Genom in den Wirtszellkern gebracht werden. Nach DNA-Replikation und RNA-Transkription im Kern werden die Proteine im Cytoplasma synthetisiert und anschließend in den Kern transportiert. Dort könnten sich die Kapsidproteine an die virale DNA anlagern und reife Viruspartikel bilden, bevor sie schließlich durch Zellyse freigesetzt werden (veränderte Darstellung nach Heegaard ED und Brown KE, 2002).

Die anschließende Replikation des viralen Genoms im Zellkern der Wirtszellen schließt sowohl virale als auch zelluläre Faktoren mit ein. Durch Ausbildung von Haarnadelschleifen, die ihre Ursache in palindromischen Sequenzen am 3'- und 5'-Ende haben, umgeht das Virus die Abhängigkeit von RNA-Primern. Die Synthese sämtlicher Transkripte wird vom p6-Promotor kontrolliert und mit Ausnahme der NS1-RNA durch alternatives Spleißen verändert (s. Abb. 2). Der Bildung des NS1-Transaktivatorproteins folgt die Herstellung der Strukturproteine VP1 und VP2. Die Bildung der Kapside könnte grundsätzlich auf zwei unterschiedliche Weisen entstehen: Einerseits besteht die Möglichkeit, dass sich die Strukturproteine im Komplex mit der viralen DNA zu fertigen Kapsiden zusammenlagern, andererseits könnte das virale Genom erst später in die ausgebildeten Kapside eingelagert werden. Die Freisetzung der infektiösen Viruspartikel kann nach Apoptose, die durch das NS1-Protein verursacht wird, aus der Wirtszellen entlassen oder aber über einen Exocytose-ähnlichen Mechanismus erfolgen.

## **A.4. Krankheitsbilder**

### **A.4.1. Allgemein**

Die klassische, durch das Parvovirus B19 verursachte Krankheit ist die Kinderkrankheit *Erythema infectiosum* oder *fifth disease*, besser bekannt als Ringelröteln. Sie verläuft meist harmlos und äußert sich durch grippeähnliche Symptome, denen sieben bis zehn Tagen nach der Virusinfektion schmetterlingsförmige Exantheme im Gesicht folgen, welche sich auf den ganzen Körper ausbreiten und wenige Tage später spontan wieder abklingen.

Die im Zuge des Infektionszyklus verursachte Zerstörung erythroider Vorläuferzellen kann zu Anämien und transienten aplastischen Krisen führen, welche besonders bei Patienten mit Grunderkrankungen, die wie bei Sichelzellanämie, Thalassämie, chronischer hämolytischer Anämie oder bei Eisenmangelanämie mit einer Störung der Erythrocytenbildung einhergehen, teils lebensbedrohlich werden können (Anderson MJ *et al.*, 1985; Brown KE und Young NS, 1995; Brownell AI *et al.*, 1986; Lefrere JJ, 1986).

Da das Virus in der Lage ist, die Plazenta zu passieren, kann die Infektion schwangerer Frauen schwere Komplikationen beim Fötus hervorrufen. Die durch schwere Anämien verursachten Wassereinlagerungen in das fötale Gewebe können zu *Hydrops fetalis* und schließlich zu Schwangerschaftsabbrüchen führen (Brown KE, 2000).

Während in wenigen Fällen Hepatitiden, Encephalitiden und Myokarditiden sowie häufig auch Arthralgien und Arthritiden in Gelenken als Symptome mild verlaufender Parvovirus-Infektionen beschrieben werden, verursachen chronische B19-Infektionen oft Symptome, die der Rheumatischen Arthritis (RA) bzw. der Juvenilen idioplastischen Arthritis (JIA) sehr ähnlich sind (Brown KE *et al.*, 1994; Karenyi YV *et al.*, 1999; Reid DM *et al.*, 1985). Dabei gibt es Hinweise, dass das Virus RA induziert und aufrecht erhält, ein endgültiger Beweis für diese Hypothese steht jedoch noch aus (Takahashi *et al.*, 1998; Moore TL, 2000).

Neben RA wird das Parvovirus B19 mit weiteren komplexen Krankheitsbildern wie Systemischem Lupus erythematoses (SLE), adult-onset Still's disease, Polyarthritiden oder chronischer autoimmuner Thrombopenie/Neutropenie assoziiert (Foto F *et al.*, 1993; Yttberg SR, 1999; Hemauer A *et al.*, 1999; Scheurlen W *et al.*, 2001).

### **A.4.2. Parvovirus B19 und Autoimmunerkrankungen**

Wie oben erwähnt wird das Parvovirus B19 mit mehreren Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht. So werden Arthralgien und Arthritiden, die u.a. dem Bild der rheumatischen Arthritis ähneln, mit dem Erreger assoziiert (Naides SJ *et al.*, 1990; Lehmann

HW *et al.*, 2002). Weiter spielt das Virus bei der Aufrechterhaltung und vermutlich auch bei der Induktion von SLE eine entscheidende Rolle (Moore TL *et al.*, 1999; Tovari E *et al.*, 2002; Hemauer A *et al.*, 1999). Auch Vasculitis in Gefäßen sowie die Krankheiten der autoimmunen Neutropenie und Thrombocytopenie stehen in Assoziation mit Parvovirus B19 (Magro CM *et al.*, 2002). Erst kürzlich fand man einen sehr deutlichen Zusammenhang zwischen Parvovirus B19 und der Anwesenheit von Antikörpern gegen  $\beta$ 2-Glykoprotein 1 ( $\beta$ 2-GP1), Cardiolipin und/oder Phosphatidylserin, welche alle für das Anti-Phospholipid-Syndrom (Hughes' Syndrome, APS) charakteristisch sind: 87,5% Anti-Phospholipid-IgG-positiver Kinder hatten bereits Kontakt mit Parvovirus B19, die Mehrheit wies chronische Infektionen auf (Lehmann HW *et al.*, 2003; von Landenberg P *et al.*, 2003). Die Symptomatik des Anti-Phospholipid-Syndroms, untersucht an einer Gruppe von 1000 APS-Patienten, zeigt eine erstaunliche Ähnlichkeit zum Krankheitsbild chronisch infizierter B19-Patienten (Levine SJ *et al.*, 2002; Cervera R *et al.*, 2002): Meist treten arterielle und venöse Gefäßveränderungen auf, die in der Plazenta vorkommend häufig zu Schwangerschaftsabbrüchen führen und das Risiko für Thrombosen und Schlaganfall durch Bildung von Blutgerinnseln deutlich erhöhen. Ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Symptomatik und den Konzentrationen an Anti-Phospholipid-Antikörpern ist dabei bekannt. Allgemein zeigt sich ein weites Spektrum an Symptomen, das Entzündungserkrankungen, rheumatische Erkrankungen und andere Autoimmunreaktionen miteinschließt. Während bei 53% der Patienten primäres Anti-Phospholipid-Syndrom festgestellt wurde, trat die Erkrankung in etwa 41% der Fälle als Folge von SLE auf, in 6% der Fälle lagen andere Ursachen zu Grunde.

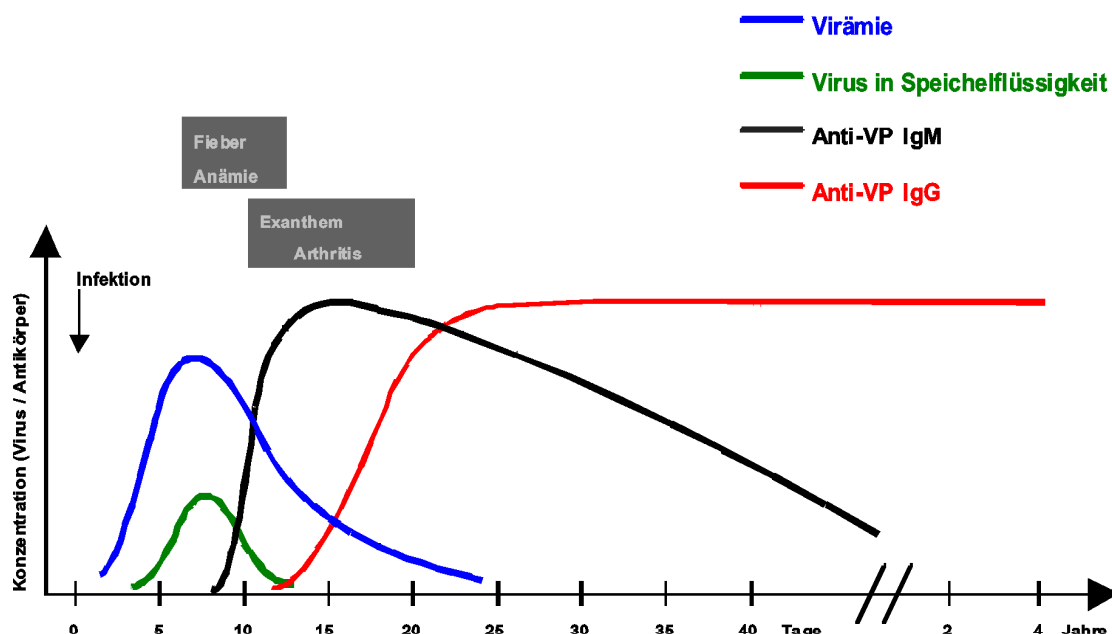
Eine entscheidende Rolle bei der Induktion typischer Autoantikörper des Anti-Phospholipid-Syndroms kommt dem 50 kDa großen  $\beta$ 2-Glykoprotein 1, auch Apolipoprotein H genannt, zu, das als Co-Faktor eine optimale Bindung der Anti-Phospholipid-Antikörper an ihr Antigen vermittelt (Gharavi AE *et al.*, 1992; Blank M *et al.*, 1994; Shoenfeld Y *et al.*, 1998). Mit seiner fünften Domäne bindet  $\beta$ 2-GP1 an negativ geladene Substanzen, u.a. an die anionischen Phospholipide Cardiolipin, Lupus-Antikoagulanzen, Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol und Phosphatidsäure.

Anti- $\beta$ 2-GP1-Antikörper sowie Manifestationen des Anti-Phospholipid-Syndroms können von einer Reihe verschiedener Viren und Bakterien auf Grund ihrer zu  $\beta$ 2-GP1 homologen Strukturen durch Kreuzreaktion induziert werden, darunter *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, das Tetanus-Toxoid sowie das Cytomegalovirus (Blank M *et al.*, 2002). Die Vermutung, dass auch das Parvovirus B19 direkt an der Induktion dieser

Autoimmunerkrankung beteiligt ist, rührt neben den erhöhten Vorkommen des Virus in APS-Patienten sowie der ähnlichen Symptomatik auch daher, dass die Anti-Phospholipid-Antikörper jeweils sehr ähnliche,  $\beta$ 2-GP1-abhängige Bindungsspezifitäten zeigen (Loizou S *et al.*, 1997; Reitblat T *et al.*, 2000). Der molekulare Mechanismus ihrer Entstehung ist im Falle von Parvovirus B19 jedoch noch nicht bekannt und soll im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht werden.

## A.5. Immunreaktion

Der Virustiter erreicht etwa 6 Tage nach der Inokulation eines Individuums mit dem Erreger sein Maximum. Ihm wird zunächst durch die einsetzende Bildung von IgM-, dann durch vermehrte Bildung von spezifischen IgG-Antikörpern entgegengewirkt (s. Abb. 5). Während IgM-Antikörper nur 1-3 Monate nachweisbar sind, können B19-spezifische IgG-Antikörper meist lebenslang im Blut detektiert werden und bieten dementsprechend Schutz vor einer Reinfektion. Die Konzentration an Anti-VP2-Antikörpern im Blut sinkt im Laufe der Jahre nach der Infektion langsam. Neutralisierende Antikörper sind anfangs in erster Linie gegen das VP2-Protein mit seiner Globosidbindedomäne gerichtet. Die langanhaltenden neutralisierenden Antikörper richten sich jedoch gegen die exponierte VP1-*unique region* (Rosenfeld SJ *et al.*, 1992).



**Abbildung 5: Typischer Verlauf einer Parvovirus B19-Infektion.** Die Bildung von IgM-Antikörpern gegen das Virus setzt wenige Tage nach der maximalen Virämie ein. Die etwas später gebildeten IgG-Antikörper sind lebenslang im Blut nachweisbar.

In etwa 20% der Fälle kann das Virus nicht vollständig aus dem Körper eliminiert werden. Die DNA der persistierenden Viren kann noch mehrere Jahre nach der Erstinfektion u.a. in Synovialgewebe, Knochenmark und Leber detektiert werden (Cassinotti P *et al.*, 1997, 1998; Eis-Hübinger *et al.*, 2001). Persistierende Infektionen kommen zwar häufig in immunsupprimierten wie beispielsweise AIDS- oder Transplantationspatienten vor, es sind aber auch viele Fälle chronischer B19-Erkrankungen in immunkompetente Patienten bekannt (Flunker G *et al.*, 1998; Vernazza PL *et al.*, 1996; Faden H *et al.*, 1992; Cassinotti P *et al.*, 2000). Die Anwesenheit von IgG-Antikörpern gegen das NS1-Protein deutet auf chronische und schwerer verlaufende B19-Infektionen hin (Hemauer A *et al.*, 2000).

## **A.6. Diagnose und Therapie**

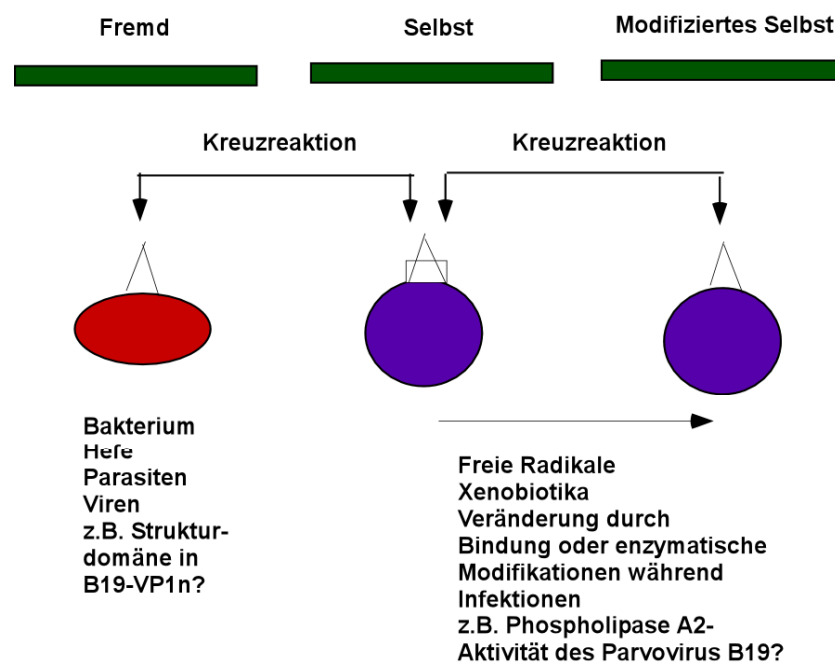
Grundsätzlich lässt sich eine Parvovirus B19-Infektion nach zwei Prinzipien nachweisen. Zum einen kann direkt B19-DNA im Blut und in Gelenkflüssigkeiten nachgewiesen werden, wobei die Methode der *nested*-PCR oder der quantitativen *real-time* PCR (Taqman) Verwendung findet. Zum anderen werden B19-spezifische Antikörper mittels ELISA und Western Blot nachgewiesen. Zusammen lassen diese Tests die Diagnose einer akuten, chronischen und abgelaufenen B19-Infektion zu.

Bei Parvovirus B19-infizierten schwangeren Frauen wird der Fötus bei niedrigen Hämoglobinwerten mit intrauterinen Bluttransfusionen behandelt, um die Entstehung von *Hydrops fetalis* zu verhindern. Bei immunsupprimierten Patienten, die auf Grund persistierender B19-Infektion schwere Anämien und Erythroplastopenien zeigen, kommen Immunglobuline zum Einsatz.

## A.7. Potentielle Rolle der VP1-unique region bei der Induktion von Autoimmunerkrankungen

### A.7.1. Mechanismen der Induktion von Autoimmunerkrankungen

Eine Möglichkeit der spezifischen Induktion von Autoantikörpern ist das Phänomen der molekularen Mimikry oder Kreuzreaktion (s. Abb. 6). Auf Grund der Tatsache, dass der jeweilige Erreger strukturelle Ähnlichkeiten zu körpereigenen Stoffen zeigt, erkennen die gegen den Fremdstoff gerichteten Antikörper auch die entsprechende körpereigene Verbindung als fremd. Auch kann die Entstehung dieser „fehlgerichteten“ Antikörper daher rühren, dass körpereigene Stoffe durch den jeweiligen Erreger oder bestimmte Substanzen verändert werden und somit der Toleranz des Immunsystems entgehen. Beispielsweise ist bekannt, dass ein Phospholipid-bindendes Peptid des Cytomegalovirus sowie synthetische virale und bakterielle Peptide das Anti-Phospholipid-Syndrom durch Molekulare Mimikry induzieren können (Gharavi AE *et al.*, 2002; Gharavi EE *et al.*, 1999). Gleiches gilt für die Induktion autoreaktiver T-Zellklone durch das Herpes-Simplex-Virus-1 (Zhao *et al.*, 1998).



**Abbildung 6: Allgemeines Prinzip der molekularen Mimikry.** Das Parvovirus B19 könnte durch Nachahmung oder enzymatischer Veränderung körpereigener Strukturen Kreuzreaktionen und damit Autoimmunerkrankungen hervorrufen (veränderte Darstellung nach Karlsen AE und Dyrberg T, 1998). Dargestellt ist ein Erreger (rot), der Oberflächenstrukturen aufweist, die denen auf körpereigenen Zellen (blau) sehr ähnlich sind und folglich Kreuzreaktionen auslösen können. Der Charakter der jeweils präsentierten Oberflächenstrukturen ist durch die grünen Balken angegeben.

Im Falle von Autoimmunerkrankungen wie SLE oder APS ist folgendes Paradoxon zu berücksichtigen: Einerseits wird eine ganze Reihe verschiedener Autoantikörper möglicherweise durch polyklonale Aktivierung von T- und B-Lymphozyten induziert, andererseits lässt sich durch Antigen-vermittelte Immunantworten eine Spezifität für einzelne Epitope feststellen. Dieses Phänomen kann teils dadurch erklärt werden, dass autoreaktive T-Zellen zunächst nur ein Epitop, dann aber durch Degeneration mehrere, vorher kryptische Determinanten erkennen. Ebenso könnte ein spezifisches Antigen in Folge von Degenerationsprozessen verschiedene T-Zellen stimulieren. Ferner wird postuliert, dass manche T-Zellen nur gegen ein Antigen gerichtet sind, jedoch in der Lage sind, verschiedene B-Zelltypen zu aktivieren (Singh RR *et al.*, 1998).

Im Falle des Epstein-Barr-Virus aktiviert dessen Infektion von B-Gedächtniszellen die Proliferation dieser Zellen und führt vorübergehend zur Produktion verschiedenster Antikörper, darunter auch Autoantikörper. Dies spricht dafür, dass auch gesunde Menschen potentiell autoreaktive Immunzellen besitzen, die bei entsprechender Aktivierung zu Erkrankungen führen können.

Auch die Wirkung von Superantigenen wird bei der Aktivierung spezieller Lymphozytengruppen diskutiert. Zudem kann die Aktivierung und Freisetzung von Cytokinen und Chemokinen die Immunantwort in eine bestimmte Richtung lenken ( $T_h1/T_h2$ -Immunantwort), in die Regulation der Präsentation von MHC-Klasse I und II-Molekülen eingreifen oder Co-Stimulatoren hochregulieren, was jeweils zur Stimulierung autoreaktiver T-Zellklone führen kann (Gianani R *et al.*, 1996).

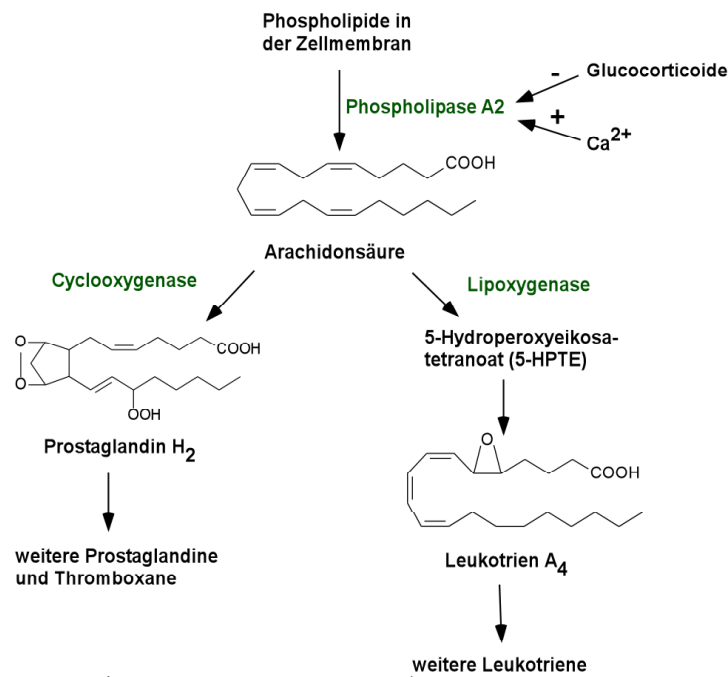
Im Falle des Parvovirus B19 führt die transaktivierende Wirkung des NS1-Proteins auf zelluläre Promotoren zu erhöhten Werten an  $TNF-\alpha$  und IL-6. Diese Cytokine kommen v.a. bei chronisch infizierten B19-Patienten vor und könnten ursächlich für Autoimmunreaktionen sowie lang anhaltende klinische Symptome sein (Mitchell LA, 2002). Über die mit der B19-Infektion assoziierte Cytokinexpression ist ansonsten relativ wenig bekannt. Erhöhte Werte an  $IFN-\gamma$ ,  $TNF-\alpha$ , IL-6 und IL-8 in drei B19-infizierten Kindern deuten auf primär inflammatorische Reaktionen hin (Nigro G *et al.*, 2000). Bei chronischen Infektionen konnten erhöhte Werte an IL-6, IL-8,  $IFN-\gamma$  und  $TNF-\alpha$ , bei akuten auch IL-1 $\beta$  detektiert werden (Kerr JR *et al.*, 2001).

### **A.7.2. Die VP1-unique region und ihre potentielle Rolle bei Inflammationen und Autoimmunerkrankungen**

Der VP1-unique region kommen auf Grund seiner Phospholipase A<sub>2</sub>-ähnlichen Aktivität entzündungsfördernden Eigenschaften zu. Zwar weist die virale Phospholipase A<sub>2</sub> strukturelle Unterschiede zu den zellulären Phospholipasen A<sub>2</sub> auf und auch ihre Substratspezifität ist noch zu klären, die Möglichkeit liegt jedoch nahe, dass die virale Phospholipase A<sub>2</sub> *in vivo* ähnliche Effekte hervorruft wie ihre eukaryotischen Vertreter. Im folgenden sind Prozesse, denen die Freisetzung von Arachidonsäure zu Grunde liegt und solche, die auf direkter struktureller Veränderung ihrer Substrate basieren, zu unterscheiden.

#### **A.7.2.1. Arachidonsäure-abhängige Prozesse**

Körpereigene Phospholipasen A<sub>2</sub>, die in verschiedenen eukaryontischen Zellen vorhanden sind, setzen als Reaktion auf bestimmte Hormonsignale Arachidonsäure aus Membranphospholipiden frei, welche ihrerseits Vorstufe für verschiedene Eicosanoide ist (s. Abb. 7). So können Enzyme im glatten Endoplasmatischen Retikulum Prostaglandin H<sub>2</sub> herstellen, das seinerseits unmittelbare Ausgangsverbindung weiterer Prostaglandine und Thromboxane ist. Leukotriene entstehen über die enzymatische Wirkung der Lipoxygenase. Während Prostaglandine über die Regulation von cAMP Einfluss auf die Aktivität vieler Hormone nehmen und dabei u.a. erhöhte Körpertemperaturen und Entzündungsreaktionen hervorrufen, spielen Thromboxane eine wichtige Rolle bei der Blutgerinnung, indem sie den Blutfluß zum Ort eines Blutgerinnsels verlangsamen und die Konstriktion von Gefäßen einleitet. Leukotriene bewirken u.a. die Kontraktion des Muskels entlang der Luftwege zur Lunge.



**Abbildung 7: Herstellung inflammatorischer Mediatoren durch Phospholipasen A<sub>2</sub>.** Durch die Wirkung von Phospholipasen A<sub>2</sub> wird die an der sn2-Position des Glycerins veresterte Fettsäure hydrolytisch abgespalten. Dadurch wird Arachidonsäure, die Vorstufe für die entzündungsfördernden Familien der Leukotriene, Prostaglandine und Thromboxane, freigesetzt. Die PLA<sub>2</sub>-vermittelte Reaktion ist abhängig von  $\text{Ca}^{2+}$  und kann durch Glucocorticoide stimuliert werden.

#### A.7.2.2. Arachidonsäure-unabhängige Prozesse

Erst kürzlich wurde bekannt, dass Lysophosphatidylcholin (LPC) in oxidierten Lipoproteinen geringer Dichte (oxLDL) vorhanden ist und durch Phospholipasen A<sub>2</sub> und/oder Oxidation hergestellt wird. LPC spielt wiederum eine Rolle bei der Entstehung von Artherosklerose, auch wurden Kreuzreaktionen zwischen Anti-Cardiolipin-Antikörpern und Anti-oxLDL-Antikörpern beschrieben (Wu R *et al.*, 1999).

Wie Abbildung 6 zeigt, bestehen verschiedene Möglichkeiten, wie die VP1-*unique region* an der Induktion von Anti-Phospholipid-Antikörpern beteiligt sein könnte. Zum Einen ist vorstellbar, dass körpereigene Verbindungen durch enzymatische Veränderung als fremd erkannt werden und somit Immunreaktionen und möglicherweise auch Kreuzreaktionen einleiten. Andererseits können strukturelle Eigenschaften des Erregers auf Grund großer Ähnlichkeit mit körpereigenen Stoffen Antikörper gegen diese induzieren. Ein Sequenzabschnitt im aminoterminalen Teil des Strukturproteins VP2 ist beispielsweise in der Lage, Wechselwirkungen mit den für SLE typischen Antikörpern gegen Keratin, Kollagen Typ II, ssDNA und Cardiolipin einzugehen (Lunardi C *et al.*, 1998).

Da das Parvovirus B19 an einer Reihe verschiedener Autoimmunerkrankungen beteiligt zu sein scheint, ist eine Phospholipase A<sub>2</sub>-vermittelte Freisetzung von Cytokinen und Chemokinen denkbar. Analog einer derart unspezifischen Aktivierung wird selbst durch Quecksilber und Gold ein inflammatorisches Milieu geschaffen, das zu einem geringen Umfang bereits vorhandene autoreaktive Gedächtniszellen stimulieren kann (Fournié GJ *et al.*, 2001).

Die Frage nach der Rolle der VP1-*unique region* in der Induktion von Anti-Phospholipid-Antikörpern sowie bei der Förderung inflammatorischer Prozesse ist Hauptgegenstand dieser Diplomarbeit.

### **A.8. Zielsetzung**

Im Rahmen dieser Arbeit sollen zwei funktionelle Eigenschaften der VP1-*unique region* untersucht werden. Hauptaugenmerk liegt dabei auf der potentiellen Rolle dieser Proteindomäne, im Infektionsverlauf Entzündungsreaktionen hervorzurufen und die Bildung von Autoantikörpern, in diesem Fall von Anti-Phospholipid-Antikörpern, zu induzieren.

Diese Funktion sollte isoliert, d.h. abgetrennt von den anderen Aktivitäten der Parvovirus B19-Proteine in einem Tierversuch untersucht werden. Die gentechnologisch produzierte, enzymatisch aktive VP1-*unique region* sollte hierfür in Mäuse inokuliert und ihre Fähigkeit zur Induktion von Anti-Phospholipid-Antikörpern und verschiedenen Cytokinen in den Tieren untersucht werden. Zum Vergleich und zur Kontrolle wurde eine weitere Gruppe von Mäusen mit einer Phospholipase A<sub>2</sub>-enzymatisch inaktiven Form der VP1-*unique region* gespritzt.

Parallel zu diesen Untersuchungen sollte das Cytokinmuster in den Seren und Gelenkflüssigkeiten mehrerer Rheumapatienten analysiert werden. Zusammen mit der Ermittlung des jeweiligen Infektionsstatus durch Nachweis parvoviraler DNA sowie B19-spezifischer Antikörper sollte die Assoziation juveniler rheumatischer Arthritis mit Parvovirus B19 geprüft sowie ein potentielles, B19-spezifisches Cytokinprofil aufgedeckt und mit den in den Mausexperimenten erhaltenen Daten verglichen werden.

Ferner soll die VP1-*unique region* als möglicher Kandidat für die Bindung an einen Co-Rezeptor untersucht und diskutiert werden. Dazu werden die VP1-*unique region* sowie ihre C- und N-terminalen Fragmente fluoreszenzmarkiert und ihre Bindung an Oberflächen erythroider Vorläuferzellen getestet.

## **B. Material und Methoden**

### **B.1. Material**

#### **B.1.1. Geräte und technische Hilfsmittel**

Biofuge 15	Heraeus Sepatech
Brutschrank BB 6220 CU	Heraeus Sepatech
Centricon-Plus 20	Millipore, Bedford, MA, USA
Centrifuge 5415	Eppendorf, Hamburg
Chromatographiesäulen (Ø 10 mm)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DryEase Mini-Gel Drying System	Invitrogen, Karlsruhe
FALCON® Culture Slides	Becton Dickinson Labware
FastBlot B34	Biometra, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop	LEICA, Wetzlar
Glasspritzen	Poulten + Graf, Wertheim
Hochdruckzellaufschlußsystem Basic-Z	Constant Systems, Low March, GB
Immulon4-Platten	Merck, Darmstadt
Injektionsnadeln	BD, Heidelberg
Luminex-Gerät	Bio-Rad, München
Magna Pure LC Systems	Roche, Mannheim
Maxisorb ELISA-Platten	Nunc, Wiesbaden
Medifuge 15000	Heraeus Sepatech
Megafuge 1.0 R	Heraeus Sepatech
Microbank™ Kryoröhrchen	PRO-LAB Diagnostics, Ontario, Canada
Microcon Centrifugenfilter	Millipore, Bedford, MA, USA
Micromass Quattro Ultima Triple Quadrupol-Massenspektrometer	Manchester, UK
MicroPulser™	Biorad, München
Mikroskop Leica BMIL	Leica Microsystems, Wetzlar
MSE Soniprep 150	SANYO-Gallenkamp, Belton, U.K.
Neubauer-Kammer	Brand
Orbital Shaker	Forma Scientific
Protran® Nitrocellulose Transfer Membrane	Schleicher & Schuell
Rotixa RP	Hettich

Schüttler Polymax 1040	Heidolph
Slabgelapparatur Minigel	Biometra, Göttingen
Slide-A-Lyzer Dialysekassetten	Pierce, Rockford, IL, USA
Sonifier 450	Branson
Sorvall RC 5B Plus	Sorvall
Spritzen	Braun, Melsungen
Sterilbank UVF 6.18 S	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Taqman ABI Prism 7700	Perkin Elmer-Applied Biosystems
Uvikon Spektrophotometer 930	Kontron
Vortex Genie 2	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Water Alliance 2790	Milford, MA, USA
Zellkulturflaschen	Falcon

### **B.1.2. Chemikalien und Biochemikalien**

β-Arachidonyl-γ-Stearoyl-Phosphatidylcholin	Sigma-Aldrich, Steinheim
(N-2-Hydroxyethyl-Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure)	
2-Butanol	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Acrylamid / Bisacrylamid (30%:0,8%)	National Diagnostics, Atlanta, GA, USA
Alexa Fluor 488	Molecular Probes, MoBiTech, Göttingen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Applichem, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Cystein	Sigma-Aldrich, Steinheim
DAPI (4,6-Diamidindihydrochlorid)	Roche, Mannheim
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dithiothreitol (DTT)	Applichem, Darmstadt
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Merck, Darmstadt
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol (absolut)	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd (37%)	Merck, Darmstadt
Fötale Kälberserum	PAN Biotech

Glutardialdehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Guanidinhydrochlorid	Merck, Darmstadt
HEPES	ICN Biomedicals, Aurora, OH, USA
Hydroxylamin	Sigma-Aldrich, Steinheim
IPTG (Isopropylthiogalactosid)	Applichem, Darmstadt
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Applichem, Darmstadt
Komplettes Freudsches Adjuvants (CFA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magermilchpulver	Töpfer, Dietmannsried
Methanol	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumbicarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdithionit ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ )	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck, Darmstadt
NBT/BCIP	Roche, Mannheim
Phosphorsäure (25%)	Merck, Darmstadt
Rotiblock	Roth, Darmstadt
RPMI 1640	PAN Biotech
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Serva, Heidelberg
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin)	Sigma-Aldrich, Steinheim
TMB	BD, Heidelberg
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	USB, Cleveland, OH; USA
Tween <sup>®</sup> 20	Merck, Darmstadt

### **B.1.3. Puffer und Lösungen**

#### **PBS**

0,9 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
2,7 mM KCl  
137 mM NaCl

#### **Proteinreinigung**

##### Puffer 1

20 mM HEPES  
1 mM EDTA  
1 M NaCl, pH 8,5

##### Puffer 2

20 mM HEPES  
1 mM EDTA  
2 M NaCl, pH 8,5

##### Puffer 100

20 mM HEPES  
1 mM EDTA  
100 mM NaCl, pH 8,5

##### Puffer 2000

20 mM HEPES  
1 mM EDTA  
2 mM NaCl, pH 8,5

##### Spleißpuffer

1 M DTT  
Mit P100 auf 50 ml auffüllen.

##### IPTG-Stammlösung

1 M IPTG

#### **ELISA**

##### Coating Buffer

1,59 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$   
2,93 g  $\text{NaHCO}_3$   
0,2 g  $\text{NaN}_3$   
Mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 1 l auffüllen, pH 9,6

##### PBS/ 0,1% Tween

500 ml PBS  
500  $\mu\text{l}$  Tween

#### **Fluoreszenzmarkierung**

##### Reaktionspuffer Abstopplösung

0,1 M Natriumbicarbonat, pH 8,3  
1,5 M Hydroxylamin, pH 8,5

#### **Milzpräparation**

##### Komplettes Milzmedium

RPMI 1640  
10 % FCS  
1 % Penicillin/Streptavidin  
20 mM HEPES  
50  $\mu\text{M}$  2-Mercaptoethanol  
150 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$

Lysepuffer	1 mM KHCO <sub>3</sub> 0,1 mM Na <sub>2</sub> EDTA Mit H <sub>2</sub> O auf 500 ml auffüllen, pH 7,2-7,4 Steril filtrieren
Waschmedium	PBS 1% FCS
<u>SDS-PAGE</u>	
Laufpuffer	250 mM Tris 150 mM Glycin 0.1 % SDS
Probenpuffer (5x)	312,5 mM Tris/HCl, pH 6,8 5 % SDS 25 % Glycerin 25 % 2-Mercaptoethanol 2,5 mM EDTA 0.01 % Bromphenolblau
Sammelgel (Lsg. für 2 Gele)	AA / BAA 650 µl 0,5 M Tris-Cl, pH 7,0 1,25 ml H <sub>2</sub> O 3,05 ml SDS 50 µl APS 50 µl TEMED 10 µl
Trenngel (12%, Lsg. für 2 Gele)	AA / BAA 4 ml 1,5 M Tris-Cl, pH 7,0 1,5 ml H <sub>2</sub> O 3,35 ml SDS 100 µl APS 50 µl TEMED 5 µl
Geldry Solution	35 % Ethanol 2 % Glycerin
Silberfärbung Fixierlösung	30 % Ethanol 15 % Eisessig
Inkubationslösung	25 % Ethanol 34 g NaOAc·3 H <sub>2</sub> O  1 g Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ·5 H <sub>2</sub> O 2,5 ml Glutardialdehyd (40%) Mit H <sub>2</sub> O auf 500 ml auffüllen
Färbelösung	0,5 g AgNO <sub>3</sub>

	150 µl Formaldehyd (37%) Mit H <sub>2</sub> O auf 500 ml auffüllen
Entwicklerlösung	12,5 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , pH 11,5 150 µl Formaldehyd (37 %) Mit H <sub>2</sub> O auf 500 ml auffüllen
Abbrechtlösung	18,6 g EDTA
Geldry Solution	% Ethanol % Glycerin
<u>PLA<sub>2</sub>-Assay</u> Reaktionspuffer	10 mM Tris/HCl, pH 8,5

### **B.1.4. Bakterien und Zellen**

E.coli BL21(DE3)	F <sup>-</sup> ompT gal [dcm][lon]hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ; ein <i>E.coli</i> B Stamm) mit DE3, einem λ-Prophagen, der das Gen der T7-RNA-Polymerase trägt
Raji	Linie EBV-infizierter B-Lymphozyten
Hela	Zelllinie aus Cervixkarzinom
MB-02	Megakaryoblastoide Zelllinie

### **B.1.5. Proteine**

#### **B.1.5.1. Antikörper**

Bezeichnung	Antigen	Herkunft	Markierung	Quelle
<b>Primäre Antikörper</b>				
monoklonaler Anti-VP1n-Antikörper	VP1- <i>unique region</i>	Maus	keine	--
polyklonales Anti-VP1n-Serum	VP1- <i>unique region</i>	Kanninchen	keine	--
<b>Sekundäre Antikörper</b>				
Anti-mouse IgG	IgG (H+L)	Ziege	HRP	Jackson Immuno Research
Anti-human IgG	IgG	Kanninchen	HRP	DAKO, Glostrup
Anti-mouse IgG	IgG	Kanninchen	HRP	DAKO, Glostrup

#### **B.1.5.2. Sonstige**

β2-Glykoprotein 1	ICN Biomedicals, Aurora, OH, USA
NeoRecormon 1000 IE (Erythropoetin)	Roche, Mannheim
Phospholipase A <sub>2</sub> (aus Rinderpankreas)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin	PAN Biotech

### **B.1.6. Versuchstiere**

Balb/C Mäuse	Charles Rivers, Wiga, Sulzfeld
--------------	--------------------------------

### **B.1.7. Kits**

Anti-β2-GP1-ELISA	Orgentech Diagnostika, Mainz
Anti-Cardiolipin-ELISA	Orgentech Diagnostika, Mainz
Anti-Phosphatidylserin-ELISA	Orgentech Diagnostika, Mainz
Anti-Phospholipid-Screen -ELISA	Orgentech Diagnostika, Mainz
Bio-Plex Human Cytokine 17-Plex Panel	Bio-Rad, München
Bio-Plex Mouse Cytokine 18-Plex Panel	Bio-Rad, München
MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit	Roche, Mannheim
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen
recomBlot Parvovirus B19 IgG/IgM Kit	Mikrogen, Martinsried

### **B.1.8. Sonstige Hilfsmittel**

Diese Arbeit wurden mit *Microsoft Word 2000* erstellt. Die Erstellung von Bildern, Graphiken und Diagrammen erfolgte mit *Excell 97*, *ISIS-Draw*, *Canvas*, *Micrografix Designer* und *Adobe Photoshop 5.0*, Fluoreszenzaufnahmen wurden mit dem Programm *Meta View* erstellt und bearbeitet.

Zur Literatursuche wurde das OPAC-System der Universitätsbibliothek Regensburg und *PubMed* von *NCBI* verwendet. Der Vergleich von Proteinsequenzen wurden durch die Programme *BLAST* von *NCBI* und *gcg* des Unix-Servers der Universität Regensburg ermöglicht.

## **B.2. Methoden**

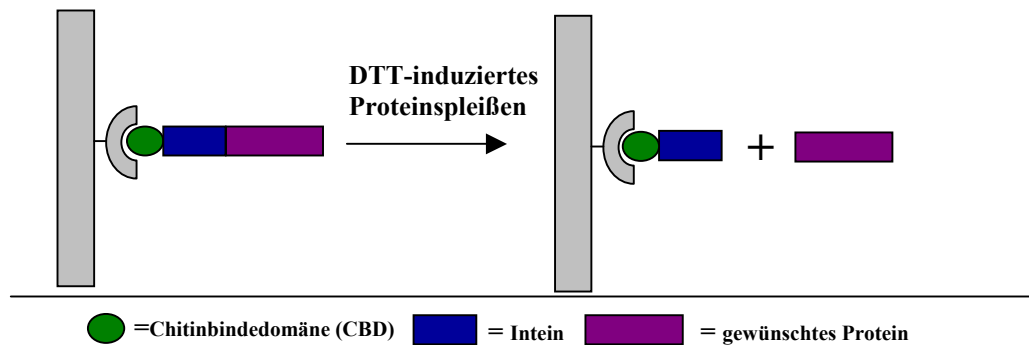
### **B.2.1. Proteinchemische Methoden**

#### **B.2.1.1. Proteinexpression und Reinigung**

Die Produktion und Reinigung der VP1-*unique region* und ihrer Varianten erfolgte mittels eines Chitin-Intein Systems (*IMPACT-CN*, *New England Biolabs*, s. Abb. 8). Die zu reinigenden Proteine werden in *E. coli* BL21 als Fusionsprodukt zusammen mit einem modifizierten Intein aus *Saccharomyces cerevisiae* sowie einer Chitinbindedomäne (CBD) aus *Bacillus circulans* produziert. Letztere ermöglicht die Reinigung des Fusionsprodukts durch Affinitätschromatographie über eine Chitin-Matrix. Nach entsprechenden Waschschritten kann das gewünschte Protein in einem Schritt durch Induktion des Proteinspleißens gewonnen werden. Die Abspaltung des gewünschten Proteins vom Intein-CBD-Anteil, welcher an der Matrix gebunden bleibt, wird durch Zugabe von DTT, einem Sulfhydrylreagenz, ausgelöst.

*E. coli* BL21 mit entsprechendem Plasmid (pET 21 $\alpha$ -int) wurden in 100 ml LB<sub>Amp</sub> über Nacht (ÜN) bei 37°C auf einem Schüttler als Vorkultur hochgezogen. Nach Überführen in 1 l LB<sub>Amp</sub>-Medium ließ man die Zellsuspension bis zu einer bei einer Wellenlänge von 600 nm photometrisch bestimmten optischen Dichte von 0,7 – 0,9 weiterwachsen. Durch Zugabe von 1 ml 1 M Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid (IPTG) wird die durch den *lac*-Repressor bedingte Unterdrückung des T7-Promotors aufgehoben und somit die Genexpression gestartet. Die Inkubation erfolgte hierbei für 3 Stunden bei 37°C unter Schütteln. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert (4000 rpm, 4°C, 15 min), der Überstand verworfen und das gewonnene Pellet in 30 ml Puffer 100 resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte mittels Hochdruckaufschluß (*Basic-Z*, *Consant Systems*, *Low March*, *GB*). Hierbei liegt das Prinzip zu Grunde, dass die Bakterienzellen unter großem Druck durch eine enge Öffnung gepresst werden und dabei aufplatzen. Nach Abzentrifugieren der Zelltrümmer (10000 rpm, 4°C, 30 min) wurde der Überstand filtriert und anschließend auf die mit Puffer 100 äquilibrierte Chitinmatrix (5 ml Säulenbett, 0,6 cm Säulendurchmesser) geben. Als Waschschrritte folgen Säulenläufe mit 10 ml Puffer 100, 30 ml Puffer 1, 30 ml Puffer 2000 und 10 ml Puffer 100 – jeweils bei 4°C. Zur Proteinabspaltung wurde die Säule mit 15 ml Spleißpuffer äquilibriert und ÜN inkubiert. Am nächsten Tag erfolgt die Elution von Aliquots zu je 0,5 ml mit 5 ml Puffer 100. Die Fraktionen wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und anschließender Silbergefärbung auf Reinheit und Menge hin untersucht. Nach Vereinigung der entsprechenden Fraktionen wird die

Proteinmenge nach Bradford bestimmt, in ein gleiches Volumen an 8 M Guanidiniumhydrochlorid aufgenommen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Sämtliche *E. coli*-Stämme wurden kryokonserviert bei  $-80^{\circ}\text{C}$  in einer Mikrobank aufbewahrt, wo sie an porösen Kunststoffperlen adsorbiert sind und von dort direkt in eine  $\text{LB}_{\text{Amp}}$ -Vorkultur überführt werden können.



**Abbildung 8: Schema zur Proteinaufreinigung mittels IMPACT-CN-System (Fa. New England Biolabs, Frankfurt).** Das mit einem Intein-Tag und einer Inteindomäne versehene Protein kann nach Binden an eine Chitinmatrix in einem Schritt durch Selbstspleißen eluiert werden.

## B.2.1.2. Weitere proteinchemische Verfahren

### B.2.1.2.1. SDS-PAGE

Zur Kontrolle einer erfolgreichen Proteinaufreinigung hinsichtlich Ausbeute und Reinheit wurde eine elektrophoretische Auftrennung von Aliquots der Proteinfractionen unter denaturierenden Bedingungen in einem SDS-Polyacrylamidgel vorgenommen. Dazu wurden  $20\ \mu\text{l}$  der Proteinlösung mit  $5\ \mu\text{l}$  an 5-fach konzentriertem Auftragspuffer verdünnt, für 5 min bei  $95^{\circ}\text{C}$  erhitzt und schließlich in die Taschen eines 12%-igen SDS-Polyacrylamidgels überführt. Als Standard wurden vorgefärbte Markerproteine (*Prestained Broad Range, Fa. Biorad*) verwendet. Der Gellauf erfolgte bei  $40\ \text{mA/Gel}$  zum Passieren des Sammelgels und bei  $60\ \text{mA/Gel}$  zur Auftrennung im Trenngel.

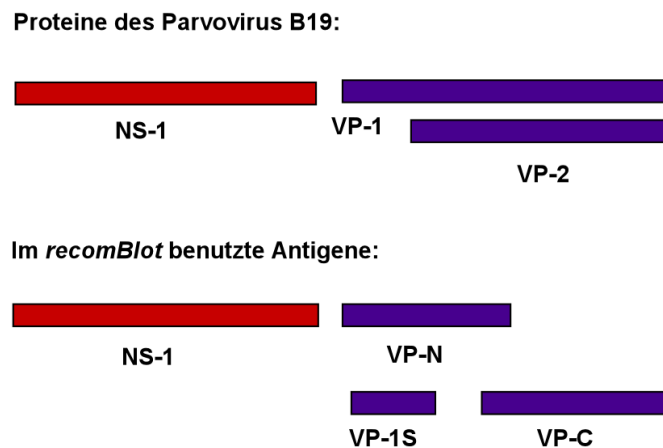
### B.2.1.2.2. Silberfärbung der Proteine

Im Anschluß an die SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine im Gel zum Nachweis der Proteinbanden silbergefärbt. Dies geschah durch einstündiges Fixieren der Gele (Fixierlösung), 12-stündigen Inkubieren (Inkubationslösung) und dreimaligen, je zehnminütigen Waschen mit Wasser. Nach 30-minütiger Inkubation durch Überführen der

Gele in eine silbernitratthaltige Färbelösung wurden die Proteinbanden mittels Entwicklerlösung bis zur gewünschten Intensität gefärbt und die Reaktion schließlich durch Überführen in Abbrechtlösung abgestoppt. Sämtliche Schritte erfolgten hierbei unter leichtem Schütteln und bei Raumtemperatur. Nach kurzem Spülen mit Wasser wurden die Gele zur Konservierung für 20 min in einer GelDry-Lösung geschwenkt, zwischen zwei mit gleicher Lösung benetzten Cellophanfolien in Rahmen gespannt und ÜN an der Luft getrocknet.

#### B.2.1.2.3. Western Blot (*recomBlot*)

Der *recomBlot* ist als qualitativer *in-vitro*-Test zum Nachweis von IgG- und IgM-Antikörpern, in diesem Fall gegen das Parvovirus B19, in humanem Serum oder Plasma der Methodik des Western Blots sehr ähnlich. Hierbei wurden rekombinant hergestellte, virusspezifische Antigene mittels SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet. Die Membran lag nach Blockierung freier Bindungsstellen und entsprechenden Waschschritten als fertige Teststreifen vor und konnte analog einer Western Blot-Färbung zur Untersuchung der Seren eingesetzt werden.



**Abbildung 9: Im Recomblot verwendete Antigene zum Nachweis Parvovirus B19-spezifischer Antikörper.**

Zunächst wurden 2 ml Waschpuffer in die Vertiefungen der Inkubationsplatte gegeben und zu den Teststreifen je 20 µl einer unverdünnten Serumprobe zupipettiert. Die Inkubation erfolgte ÜN bei RT unter leichtem Schütteln. Anschließend wurde viermal für je 5 min mit 2 ml Waschpuffer gewaschen, wobei zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen jeweils eine frische Pipette zum Abnehmen der Lösung verwendet wurde. Zur Detektion der virusspezifischen Antikörper gab man nun 2 ml eines 1:1000 mit Waschpuffer verdünnten

HRP-gekoppelten Antikörpern gegen menschliches IgG zu und ließ für eine Stunde bei RT schütteln. Nach weiterem viermaligen Waschen wurden 1,5 ml TMB-Substratlösung zugegeben und bis zum deutlichen Auftreten entsprechender Banden nach etwa 10 min gefärbt. Nach Spülen mit Wasser wurden die Streifen auf Papier getrocknet.

#### B.2.1.2.4. Aufkonzentrieren der Proteinlösungen

Zum Aufkonzentrieren der Proteinlösungen fanden Centricon-Plus 20 (19 ml Füllvolumen; 10 kDa Ausschlußgrenze) Verwendung. Hierfür wurde die in 4 M Guanidiniumhydrochlorid gelöste Proteinlösung so lange bei 3500 rpm zentrifugiert bis sich das gewünschte Endvolumen eingestellt hatte. Durch Kippen des Zentrifugenbechers und Zentrifugation bei 900 rpm für 5 min konnte die aufkonzentrierte Lösung in einem neuen Gefäß gesammelt werden.

#### B.2.1.2.5. Dialyse

Die Dialyse der Proteinlösungen zur Umpufferung von 4 M Guanidiniumhydrochlorid zu PBS erfolgte in Slide-A-Lyzer Mini Dialyse Units (3500 Da Ausschlußgrenze). Hierfür wurde jeweils dreimal für insgesamt 18 h gegen ein 2000-faches Volumen an PBS dialysiert.

#### B.2.1.2.6. Bestimmung der Proteinkonzentration

##### B.2.1.2.6.1. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Nach Vereinigung der einzelnen proteinhaltigen Fraktionen wurde die Proteinkonzentration in erster Näherung nach Bradford bestimmt. Nach der Elution von der Säule enthalten die Proteinfractionen noch größere Mengen an DTT, was eine exaktere Bestimmung der Proteinkonzentration mittels UV-Spektroskopie erheblich stören würde. Der Färbemethode nach Bradford liegt die Tatsache zu Grunde, dass sich das Absorptionsmaximum blauer Säurefarbstoffe, hier Coomassie Brilliantblau G250, in Gegenwart von Proteinen und in saurem Milieu von 465 nach 595 nm verschiebt, vermutlich durch Stabilisierung des Farbstoffs in seiner anionischen Form nach Bindung an Proteine. Anhand einer Eichkurve mit bekannten Mengen an BSA, konnte nun über die ermittelten Extinktionswerte bei 595 nm der Gesamtproteingehalt bestimmt werden.

### B.2.1.2.6.2. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels UV-Spektroskopie

Die wesentlich exaktere Methode der Konzentrationsbestimmung mittels UV-Spektroskopie wurde nach Aufkonzentrierung und anschließender Umpufferung in PBS durchgeführt. Sie nutzt die Fähigkeit aromatischer Aminosäuren, v.a. Tryptophan und Tyrosin, in geringerem Maß auch Phenylalanin, Licht einer Wellenlänge von 280 nm zu absorbieren. Die Extinktionswerte der einzelnen Proteinfragmente wurden nach folgender Formel von *Gill* und *Hippel* (Gill SC und von Hippel HP, 1989) berechnet, wobei *a* für die Anzahl der Tyrosinreste und *b* für die Anzahl der Tryptophanreste des jeweiligen Proteins steht:  $\epsilon_{280} = (a \cdot 1280) + (b \cdot 5690)$ . Daraus lässt sich nun unter Verwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes die Konzentration der Proteinlösung bestimmen:  $E_{280} = \epsilon \cdot c \cdot d$  ( $\epsilon$ : molarer Extinktionskoeffizient [ $\text{cm}^2/\text{mol}$ ], *c*: Konzentration [ $\text{mol/l}$ ], *d*: Schichtdicke der Küvette [ $\text{cm}$ ]). Die Extinktionskoeffizienten wurden mit Hilfe einer Ahnwendung aus dem Internet durch Eingabe der Primärstruktur des jeweiligen Proteins automatisch ermittelt (<http://www.basic.nwu.edu/biotools/ProteinCalc.html>) und sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Protein	Molarer Extinktionskoeffizient [ $\text{cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ ]
VP1n, H153A	29870
VP1n-C	13370
VP1n-N	16500

**Tabelle 2: Molare Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proteine.** Die Werte wurden nach der Methode von Gill und von Hippel ermittelt.

Die Messung von 10  $\mu\text{l}$  einer Proteinlösung wurde nach Verdünnung mit 90  $\mu\text{l}$  8 M Guanidiniumhydrochlorid im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 280 nm durchgeführt.

### B.2.1.3. Phospholipase A<sub>2</sub>-Enzym-Test

Der Phospholipase A<sub>2</sub>-Enzym-Test bietet die Möglichkeit, die enzymatische Aktivität der VP1- *unique region in vitro* zu testen.

Zur Liposomenherstellung wurde zunächst eine  $\beta$ -Arachidonyl- $\gamma$ -Stearoyl-Phosphatidylcholin/Chloroform-Lösung durch Abblasen mit Stickstoff von Chloroform befreit und anschließend in Reaktionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) resuspendiert. Nach kurzem Vortexen und Ultraschallbehandlung (Power: 50%, Tune: ½) für 30 sec, wurde die Suspension erneut für 5 sec bei höchster Stufe gevortext. Der Reaktionsansatz setzt sich

zusammen aus 80 µl Lipidsuspension, 10 µl 100 mM CaCl<sub>2</sub> und 10 µl einer 10 µM Proteinlösung und wird auf Eis zusammenpipettiert. Die enzymatische Reaktion wird nun für 10 min bei 37°C im Wasserbad durchgeführt und schließlich durch Zugabe von 3 ml eines Chloroform/Methanol-Gemisches (v/v 2:1) und anschließendem Vortexen abgestoppt. Im weiteren folgt die Lipidextraktion nach Bligh und Dyer (Bligh EG and Dyer WJ, 1956). Dazu wurden zu jedem Reaktionsansatz 700 µl Wasser hinzu pipettiert, kurz gevortext und anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von je 1 ml Chloroform und Wasser, wurde erneut gevortext und für 15 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Hydrophobe Edukte und Produkte wurden durch diese Methode in die organischen Chloroformphase gebracht und 800 µl davon bei -20°C aufbewahrt. Für die anschließende massenspektroskopische Analyse der Lipidzusammensetzung wurde das Lösungsmittel abgezogen, die Lipide in 10 mM Ammoniumformiat in Methanol/Chloroform (3:1) aufgenommen und anschließend mittels *Electrospray ionisation mass spectroscopy* (ESI-MS) analysiert. Die Messungen wurden im *Micromass Quattro Ultima Triple* Quadrupol Massenspektrometer (*Manchester, UK*) unter folgenden Einstellungen durchgeführt: Kapillare 3,5 kV, Kollisionsenergie 24 V und Kollisionsgasdruck  $1,3 \times 10^{-3}$  Torr. Die Proben wurden mit einer konstanten Fließrate von 75 µl/min mit einer *Waters Alliance 2790* (*Mildford, MA, USA*) injiziert und durch einen *parent scan* von 184 m/z spezifisch für Phosphocholin enthaltende Lipide analysiert (Brugger *et al.*, 1997). Die Phospholipase A<sub>2</sub>-Aktivität entspricht hierbei dem Intensitätsverhältnis von  $\gamma$ -Stearoyl-Lysophosphatidylcholin zu  $\beta$ -Arachidonyl- $\gamma$ -Stearoyl-Phosphatidylcholin und ist zugleich ein Maß für die Menge freigesetzter Arachidonsäure (s. Abb. 15).

## **B.2.2. Immunologische Methoden**

### **B.2.2.1. Versuche mit Mäusen**

#### **B.2.2.1.1. Haltung der Mäuse**

Alle Eingriffe und Behandlungen der insgesamt 40 weiblichen Balb/C-Mäuse wurde in Übereinstimmung mit §10a des Tierschutzgesetzes und nach Prüfung der geplanten Versuchsdurchführung durch den Tierschutzbeauftragten der Regierung Oberpfalz durchgeführt. Die Haltung der Tiere sowie sämtliche Tierversuche erfolgten im Tierlabor der Universitätsklinik Regensburg.

#### B.2.2.1.2. Inokulation der Mäuse

Die zu injizierende Proteinlösungen wurden den Mäusen nach standardisierten Verfahren im Falle der ersten Inokulation sowie der ersten Wiederholung-Injektion subkutan in die rechte bzw. linke Fußsohle, im Falle der zweiten Wiederholung-Injektion intraperitoneal verabreicht. Die ersten Injektionen wurden entweder in Kompletten Freud'schen Adjuvanz (CFA) oder in PBS verabreicht, erneute Inokulationen nach 10 Tagen erfolgten durchwegs in PBS. Auch die zweite Wiederholung-Injektion nach 90 Tagen wurde in PBS durchgeführt. Bezüglich injizierter Proteinmenge und zeitlichem Plan wurde nach genauem Schema vorgegangen (s. Tabelle 6). Das Vereinen der Proteinlösungen mit lipidreichem CFA erfolgte durch mehrminütiges Mischen mittels Glaspipetten und Dreiwegehahn.

#### B.2.2.1.3. Retrobulbäre Blutabnahme

Die Blutabnahme bei sämtlichen Mäusen erfolgte an den Tagen 20, 30 und 60 retrobulbär unter kurzzeitiger Isofloran-Narkose. Zusätzlich wurden auf gleiche Weise Blutproben von 10 Mäusen noch vor der Erstinokulation sowie an Tag 105 nach zwei wiederholten Injektionen entnommen. Die Blutproben wurden sofort auf Eis gegeben. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 12000 rpm wurde das Serum abgenommen und aliquotiert (je 20-50 µl für ELISA-Tests sowie je 20 µl für Cytokinmessungen mit Luminex) bei -80°C aufbewahrt.

Nach Beendigung der Experimente wurden die Mäuse durch cervikale Dislokation getötet.

#### B.2.2.1.4. Milzpräparation

Zwei Mäusen der mit der VP1-*unique region* in CFA gespritzten Gruppe wurde die Milz zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen die VP1-*unique region* entnommen. Nach Töten der Mäuse durch cervikale Dislokation wurde die linke Körperseite geöffnet, die direkt unter dem Peritoneum liegende, dunkel gefärbte Milz vollständig entnommen und in 20 ml steriles Kompletmedium überführt. Nun wird ein Nylonfilter (100 µm) auf ein neues Falcon aufgesetzt und die Milz mit dem Stempel einer 5 ml-Spritze auf dem Filter zerrieben. Dabei wird mehrmals mit Kompletmedium nachgespült, um bereits aus dem Gewebe gelöste Zellen in Lösung zu bringen und diese somit nicht weiter zu beschädigen. Nach vollständigem Zerreiben der Milz wurde für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert (RT, Bremse auf Stufe 5), der Überstand verworfen und das Pellet gut resuspendiert. Die anschließende Zugabe von 5 ml Lysepuffer für maximal 5 min bewirkte die Zerstörung des Gewebes, nicht jedoch einzelner Zellen. Danach wurde erneut bei gleichen Bedingungen für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet resuspendiert. Es folgten nun drei Waschschrte mit jeweils 10 ml Waschpuffer, worauf jeweils ein Zentrifugationsschritt unter obigen Bedingungen, Verwerfen

des Überstands und Resuspension des Pellets folgte. Schließlich wird das Zellpellet in 5 ml Komplettmedium aufgenommen, die Zellzahl eines Aliquots mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Suspension auf eine Konzentration von  $5 \cdot 10^6$  Zellen pro ml gebracht.

### B.2.2.2. Etablierung und Durchführung von ELISAs

Die Methode des *Enzyme-linked Immunosorbent Assays* (ELISA) dient allgemein zum Nachweis spezifischer Antikörper mittels Bindung an das entsprechende Antigen. Im Falle der hier durchgeführten ELISA-Tests wurden die Platten mit einem Antigen beschichtet, an welches die entsprechenden Antikörper im Serum der Mäuse eine spezifische Wechselwirkung eingehen. Mit Hilfe Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper, die gegen die konstante Region der Erstantikörper gerichtet sind, kann das Vorhandensein von Antigen-Erstantikörper-Komplexen enzymatisch nachgewiesen werden. Die Peroxidase spaltet den blauen Farbstoff TMB in ein gelbes Substrat. Letzteres kann photometrisch bei 450 nm quantifiziert werden.

Der Durchführung der ELISA-Tests ging die Etablierung der Methode voraus, in der mehrere Bedingungen geprüft wurden, um eine Kombination aus möglichst niedrigem Hintergrund und einem weiten Messbereich zu finden.

#### B.2.2.2.1. Detektion von Antikörpern gegen die immunisierten Antigene

Zum Nachweis einer erfolgreichen Immunantwort gegen die injizierten Proteine wurden die Mäuseren mittels ELISA auf Antikörper gegen die immunisierten Proteine untersucht.

Dazu wurden 100 ng (1 µg/ml in *Coating-Puffer*) frisch präparierte VP1-*unique region* bzw. Phospholipase A<sub>2</sub> aus Rinderpankreas (*Fa. Sigma*) in jede Vertiefung einer *maxisorb* ELISA-Platte (*Fa. Nunc*) pipettiert und bei 4°C ÜN inkubiert. Nach dreimaligen Waschen mit je 200 µl Waschpuffer (*Fa. Mikrogen*) und jeweiligen Abklopfen der Platte, wurden freie Bindungsplätze mit 100 µl Rotiblocklösung blockiert (1h, 4°C). Nach erneutem dreimaligen Waschen wurden 100 µl der 1:100 in Verdünnungspuffer (*Fa. Mikrogen*) verdünnten Seren auftragen (1h, 37°C). Auf weitere Waschschrte folgte die Zugabe von 100 µl eines 1:5000 verdünnten Sekundärantikörpers (HRP-gekoppelter Anti-Maus-IgG-Antikörper aus Kanninchen), wonach eine einstündige Inkubation bei 37°C und schließlich drei weitere Waschschrte folgten. Die Färbereaktion wurde durch Zugabe von 100 µl TMB-Substratlösung (1:1-Mischung von Reagenz A und B, *Fa. PharMingen*) gestartet und nach 30-minütiger Inkubation bei RT und unter Lichtausschluß mit 100 µl 25% Phosphorsäure abgestoppt. Der Farbumschlag von blau nach gelb kann photometrisch durch duale Messung

der Extinktion bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 595 nm im ELISA-Reader quantifiziert werden.

#### B.2.2.2.2. ELISA zur Detektion von Anti-Phospholipid-Antikörpern

Zur Detektion der Anti-Phospholipid-Antikörper gegen  $\beta$ 2-Glykoprotein 1, Cardiolipin und Phosphatidylserin wurden bereits mit dem jeweiligen Antigen beschichtete und blockierte Platten (*Fa. Orgentech Diagnostik*) verwendet. Somit konnten jeweils 100  $\mu$ l der Mausseren direkt in einer 1:100-Verdünnung in PBS/0,1% Tween aufgetragen werden und für 45 min bei RT inkubiert werden. Nach dreimaligen Waschen mit 200  $\mu$ l PBS/0,1% Tween werden 100  $\mu$ l eines Sekundärantikörpers (HRP-gekoppelter Anti-Maus-IgG/IgM-Antikörper aus Ziege) 1:50000 verdünnt auftragen und ebenfalls für 45 min bei RT inkubiert. Nach weiteren Waschschritten folgte eine 20-minütige Färbung mit 100  $\mu$ l TMB-Substratlösung bei RT, welche schließlich durch Zugabe von 100  $\mu$ l 25% Phosphorsäure abgestoppt wurde. Die Quantifizierung des durch die Peroxidaseaktivität verursachten Farbumschlags erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenz: 595 nm) im ELISA-Reader.

#### B.2.2.2.3. Screen zur Detektion weiterer Anti-Phospholipid-Antikörper

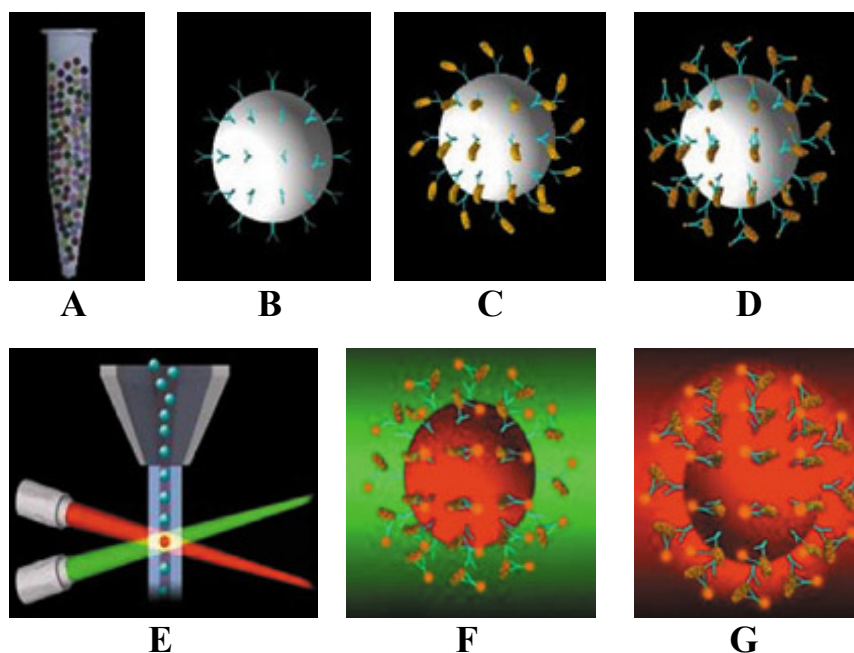
Der ELISA zur Durchführung des Phospholipid-Screens erfolgte nach gleichem Protokoll wie unter B.2.2.2.2. beschrieben. Die ELISA-Platten waren bereits mit den Antigenen  $\beta$ 2-GP1, Cardiolipin, Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol und Phosphatidylcholin beschichtet, sodass auch hier die verdünnten Mausseren direkt aufgetragen werden konnten.

#### B.2.2.3. Cytokinmessung per Luminex (*Bio-Plex Cytokine Assay*)

##### Testprinzip:

Der hier verwendeten Technik liegt das Prinzip eines *Sandwich Immunoassays* zu Grunde. Im Gegensatz zu herkömmlichen ELISA-Tests erlaubt sie jedoch die quantitative Analyse von 17 Human- bzw. 18 Mauscytokinen in einem Well (s. Abb. 10). Ermöglicht wird dies durch Polystyrenperlen von 5,5  $\mu$ m Durchmesser, an die für die jeweiligen Cytokine spezifische monoklonale Antikörper gekoppelt und die jeweils mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Nach Inkubation mit den Seren bzw. mit standardisierten Lösungen rekombinanter Cytokine werden die jeweiligen Cytokine gebunden und können mit biotinylierten, gegen ein anderes Epitop des jeweiligen Cytokins gerichteten Sekundärantikörpern wechselwirken. Mittels Streptavidin/Phycoerythrin werden die

Komplexe nachgewiesen, wobei Streptavidin an die biotinylierten Sekundärantikörper bindet. Durch die Markierung der Perlen mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen jeweils 10 verschiedener Intensitätsstufen, können theoretisch 100 Analyte in einer Vertiefung gemessen werden (Fulton RJ *et al.*, 1997). Ein Klassifizierungslaser ordnet bei einer Wellenlänge von 635 nm ein, welche Qualität das zu analysierende Cytokin besitzt. Ein zweiter Reporterlaser mit einer Wellenlänge von 532 nm gibt die Menge des in der Probe enthaltenen Cytokins an, indem es das an den Komplex gebundene Phycoerythrin quantifiziert.



**Abbildung 10: Methode zur Cytokinmessung mittels Luminex (Fa. BioRad).** Bis zu 100 Perlen unterschiedlicher Fluoreszenzmarkierung können pro Vertiefung untersucht werden (A). Sie wurden jeweils mit entsprechenden Antikörpern beschichtet (B). Nach Bindung des entsprechenden Cytokins (C) erfolgte die Detektion mittels einem weiteren fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (D). Die Perlen werden nun einzeln (E) von zwei Lasern abgetastet und Quantität (F) und Qualität (G) der Reaktion untersucht.

#### Vorbereitende Schritte:

Die eingesetzten Human- und Mausseren wurden auf Grund der geringen Halbwertszeit der meisten Cytokine direkt nach der Abnahme eingefroren und kurz vor den Messungen auf Eis aufgetaut. Vor der Durchführung des Tests erfolgten einige vorbereitende Schritte. Zum einen wurden die lyophilisierten, rekombinanten Cytokine in destilliertes Wasser aufgenommen und eine von 2 bis 32000 pg Cytokin/ml reichende Verdünnungsreihe angelegt, zum anderen

wurden die mit Anti-Cytokin-Antikörpern konjugierten Perlen 25-fach in Assay Puffer A verdünnt. Ferner wurden die Filter-Platten mit 100 µl Assaypuffer benetzt, mittels Vakuumpumpe für 2-5 sec abgesaugt und schließlich mit Papiertüchern vorsichtig getrocknet. Alle folgenden Inkubationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur und durch Einwickeln der Filterplatten in Alufolie unter Lichtausschluß, um eine Schädigung der Fluoreszenzmarker zu vermeiden.

#### Durchführung des Assays:

Nach Vortexen wurden je 50 µl der Perlensuspension in eine Vertiefung pipettiert und die Pufferlösung abgesaugt. Nach Zugabe von 50 µl Standardlösung und 50 µl Proben pro Kavität wurden die Filterplatten abgedichtet und zunächst bei 1100 rpm für 30 sec, dann bei 300 rpm für 30 min geschüttelt. Von den humanen Seren und Gelenkflüssigkeiten wurden jeweils 50 µl unverdünnt eingesetzt, von den Mausseren wurden auf Grund begrenzter Mengen an abgenommenen Blut nur 20 µl Serum im Verhältnis 1:2,5 mit Proben-Verdünnungspuffer A verdünnt. Nach dreimaligem Waschen mit jeweils 100 µl Waschpuffer A und anschließendem Absaugen wurde der Sekundärantikörper 50-fach mit Antikörper-Verdünnungspuffer A verdünnt und nach kurzem Vortexen ein Volumen von 25 µl der Lösung in jede Vertiefung der Filterplatte pipettiert. Daraufhin folgte eine Inkubationsphase auf dem Schüttler bei 1100 rpm für 30 sec, dann bei 300 rpm für 30 min. Sodann wird die Pufferlösung abgesaugt und die Perlen dreimal mit je 100 µl Waschpuffer A gewaschen. Zur Detektion des biotinylierten Sekundärantikörpers wurden pro Vertiefung 50 µl einer Streptavidin/Phycoerythrin-Lösung zugegeben. Die Platten wurden bei 1100 rpm für 30 sec, dann bei 300 rpm für 10 min geschüttelt. Anschließend wurde erneut dreimal mit 100 µl Waschpuffer A gewaschen und die Pufferlösung jeweils abgesaugt. Nach dem letzten Absaugschritt wurden die Perlen in 125 µl Assay-Puffer A resuspendiert und nach Schütteln für 30 sec bei 1100 rpm mittels *Bio-Plex Array Reader* und entsprechender Software analysiert und ausgewertet.

## **B.2.3. Molekularbiologische Methoden**

### **B.2.3.1. DNA-Isolierung**

Bei der DNA-Isolierung wird im folgenden zwischen Seren und den sehr zähflüssigen Synovialflüssigkeiten unterschieden. Die DNA wurde aus 20 µl der jeweiligen Proben isoliert.

#### **B.2.3.1.1. DNA-Isolierung aus Serum**

Die Isolation der DNA aus den Humansenen erfolgte maschinell unter Verwendung des *MagNA Pure LC Systems* der *Fa. Roche* (durchgeführt in der Diagnostikabteilung der Universitätsklinik Regensburg). Nach Auffüllen des *MagNA Pure LC*-Geräts mit den entsprechenden Reaktionslösungen wurden alle Isolierungsschritte automatisiert durchgeführt. Prinzipiell wurden die Proteine in den zu behandelnden Proben durch *Lysis/Binding*-Puffer denaturiert und schließlich durch Proteinase K abgebaut. Dabei freigesetzte DNA und RNA wird in diesem Milieu gleichzeitig stabilisiert und bindet an die Oberfläche der in einem nächsten Schritt zugegebenen magnetischen Glasperlen. Durch die magnetischen Eigenschaften der Glaskügelchen konnten diese während der Zugabe von drei verschiedenen Waschpuffern zur Entfernung jeglicher Proteine, PCR-Inhibitoren und anderen Störfaktoren im Reaktionsgefäß gehalten werden. Durch Erhöhung der Temperatur wird die DNA schließlich eluiert.

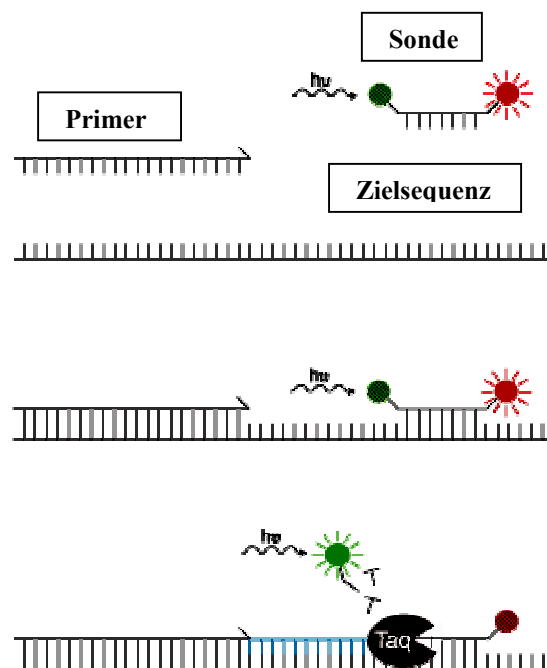
#### **B.2.3.1.2. DNA-Isolierung aus Synovialflüssigkeit**

Die DNA-Isolierung aus Synovialflüssigkeiten erfolgt prinzipiell analog zu der aus Seren. Da jedoch die Gefahr bestand, dass das *MagNA Pure LC*-Gerät die Proben auf Grund ihrer Zähflüssigkeit nicht bearbeiten kann, wurde die Reinigung „per Hand“ bevorzugt. Dazu diente ein *DNA-Purification* Kit der Firma *Qiagen*, verfahren wurde nach einem speziellen Protokoll für Blutproben und Körperflüssigkeiten (*QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbook, Qiagen*).

### **B.2.3.2. Real-time quantitative PCR (TaqMan)**

Die *Real-time* quantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erlaubt die kontinuierliche Messung der sich anhäufenden PCR-Produkte während der Reaktion mittels einem ABI Prism7700 Gerät (TaqMan). Der Möglichkeit kontinuierlicher Quantifizierung während der Reaktion liegen zweifach fluoreszenzmarkierte, 20-25 Basen lange Oligonukleotidsonden zu Grunde, an deren 5'-Terminus sich ein Reporterfarbstoff, am 3'-Terminus ein

Quenchfarbstoff befindet. Ferner müssen die Oligonukleotide homolog zu einer internen Sequenz der zu amplifizierenden DNA sein. Da die an die Zielsequenz gebundenen Oligonukleotide zu Beginn der Reaktion intakt sind, wird die Emission des Reporterfarbstoffs wegen eines Energietransfers vom Quenchfarbstoff unterdrückt. Während der Extensionsphase der PCR unter Einsatz von Primern, die an Sequenzbereiche außerhalb der Sondenbereiche binden, wird der Reporter durch die 5'-Nucleaseaktivität der Taq-Polymerase abgespalten, was eine Erhöhung der Reporteremission zur Folge hat (s. Abb. 11). Mittels Laserlicht kann die Fluoreszenzintensität mit dem ABI Prism 7700-Gerät (TaqMan) abgetastet und somit die fortlaufende PCR-Reaktion kontinuierlich quantifiziert werden. Mit Hilfe entsprechender Software wird die Fluoreszenzintensität verfolgt und gegen die PCR-Zyklusnummer aufgetragen. Die Quantifizierung erfolgt über die Festlegung des Zeitpunktes, ab dem die Fluoreszenzintensität einen festgelegten Schwellenwert überschreitet. Zum Nachweis dafür, dass die PCR-Reaktion prinzipiell funktioniert hat, wurden allen Proben geringe Mengen an Volvox-DNA zusammen mit den entsprechenden Primern und Sonden zugegeben. Ein negatives Ergebnis bezüglich des Nachweises von Volvox-DNA würde darauf hindeuten, dass beispielsweise auf Grund der Zähflüssigkeit der Synovialflüssigkeiten oder in der Probe vorhandener Inhibitoren der Taq-Polymerase eine erfolgreiche PCR-Reaktion grundsätzlich nicht möglich ist.



**Abbildung 11: Schematische Darstellung zum Funktionsprinzip einer *Real-time* PCR (TaqMan).** Die Abspaltung der Oligonukleotidsonde durch die Taq-Polymerase bewirkt eine erhöhte Fluoreszenzintensität des Reporterfarbstoffes, welche es erlaubt, den Verlauf der PCR-Reaktion zu quantifizieren (Abbildung nach Firma *Molecular Probes*).

## **B.2.4. Zellbiologische Methoden**

### **B.2.4.1. Zellkulturtechniken**

#### **B.2.4.1.1. Zellkultur**

Zur Vermeidung von Kontaminationen fanden alle Arbeitsschritte unter der Sterilbank statt. Auf den Zusatz von Antibiotika in die Kulturmedien wurde verzichtet, um mögliche Kontaminationen frühzeitig zu erkennen.

Die Kultivierung von Zellen der Linien Raji und Hela erfolgte in RPMI 1640 mit 2mM Glutamin und 10% fötalem Kälberserum, welches vorher für 30 Minuten bei 65°C inaktiviert wurde. Die semiadhärenten Raji-Zellen wuchsen am besten bei minimaler Kontaktfläche in stehender Kulturflasche. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit wurden die Zellen 2-3 mal pro Woche durch kräftiges Abklopfen in Suspension gebracht, zentrifugiert und das Pellet in frisches Medium aufgenommen. Die adhärenen Hela-Zellen wurden durch Einwirken von 2ml Trypsin abgelöst und etwa 2 mal pro Woche mit frischem Medium verdünnt. Zellen der Linie MB-02 wurden in RPMI 1640 mit 2 mM Glutamin und 10% sterilfiltrierten, Parvovirus B19-negativen Humanserum kultiviert. Ferner wurde dem Medium 3 ng/ml Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierender-Faktor (GM-CSF) zugesetzt. Die Inkubation aller hier aufgeführten Zelllinien erfolgte bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub>.

#### **B.2.4.1.2. Zelldifferenzierung und -synchronisierung**

Zur erythroiden Differenzierung von MB-02-Zellen wurde die Zellsuspension zunächst 5 min bei 800 rpm abzentrifugiert und das Pellet nach Abgießen des Überstandes in frischem Medium zu einer Konzentration von  $1 \cdot 5 \cdot 10^5$  Zellen/ml resuspendiert. Anschließend gab man 3µl/ml rekombinantes Erythropoetin (EPO) und 10 ng/ml rekombinanten Stammzellfaktor (SCF) hinzu.

Die Synchronisierung der Zellen in der G1-Phase erfolgte durch Herabsetzen des Humanserums von 10% auf 0,5% (Bashir T *et al.*, 2000). Dies geschah stufenweise nach folgendem Schema, wobei auch die Konzentration an GM-CSF kontinuierlich gesenkt wurde:

Tag	Humanserum	GM-CSF-Verdünnung (Konz.)
1	10 %	1: 100 (3 ng/ml)
2	5 %	1: 200 (1,5 ng/ml)
3	2,5 %	1: 500 (0,6 ng/ml)
4	1 %	1:1000 (0,3 ng/ml)
5	0,5 %	0 (0,0 ng/ml)
6	EPO-Stimulierung	EPO-Stimulierung

**Tabelle 3: Synchronisierung von MB-02-Zellen.** Die Zellsuspensionen wurden jeweils abzentrifugiert (5 min, 800 rpm), das Pellet in PBS gewaschen, erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert und das Zellpellet schließlich in frisches RPMI 1640 Medium mit entsprechend niedrigeren Konzentrationen an Humanserum und GM-CSF aufgenommen.

#### B.2.4.1.3. Zählen der Zellen in der Neubauer-Kammer

Das Zählen der kultivierten Zellen erfolgte mit Hilfe eines speziellen Objektträgers (Neubauer-Kammer), welcher es ermöglicht, die Menge an Zellen pro definierter Flächeneinheit in einem Raster auszuzählen und somit die Konzentration pro ml zu bestimmen. Hierfür werden 50 µl einer Zellsuspension mit 50 µl Trypanblau zur Färbung toter Zellen zusammengegeben, ein Tropfen davon zwischen Objektträger und Objektgläschen mittels Adhäsionskräften angesogen und im Mikroskop ausgezählt. Aus der durchschnittlichen Zellzahl pro 16-er Feld kann auf die Zellkonzentration der Ausgangssuspension nach folgender Formel rückgeschlossen werden: 16-er Zellzahl x Verdünnung x  $10^4$  = Zellzahl/ml.

#### B.2.4.1.4. Einfrieren der Zellen

Zur Konservierung von Zelllinien über einen längeren Zeitraum wurden diese in flüssigen Stickstoff aufbewahrt. Dazu wurden  $5 \cdot 10^6$  Zellen in 1 ml fötalem Kälberserum aufgenommen und in ein steriles Kryogefäß überführt. Zur Vermeidung intrazellulärer Kristallbildung enthält das Serum 10% Dimethylsulfoxid. Die Zellsuspension wurde stufenweise abgekühlt, zunächst für 30 min auf 4°C, dann nach Verpackung in einen luft- und feuchtigkeitsdichten

Behälter für 2-3 Stunden auf  $-20^{\circ}\text{C}$  und schließlich über Nacht auf  $-80^{\circ}\text{C}$ . Anschließend erfolgte die Überführung in flüssigen Stickstoff.

#### B.2.4.1.5. Auftauen der Zellen

Um kryokonservierte Zellen wieder in Kultur zu nehmen, soll die Schädigung der Zellen durch das im Einfriermedium in hohen Konzentrationen vorliegende, zytotoxische Dimethylsulfoxid verhindert werden. Dazu wurde das Kryogefäß rasch erwärmt und die Zellsuspension in 10 ml PBS überführt, um so das Zellgift schnell zu verdünnen. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 800 rpm und Verwerfen des Überstandes werden die Zellen in Kulturmedium aufgenommen und dem Zelltyp entsprechend kultiviert.

### B.2.4.2. Zellbindungsstudien

#### B.2.4.2.1. Proteinmarkierung

Um die Proteine im anschließenden Zellbindungstest sichtbar zu machen, mussten sie zunächst fluoreszenzmarkiert werden. Dies geschah unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs Alexa Fluor 488, der über eine Succinimidylestergruppe an den N-Terminus von Proteinen sowie an  $\epsilon$ -Aminogruppen von Lysinen kovalent gekoppelt werden kann.

Zunächst wurden die eluierten Proteinfractionen aufkonzentriert und noch vorhandenes Dithiothreitol, welches sich störend auf die Proteinmarkierung auswirkt, durch Dialyse gegen PBS entfernt. Sodann wurden die Proteinkonzentrationen mittels UV-Spektroskopie auf  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$  eingestellt und  $300\mu\text{l}$  dieser Lösung zu  $50\mu\text{l}$  in Wasser gelösten Farbstoff ( $2\text{ mg/ml}$ ) gegeben. Die Kopplungsreaktion fand in  $0,1\text{ M}$  Natriumbicarbonat-Lösung ( $\text{pH } 8,3$ ) statt. Nach einer Stunde wurde die unter Lichtausschluss und bei Raumtemperatur durchgeführte Reaktion durch Zugabe von  $0,1\text{ ml}$  frisch hergestellter  $1,5\text{ M}$  Hydroxylaminlösung ( $\text{pH } 8,5$ ) gestoppt. Zur Abtrennung nicht gebundener Farbstoffmoleküle erfolgte nun ein weiterer Dialyseschritt gegen PBS. Das Verhältnis von markiertem zu nicht markiertem Protein konnte durch Messung der Extinktionen bei den Wellenlängen maximaler Absorption des Farbstoffs Alexa Fluor 488 ( $\lambda_{\text{max}}=495\text{ nm}$ ) und des Proteins ( $\lambda_{\text{max}}=280\text{ nm}$ ) bestimmt werden.

#### B.2.4.2.2. Bindungsversuche

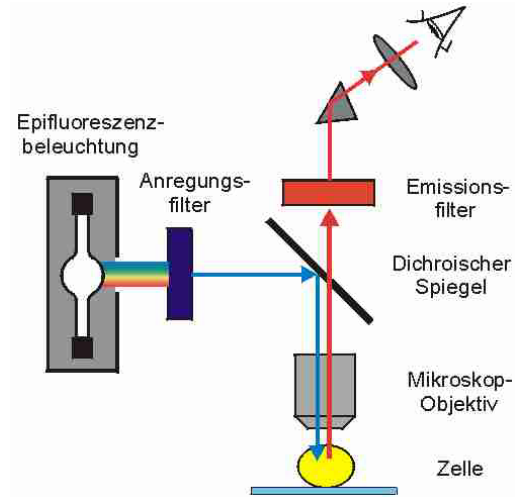
Zur Überprüfung der Bindung markierter Proteine an verschiedene Zelltypen und Zelldifferenzierungsstadien, wurden je  $2 \cdot 10^6$  Zellen in ein 15 ml Falconröhrchen überführt, 5min bei 800 rpm zentrifugiert und nach einmaligem Waschen mit 1 ml PBS in 500  $\mu$ l frisches Kulturmedium gegeben. Nach Zugabe von 10  $\mu$ l Proteinlösung wurden die Röhrchen, um Luftzufuhr zu ermöglichen, nur locker verschlossen und eine Stunde bei 37°C unter gelegentlichen leichten Schütteln inkubiert.

Nun wurden die Zellen erneut abzentrifugiert, zweimal mit je 500  $\mu$ l PBS gewaschen und schließlich in 200  $\mu$ l PBS aufgenommen. Die Suspensionen wurden dann in spezielle Kammern eines Objektträgers pipettiert und zur Sedimentation der Zellen für 20 min bei 37°C in einer mit feuchten Tüchern ausgelegten, verschlossenen Plastiksachtel inkubiert. Nach vorsichtiger Abnahme des Überstandes wurden die Zellen mit 150  $\mu$ l eisgekühlter 2%igen Paraformaldehydlösung für 10 min auf Eis fixiert. Nachdem erneut zweimal mit PBS gewaschen wurde, lässt man zum Anfärben des Chromatins 200  $\mu$ l 1  $\mu$ g/ $\mu$ l 4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) für 10 min bei Raumtemperatur auf die Zellen einwirken. Nach weiteren zwei Waschschritten mit PBS und gründlicher Abnahme des Überstandes, wurden die Kammern entfernt und die Objektträger an der Luft getrocknet. Schließlich wurden einige Tropfen Eindecklösung auf den Objektträger pipettiert und ein Deckglas blasenfrei aufgelegt. Sämtliche Schritte wurden möglichst unter Lichtausschluss durchgeführt, um ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes zu vermeiden. Die Objektträger wurden in Alufolie gewickelt bei 4°C aufbewahrt und am folgenden Tag mittels Fluoreszenzmikroskop analysiert.

#### B.2.4.3. Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie (s. Abb. 12) beruht auf der Tatsache, daß gewisse Moleküle einen Teil des von ihnen absorbierten Lichts in Form einer langwelligeren (energieärmeren) Strahlung wieder abgeben. Dabei wird durch Verwendung eines Anregungsfilters die für die Anregung des Fluorochroms geeignete Wellenlänge aus dem polychromatischen weißen Licht einer Xenon- oder Quecksilberlampe herausgefiltert. Im Inneren des Mikroskops wird dieses Licht von einem dichroischen Spiegel auf das Präparat reflektiert. Die dem Spiegel eigene kritische Wellenlänge erlaubt es, Licht bis zu einer bestimmten Wellenlänge zu reflektieren, während der Rest durchgelassen wird. Diese wird so gewählt, dass sie zwischen Anregungs- und Emissionsmaximum des Fluorochroms liegt. So wird erreicht, dass das Anregungslicht

durch das Objektiv zum Präparat gelenkt wird, während das langwelligere Fluoreszenzlicht den Spiegel passieren kann und durch das Okular zum Auge gelangt.



**Abbildung 12: Funktionsprinzip eines Fluoreszenzmikroskops.** (aus Vorlesungsskript Stephan Frings, Uni Jülich)

## **C. Ergebnisse und Diskussion**

### **C.1. Allgemeine Vorgehensweise**

In der vorliegenden Arbeit soll die *VP1-unique region* des Parvovirus B19 hinsichtlich ihres Einflusses auf immunpathologische Effekte während einer B19-Infektion sowie ihrer potentiellen Rolle bei der Interaktion zwischen Virus und Zielzelle genauer beleuchtet werden. Das Kernthema stellt dabei die Untersuchung der potentiell entzündungsfördernden Eigenschaften der *VP1-unique region* dar. Es gibt deutliche Hinweise für einen Zusammenhang zwischen der Parvovirus B19-Infektion und Autoimmunerkrankungen wie Arthritis, dem Anti-Phospholipid-Syndrom und SLE (Lehmann HW *et al.*, 2002; Landenberg P *et al.*, 2003; Hemauer A *et al.*, 1999; Fawaz-Estrup F, 1996). Unklar sind jedoch die hierfür verantwortlichen molekularen Grundlagen. Ihre vermutlich exponierte Lage an der Kapsidoberfläche, ihrer Fähigkeit zur Induktion neutralisierender Antikörper sowie v.a. ihre kürzlich entdeckte Phospholipase A<sub>2</sub>-ähnliche Aktivität machen die *VP1-unique region* zu einem potentiellen Kandidaten beim Hervorrufen inflammatorischer Reaktionen.

Um immunpathologische Eigenschaften der *VP1-unique region* zu untersuchen, sollten die Immunreaktionen, die sie nach Inokulation in Balb/C-Mäusen auslöst, analysiert werden. Im Besonderen sollte der Einfluß der Phospholipase A<sub>2</sub>-ähnlichen Enzymaktivität dieser Proteindomäne auf die Immunantwort in den Mäusen geklärt werden. Hierzu wurden die *VP1-unique region* und ihre enzymatisch inaktive Mutante H153A jeweils als Fusionsprotein mit einem Inteinanteil und einer Chitin-Bindedomäne im *E. coli*-Expressionsstamm BL21 produziert und anschließend mittels einer Chitinmatrix über Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Enzymaktivitäten der gereinigten Proteine sowie der zu Vergleichszwecken verwendeten Phospholipase A<sub>2</sub> aus Rinderpankreas (*Fa. Sigma*) wurden massenspektroskopisch in einem Phospholipase A<sub>2</sub>-Test bestimmt. Anschließend wurden 7 Gruppen von je 5 Balb/C-Mäusen einem genauen Immunisierungsplan folgend mit den unterschiedlichen Proteinen inokuliert. Die Charakterisierung der dadurch ausgelösten Immunantwort umfasst den Nachweis von proteinspezifischen Antikörpern, Anti-Phospholipid-Antikörpern und mehreren Cytokinen. Ein Mausmodell für das Parvovirus B19 existiert nicht, das Virus kann ausschließlich Menschen infizieren und vermehrt sich in Kultur nur in erythroiden Vorläuferzellen.

In vielen Rheumapatienten wird die Anwesenheit parvoviraler DNA im Blut sowie in Synovialflüssigkeit und –gewebe beschrieben (Saal JG *et al.*, 1992; Takahashi Y *et al.*, 1998). Weder ist dabei geklärt, wie das Parvovirus B19 bei der Induktion und Aufrechterhaltung der

Symptome beteiligt ist, noch wurden Cytokine, die wichtige Rückschlüsse auf die Art der Immunantwort geben, in einem breiteren Umfang untersucht. Die Analyse der Seren und Gelenkflüssigkeiten von an Rheuma erkrankten Kindern hinsichtlich 17 verschiedener Cytokine soll durch Vergleich mit Daten aus dem Mausmodell zur Klärung dieser Fragen beitragen. Die Cytokine wurden im *Bio-Plex Cytokine Assay* (Fa. Bio-Rad, München) getestet, die Detektion B19-spezifischer Antikörper und Genome erfolgte mittels Western Blot (*recomBlot*) bzw. quantitativer *real-time* PCR (TaqMan).

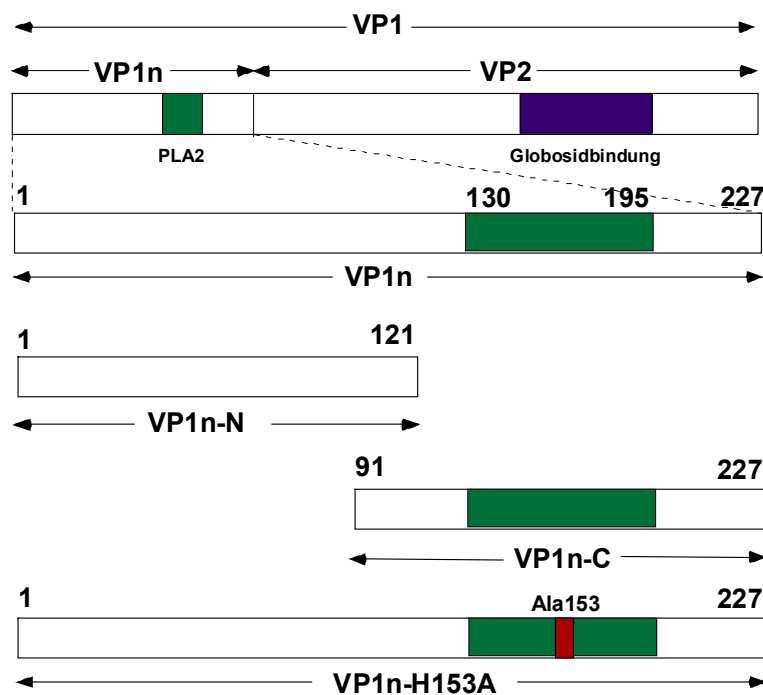
Im Infektionszyklus des Parvovirus B19 spielt die VP1-*unique region* vermutlich eine wichtige Rolle bei der Wechselwirkung mit den Zielzellen. Sie ist an einem sehr frühen Schritt im Infektionszyklus, möglicherweise bei der Bindung an einen Co-Rezeptor, beteiligt. Eine Reihe von Zellen, die die Vermehrung des Erregers nicht unterstützen, auf ihrer Oberfläche jedoch das mit dem VP2-Protein interagierenden Blutgruppenantigen P (Globosid) tragen, deuten darauf hin, dass ein weiterer Faktor am engen Zelltropismus des Erregers beteiligt sein muss (Rouger P *et al.*, 1987; Weigel-Kelley KA *et al.*, 2001). Die Bindung verschiedener Abschnitte der VP1-*unique region* an Zelloberflächen erythroider Vorläuferzellen soll fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden.

## **C.2. Untersuchung der antigenen Eigenschaften der VP1-*unique region* in Mäusen**

### **C.2.1. Gewinnung und Charakterisierung der Proteinantigene**

Die Produktion der in den folgenden Versuchen eingesetzten Proteine erfolgte gentechnologisch in Fusion mit einem Inteinabschnitt und einer Chitinbindedomäne im *E. coli* Expressionsstamm BL21. Die Bakterienstämme waren bereits in unserem Labor mit Vektoren, die für die VP1-*unique region*, ihre enzymatisch inaktive H153A-Mutante bzw. ihre N- und C-terminalen Hälften kodieren, transformiert worden und konnten direkt aus einer Mikrobank in Kultur genommen werden (Möbs M, Dorsch S). Nach Induktion der Proteinsynthese wurden die Proteine aus dem bakteriellen Lysat unter Verwendung eines Chitin-Inteinsystem (*IMPACT-CN*, Fa. NEB, Frankfurt) aufgereinigt. Dieses erlaubt die Gewinnung von Proteinen im nativen Zustand ohne weitere Reinigungsschritte. Durch Zugabe eines Sulfhydrylreagenz, in diesem Fall DTT, werden die Proteine in einem Prozess des Selbstspießens vom Intein-Chitinbindedomänen-Anteil abgespalten und können von der Chitinmatrix eluiert werden (s. Abb. 8).

Eine schematische Darstellung der synthetisierten Proteine zeigt Abbildung 13. Die parvoviralen Strukturproteine besitzen im VP2-Teil eine Globosidbindedomäne. Das VP1-Protein ist im Gegensatz zum VP2-Protein um eine aminoternale Domäne von 227 Aminosäuren, der sogenannten VP1-*unique region*, verlängert. Im C-terminalen Teil der VP1-*unique region* ist die Phospholipase A<sub>2</sub>-ähnliche Aktivität (AS 130-195) lokalisiert. Diese ist in der VP1-*unique region* aktiv, während die Mutante H153A mit einer Aktivität von weniger als 1% des Wildtyps fast vollständig inaktiv ist. Bei der Mutante wurde die Aminosäure Histidin an Position 153 durch Alanin ersetzt (Möbs M, 2002). Das Histidin 153 ist analog zu anderen eukaryotischen Phospholipasen A<sub>2</sub> Teil des katalytischen Zentrums des Enzyms, seine Substitution durch eine kleine, hydrophobe Aminosäure zerstört die Funktion.

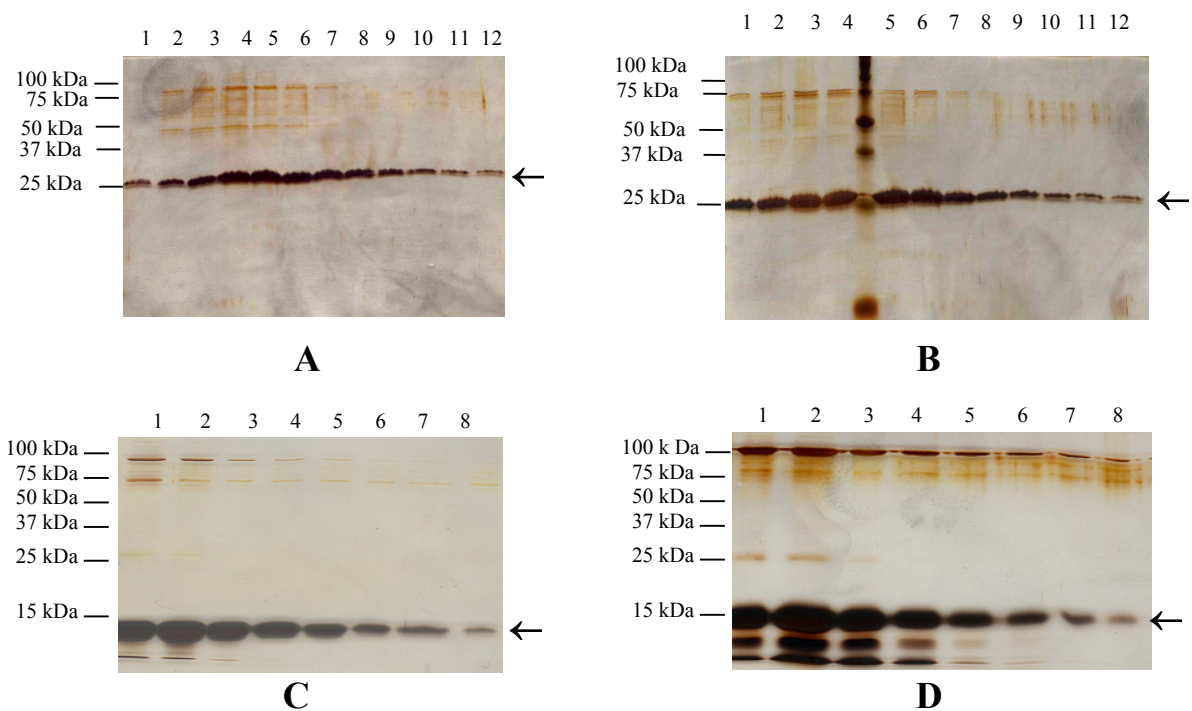


**Abbildung 13:** Die VP1-*unique region* (VP1n) und ihre N- und C-terminalen Fragmente (VP1n-N bzw. VP1n-C). Dargestellt ist das Strukturprotein VP1, das sich vom VP2-Protein durch die 227 AS umfassende VP1-*unique region* unterscheidet. Letztere enthält in ihrer C-terminalen Hälfte ein hier in grün dargestelltes Phospholipase A<sub>2</sub>-ähnliches Motiv. Die enzymatisch inaktive Mutante H153A wurde durch Substitution der AS Histidin 153 zu Alanin (in rot dargestellt) hergestellt. Die Globosidbindedomäne im VP2-spezifischen Abschnitt ist violett markiert.

Zur Bestimmung der Reinheit der Proteinlösungen wurden Aliquots der von der Säule eluierten Fraktionen auf ein 12%-iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und die im Gel aufgetrennten Proteine silbergefärbt. Nach Vereinigung der geeigneten Fraktionen wurde eine weitere Probe entnommen und die Ausbeute der jeweiligen Proteinreinigungen mittels

Bradford bestimmt. Der Rest wurde nach 1:1-Verdünnung mit 8 M Guanidiniumhydrochlorid bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Pro Liter Bakterienkultur konnten jeweils etwa 0,5 mg Protein gewonnen werden. Zur Steigerung der Proteinausbeute wurde nach der ersten Elution erneut Spleißpuffer auf die Säule gegeben und am darauf folgenden Tag ein zweites Mal eluiert. Dabei konnte bis zur Hälfte der Proteinausbeute der ersten Elution der Säule gewonnen werden. Allerdings wurden auf Grund der Gefahr der stärkeren Proteindegeneration und des Verlusts enzymatischer Aktivität nur Fraktionen aus dem ersten Elutionslauf verwendet. Ferner konnte gezeigt werden, dass längere Induktionszeiten der Bakterien mit IPTG (5, 7 und 20 Stunden) bei gleicher und veränderter Temperatur (RT,  $37^{\circ}\text{C}$ ) keinen merklichen Einfluß auf die synthetisierte Proteinmenge hatten. Das Optimum lag wie nach gängigem Protokoll bei 3-stündiger Induktionszeit und einer Temperatur von  $37^{\circ}\text{C}$ .



**Abbildung 14:** Ausbeute und Reinheit der *VP1-unique region* (A), ihrer enzymatisch inaktiven Mutante H153A (B) sowie der N- und C-terminalen Abschnitte VP1n-N (C) und VP1n-C (D). Aliquots der nach der Elution der Säule gesammelten Fraktionen wurden auf 12%-ige SDS-Polyacrylamidgels aufgetragen und die jeweiligen Proteine nach elektrophoretischer Auftrennung silbergefärbt. Die Elutionsfraktionen sind als Zahlen von 1 bis 12, die Werte des Molekulargewichtsmarkern sind jeweils links von den Bildern angegeben. Die Pfeile geben die jeweiligen Proteinbanden an.

Die VP1-*unique region* (25 kDa), die Mutante H153A (25 kDa) sowie die N- und C-terminalen Abschnitte der VP1-*unique region* (13,4 kDa bzw. 14,6 kDa) konnten ihrem Molekulargewicht entsprechend nachgewiesen werden (s. Abb. 14). In den in Abb. 14 A und B gezeigten Proteinreinigungen konnten alle 12 Fraktionen, im Falle der in Abb. 14 C und D dargestellten Säulenläufe die ersten 8 von insgesamt 10 Fraktionen vereint werden.

Auf Ratschlag der *Fa. NEB, Frankfurt* konnten Verunreinigungen und Abbauprodukte der in *E. coli* produzierten Proteine durch Verwendung von Waschlösungen hoher Salzkonzentration weiter entfernt werden. Dazu wurde vor der Zugabe von DTT, das die Freisetzung der zu reinigenden Proteine von der Chitinmatrix auslöst, die Säule zusätzlich zu 4 Säulenvolumen Äquilibriumspuffer (enthält 100 mM NaCl) und 8 Säulenvolumen eines Puffers niedriger Salzkonzentration (enthält 2 mM NaCl) mit 6 Säulenvolumen eines weiteren Waschpuffers (enthält 2 M NaCl) gewaschen. Dadurch konnte die Reinheit der Proteine weiter gesteigert werden (s. Abb. 14). Die verbleibenden, nach der Silberfärbung im Gel sichtbaren nieder- und hochmolekularen Verunreinigungen sind jedoch nicht zu vermeiden und als sehr einheitliches Muster in allen Proteinreinigungen, auch bei Kollegen im Labor zu finden. Bei den niedermolekularen Verunreinigungen handelt es sich vermutlich um Abbauprodukte der Proteine, die während der Reinigungsprozesse entstehen. Auffallend ist hierbei, dass der C-terminale Teil der VP1-*unique region* deutlich mehr Abbauprodukte zeigt als der N-terminale Abschnitt (s. Abb. 14 C und D). Dies konnte bereits mehrmals beobachtet werden und deutet auf die stabilisierende Funktion des N-terminalen Abschnitts hin, der im Protein VP1n-C deletiert ist (Möbs M, 2002; Spall T, 2001).

Da die hochmolekularen Verunreinigungen im Western Blot auch mit polyklonalem Kaninchenserum, welches die VP1-*unique region* erkennt, anfärbbar waren (nicht gezeigt), ist anzunehmen, dass es sich dabei um die ursprünglich synthetisierten Fusionsproteine mit dem Inteinabschnitt und der Chitin-Bindedomäne sowie deren Abbauprodukte handelt.

Dem Prüfen der Reinheit durch Färbung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine und der anschließenden Ermittlung der Ausbeute mittels Bradford folgte die einheitliche Vorbereitung der Proben für die Inokulation in Mäuse nach in Tabelle 4 angegebenen Schema:

Tag 1	Auftauen und Aufkonzentrieren – Dialyse ÜN
Tag 2	Dialyse – Konzentrationsbestimmung mittels UV-Spektroskopie – ÜN bei 4°C
Tag 3	PLA <sub>2</sub> -Enzymtest bzw. Inokulation in Mäuse

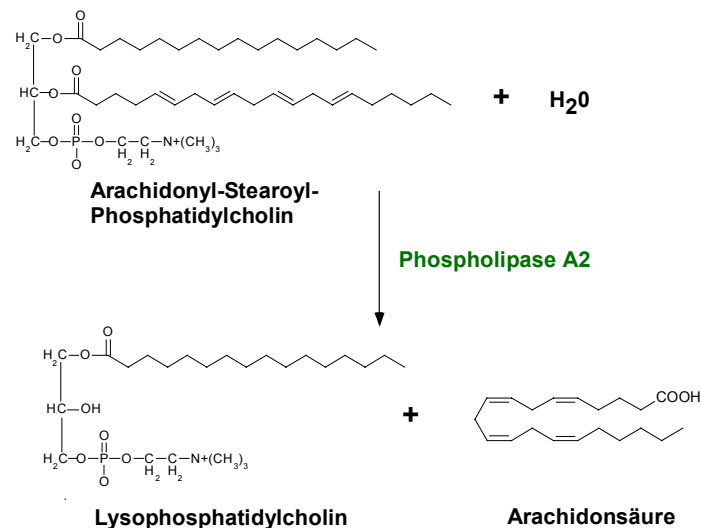
**Tabelle 4: Vorbereitung der Proben für die Immunisierung.** Die Proteinlösungen wurden nach der Aufkonzentrierung dialysiert und nach maximaler Lagerung von zwei Tagen bei 4°C zur Bestimmung der Enzymaktivität bzw. zur Inokulation in Mäuse eingesetzt.

Die nach der Elution in 4 M Guanidiniumhydrochlorid bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrten Proteinlösungen wurden zunächst mittels Zentrifugationskonzentratoren auf ein Volumen von 200  $\mu\text{l}$  aufkonzentriert. Zur Entfernung von DTT und Guanidiniumhydrochlorid wurden die Proteinelösungen dreimal für insgesamt 18 Stunden gegen ein 2000-faches Volumen an PBS dialysiert. Nach UV-spektroskopischer Konzentrationsbestimmung bei einer Wellenlänge von 280 nm, die deutlich exaktere Werte als die Bestimmung mittels Bradford zulässt, wurden die Proben auf Konzentrationen von 1 mg Protein pro ml eingestellt. Ebenso wurde die Phospholipase A<sub>2</sub> aus Rinderpankreas sowie  $\beta$ 2-GP1 nach Lösen des Lyophilisats in PBS auf Konzentrationen von 1 mg/ml gebracht. Die Proben wurden jeweils bei  $4^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt und nach maximal zwei Tagen Lagerung zur Bestimmung der Enzymaktivität bzw. zur Inokulation in Mäuse eingesetzt.

Im nächsten Schritt wurden die enzymatischen Aktivitäten der gereinigten Proteinpräparationen in einem PLA<sub>2</sub>-Enzymtest mittels ESI-Massenspektrometrie ermittelt. Damit soll sichergestellt werden, dass die VP1-*unique region* nach Reinigung, Aufbewahrung in denaturierend wirkenden Guanidiniumhydrochlorid und anschließender Einengung noch unverminderte Enzymaktivität zeigt. Ferner sollen die Aktivitäten der Mutante H153A und der im weiteren zu Vergleichszwecken verwendeten Phospholipase A<sub>2</sub> aus Rinderpankreas geprüft werden.

Hierfür wurden 10  $\mu\text{l}$  einer 10  $\mu\text{M}$  Proteinlösung zu einem Reaktionsansatz aus 10  $\mu\text{l}$  100mM Ca<sub>2</sub>Cl und 80  $\mu\text{l}$  einer  $\beta$ -Arachidonyl- $\gamma$ -Stearoyl-Phosphatidylcholin-Liposomen pipettiert. Nach erfolgter Enzymreaktion bei  $37^{\circ}\text{C}$  und Zugabe eines Chloroform/Wasser-Gemisches wurden die hydrophoben Edukte und Produkte der Reaktion durch Extraktion in die organische Phase gebracht und massenspektroskopisch quantifiziert.

Enzyme der Familie der Phospholipasen A<sub>2</sub> katalysieren die hydrolytische Spaltung der sn2-Bindung einer an den Glycerinanteil von Phospholipiden veresterten Fettsäure. Bei Verwendung von  $\beta$ -Arachidonyl- $\gamma$ -Stearoyl-Phosphatidylcholin als Substrat wird dementsprechend Arachidonsäure als Produkt freigesetzt (s. Abb. 15). Die Enzymaktivität kann durch das massenspektroskopisch ermittelte Intensitätsverhältnis zwischen der Ausgangssubstanz  $\beta$ -Arachidonyl- $\gamma$ -Stearoyl-Phosphatidylcholin und dem Endprodukt Lysophosphatidylcholin bestimmt werden und gibt gleichzeitig Auskunft über die Menge freigesetzter Arachidonsäure.



**Abbildung 15: Phospholipase A<sub>2</sub>-katalysierte Freisetzung von Arachidonsäure.** Die Quantifizierung der Enzymaktivität erfolgt über die massenspektroskopische Erfassung von Lysophosphatidylcholin (LPC18) bzw. β-Arachidonyl-γ-Stearoyl-Phosphatidylcholin (PC38:4). Die Aktivität kann durch den Quotienten aus LPC18 zu PC38:4 ermittelt werden.

Die durchgeführten Messungen ergaben, dass die VP1-*unique region* in der Lage ist, in einer für eukaryotische Phospholipasen A<sub>2</sub> typischen Reaktion Arachidonsäure von der Ausgangssubstanz β-Arachidonyl-γ-Stearoyl-Phosphatidylcholin abzuspalten (s. Tabelle 5). Das Ausmaß ihrer Aktivität ist mit Werten früherer Messungen in unserem Labor vergleichbar (Möbs M, 2002; Dorsch S *et al.*, 2002). Die Reinigung der Proteine sowie die Aufbewahrung in Guanidiniumhydrochlorid hat somit keinen Einfluss auf die Aktivität der VP1-*unique region*. Die Mutante H153A zeigt erwartungsgemäß keine Aktivität.

	Enzymaktivität (LPC18/PC38:4)	Konzentration (µg Protein/µl)	Enzymaktivität (LPC18/PC38:4) pro µg Protein
VP1- <i>unique region</i>	0,022	0,53	4,2·10 <sup>-3</sup>
Mutante H153A	0,000	0,72	0
PLA <sub>2</sub> aus Rinderpankreas	0,013	0,19	6,8·10 <sup>-3</sup>
Nullkontrolle	0,000	0	0

**Tabelle 5: Ergebnisse des PLA<sub>2</sub>-Enzymtests.** Die Enzymaktivitäten sind durch das Verhältnis von γ-Stearoyl-Lysophosphatidylcholin (LPC18) zu β-Arachidonyl-γ-Stearoyl-Phosphatidylcholin (PC38:4) angegeben. In den Enzymtest wurden je 10 µl der Proteinlösungen mit den in der mittleren Spalte angegebenen Konzentrationen eingesetzt. In der rechten Spalte sind die Enzymaktivitäten bezogen auf ein µg Protein dargestellt. Als Negativkontrolle wurde der Reaktionspuffer ohne Protein getestet.

Bei der Untersuchung der antigenen Eigenschaften der VP1-*unique region* soll hinsichtlich ihrer enzymatischen Aktivität zu Vergleichszwecken eine Phospholipase A<sub>2</sub> aus dem Rinderpankreas verwendet werden. Um die beiden enzymatisch aktiven Proteine in vergleichbaren Mengen einsetzen zu können, wurde ihre jeweilige Enzymaktivität pro µg Protein bestimmt. Die Phospholipase A<sub>2</sub> aus dem Rinderpankreas wies dabei einen um den Faktor 1,6 höheren Wert auf als die VP1-*unique region* (s. Tabelle 5). Dieses Verhältnis wurde bei der Inokulation der Proteine in Mäuse annähernd berücksichtigt, indem im Falle der VP1-*unique region* die doppelte Proteinmenge (50 µg) im Gegensatz zur Phospholipase A<sub>2</sub> aus dem Rinderpankreas (25 µg) pro Maus injiziert wurde.

50 µg injizierter VP1-*unique region* kommen mit Einbeziehen der geringer Spuren an Verunreinigungen einer Menge von etwa 10<sup>15</sup> Molekülen gleich. Dies stellt verglichen mit chronischen Infektionen, wo 10<sup>3</sup> - 10<sup>7</sup> Viruspartikeln und damit etwa 6·10<sup>3</sup> bis 6·10<sup>7</sup> VP1-*unique region*-Moleküle/ml Blut enthalten sind, einen großen Überschuß dar. Der Situation einer akuten Infektion mit Konzentrationen von 10<sup>13</sup> bis 10<sup>14</sup> VP1-*unique region*-Proteine/ml Blut kommt die Inokulation der Proteinlösungen in Mäuse jedoch relativ nahe (Takahashi Y *et al.*, 1998; Anderson MJ *et al.*, 1985; Potter CG *et al.*, 1987).

### **C.2.2. Charakterisierung der Immunreaktion nach Inokulation der Proteinantigene in Mäusen**

Zur Untersuchung der immunologischen Effekte der VP1-*unique region* wurde diese in Balb/C-Mäuse injiziert. Die dadurch ausgelöste Immunantwort soll in mehreren Experimenten untersucht werden: Zum Nachweis von proteinspezifischen Antikörpern sowie von Anti-Phospholipid-Antikörpern dienen ELISA-Tests, eine Reihe verschiedener Cytokine soll mittels Luminex bestimmt werden.

Zur Durchführung dieser Versuchsreihe wurden mehrere Mausgruppen mit jeweils 5 Mäusen zusammengestellt (s. Tabelle 6). Alle Injektionen wurden subkutan vorgenommen, weil das Antigen dort von Langerhans'schen Zellen aufgenommen und auf eine sehr effiziente Weise direkt den lokalen Lymphknoten präsentiert wird. In den Gruppen 1 und 2 bzw. 3 und 4 sollen spezifische Effekte der enzymatisch aktiven VP1-*unique region* durch Vergleich mit ihrer enzymatisch inaktiven Mutante H153A beleuchtet werden. Zur Steigerung der Immunantwort wurden die Proteinlösungen im Falle der Gruppen 1 und 2 zusammen mit CFA als Immunadjuvants injiziert. Durch Zugabe des Adjuvants wird gelöstes Protein in partikuläre

Form gebracht, was ihre Aufnahme durch APC (z.B. Makrophagen) fördert. Ferner enthält CFA abgetötete Bakterien sowie bakterielle Produkte, welche die Immunantwort verstärken.

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5 (Negativ- kontrolle)	Gruppe 6	Gruppe 7 (Positiv- kontrolle)
<b>Injizierte Substanz</b>	VP1- <i>unique region</i>	Mutante H153A	VP1- <i>unique region</i>	Mutante H153A	PBS	PLA <sub>2</sub> aus Rinderpankreas	β2-GP1
<b>CFA</b>	+	+	-	-	-	-	+
<b>Tag -3</b>					Retroulbäre Blutabnahme (Nullseren)		Retroulbäre Blutabnahme (Nullseren)
<b>Tag 0</b>	50µg VP1n in 25µl PBS + 25µl CFA (= 50µl), in hintere Fußsohle	50µg H153A in 25µl PBS + 25µl CFA (=50µl), in hintere Fußsohle	50µg VP1n in 50µl PBS, in hintere Fußsohle	50µg H153A in 50µl PBS, in hintere Fußsohle	50µl PBS in hintere Fußsohle	25µg PLA <sub>2</sub> (aus Rinderpankreas) in 50µl PBS, in hintere Fußsohle	25µg b2-GPI in 25µl PBS + 25µl CFA (=50µl), in hintere Fußsohle
<b>Tag 10</b>	50µg VP1n in 50µl PBS, in zweite hintere Fußsohle	50µg H153A in 50µl PBS, in zweite hintere Fußsohle	50µg VP1n in 50µl PBS, in zweite hintere Fußsohle	50µg H153A in 50µl PBS, in zweite hintere Fußsohle	50µl PBS in zweite hintere Fußsohle	25µg PLA <sub>2</sub> (aus Rinderpankreas) in 50µl PBS, in zweite hintere Fußsohle	25µg b2-GPI in 50µl PBS, in zweite hintere Fußsohle
<b>Tag 20, 30 und 60</b>	Retroulbäre Blutabnahme	Retroulbäre Blutabnahme	Retroulbäre Blutabnahme	Retroulbäre Blutabnahme	Retroulbäre Blutabnahme	Retroulbäre Blutabnahme	Retroulbäre Blutabnahme
<b>Tag 105</b>	50µg VP1n in 50µl PBS, intraperitoneal				50µl PBS, intraperitoneal		
<b>Tag 120</b>	Retroulbäre Blutabnahme				Retroulbäre Blutabnahme		

**Tabelle 6: Schema zur Inokulation der Proteine in Mäuse.** Pro Gruppe wurden jeweils 5 Mäuse gespritzt. Eingesetzt wurden die aktive sowie eine inaktive Form der VP1-*unique region* (VP1n bzw. H153A), jeweils mit und ohne CFA. Als Kontrollen wurde den Mäuse PBS, Phospholipase A<sub>2</sub> aus Rinderpankreas bzw. β2-GP1 injiziert.

Die Gruppen 3 und 4 sollten Aufschluß über die Ausbildung von Immunantworten geben, ohne dass dabei eine Verstärkung durch CFA erfolgt. Während Gruppe 5 mit der Injektion von PBS eine Negativkontrolle darstellt, kann Gruppe 6 (PLA<sub>2</sub> aus Rinderpankreas) als zusätzliche Kontrolle Aufschluß über die Wirkung einer klassischen Phospholipase A<sub>2</sub> auf die Immunantwort geben. Mäuse der Gruppe 7, die mit humanem β2-GP1 inokuliert wurden, stellen hingegen die eigentliche Positivkontrolle für den Nachweis von Anti-Phospholipid-

Antikörpern dar. Es ist bekannt, dass humanes  $\beta$ 2-GP1 in der Maus zur Induktion des Anti-Phospholipid-Syndroms führt (Gharavi AE *et al.*, 1992). Der Einsatz von  $\beta$ 2-GP1 sollte zeigen, ob die hier untersuchten Mäuse grundsätzlich Anti-Phospholipid-Antikörper bilden können.

Durch die Entnahme von Blutproben an mehreren Tagen nach Injektion der Proteinlösungen soll der zeitliche Verlauf der Immunantworten verfolgt werden. Drei Tage vor der ersten Inokulation der Proteine in Mäuse wurden Seren der Tiere aus den Gruppen 5 und 7 entnommen. Diese werden im folgenden als Nullseren bezeichnet und dienen neben den Seren der Gruppe 5 als zusätzliche Negativkontrollen.

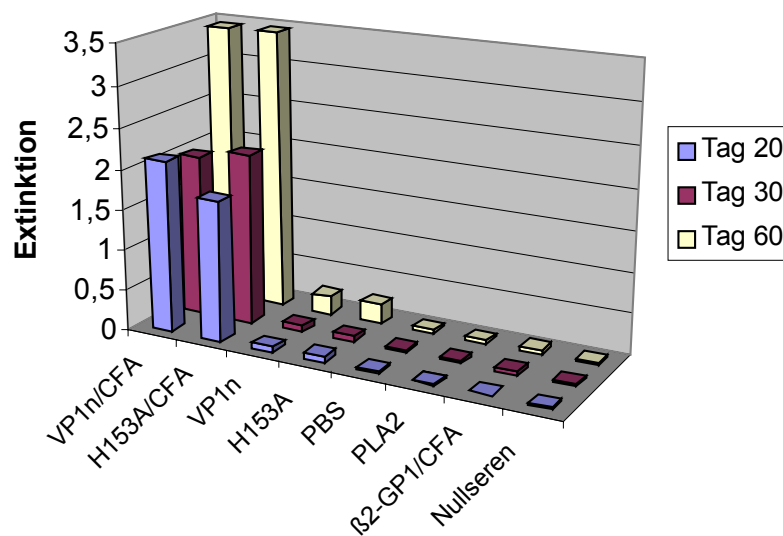
Die ersten Proteininjektionen wurden in allen Mausgruppen subkutan in die hintere Fußsohle verabreicht. Das Immunadjuvants CFA wurde bei entsprechenden Gruppen vor der Inokulation in die Mäuse für mehrere Minuten mit der jeweiligen Proteinlösung unter Verwendung eines Dreiwegehahn und zweier Glaspipette gemischt. Die Mäuse aller Gruppen wurden an Tag 10 erneut mit den jeweiligen Proteinlösungen, ohne CFA, in die zweite hintere Fußsohle inokuliert. Die Blutabnahmen bei sämtlichen Mäusen erfolgte retrobulbär an den Tagen 20, 30 und 60 nach der ersten Injektion unter kurzzeitiger Isofloran-Narkose.

Um zu prüfen, ob die Immunantwort durch erneute Inokulation der Mäuse mit der VP1-*unique region* weiter gesteigert werden kann, wurde den Tieren aus Gruppe 1 sowie aus Kontrollgruppe 5 an Tag 105 eine zweite Wiederholung-Injektion verabreicht. Die dadurch hervorgerufenen Effekte sollten in den an Tag 120 entnommenen Seren analysiert werden.

### **C.2.2.1. Nachweis proteinspezifischer Antikörper**

Vor der Durchführung der zum Nachweis von Antikörpern verwendeten ELISA-Tests war wegen der begrenzten Menge an Serum eine optimale Etablierung der Methodik nötig. Um geeignete Bedingungen für niedrige Hintergrundwerte, einen möglichst großen Unterschied zwischen Positiv- und Negativkontrolle und damit einen breiten Messbereich zu erreichen, wurden die dafür notwendigen Konzentrationen an Serum, Sekundärantikörper und Antigen getestet. Als optimal erwiesen sich 100 ng Protein pro Napf der ELISA-Platte sowie die Verdünnung der Seren und Sekundärantikörper in Verhältnissen von 1:100 bzw. 1:5000. Im Falle der Verwendung bereits beschichteter ELISA-Platten zum Nachweis von Anti-Phospholipid-Antikörpern erwies sich eine 1:100-Verdünnung der Seren sowie eine 1:50000-Verdünnung des Sekundärantikörpers als optimal.

Zur Testung der humoralen Immunantwort wurden die Mäuseren auf das Vorliegen von Antikörpern gegen die injizierten Proteine untersucht. Zum Nachweis von Antikörpern gegen die VP1-*unique region* und ihrer enzymatisch inaktiven Mutante H153A wurden *maxisorb* ELISA-Platten (*Fa. Nunc*) jeweils mit der VP1-*unique region* beschichtet. In vorausgehenden Experimenten ergab sich, dass Antikörper, die gegen die VP1-*unique region* bzw. die Mutante H153A gerichtet sind, das jeweils andere Antigen in gleicher Weise erkennen (nicht gezeigt). Deswegen wurde in allen Testen die Wildtypversion der VP1-*unique region* als Antigen verwendet. Zur Detektion von Antikörpern gegen die Phospholipase A<sub>2</sub> aus Rinderpankreas wurden ELISA-Platten entsprechend mit diesem Enzym als Antigen beschichtet.



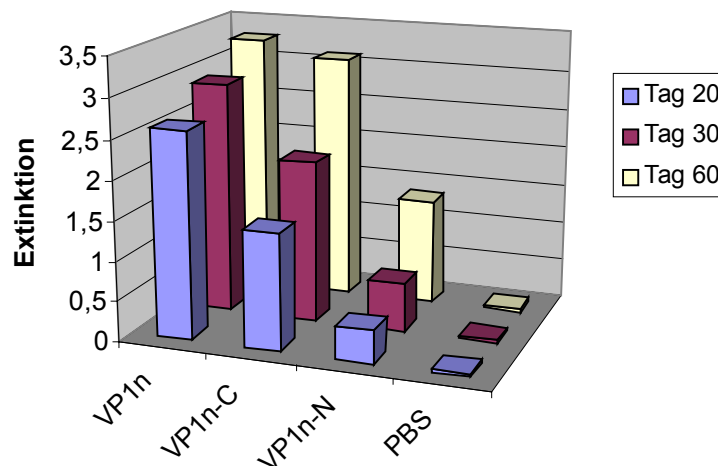
**Abbildung 16:** ELISA zum Nachweis von IgG-Antikörpern gegen die VP1-*unique region* in Mäuseren der Tage 20, 30 und 60 nach Erstinokulation mit den unterschiedlichen Proteinantigenen bzw. PBS. Die Platten wurden jeweils mit der VP1-*unique region* (100 ng/Napf) beschichtet und Seren von Mäusen der Gruppen 1-7 sowie Nullseren (im Diagramm unten angegeben) in einer 1:100-Verdünnung getestet. Die primären Antikörper wurden mit 1:5000-verdünnten HRP-gekoppelten Anti-Maus-IgG-Antikörpern nachgewiesen. Die Quantifizierung der Antikörperkomplexe erfolgte durch photometrischen Nachweis des durch die Peroxidase umgesetzten Substrates TMB bei 450 nm. Die Messwerte, die mit den einzelnen Serumproben erhalten wurden, wurden innerhalb der verschiedenen Gruppen zu jeweils einem Medianwert zusammengefasst.

Die Experimente zum Nachweis spezifischer IgG-Antikörper gegen die VP1-*unique region* zeigten, dass Mäuse, denen die VP1-*unique region* bzw. die enzymatisch inaktive Mutante H153A zusammen mit CFA verabreicht wurde, sehr hohe Antikörper-Titer gegen das jeweilige Protein aufweisen (s. Abb. 16). Die Inokulation der Proteine ohne CFA hatte in den Mäusen hingegen nur schwache Immunantworten zur Folge, die sich im Vergleich zu den

Gruppen 1 und 2 wesentlich später entwickelten (siehe Abb. 16, Tag 60). Das Vorkommen proteinspezifischer Antikörper nahm in allen Mäusen der Gruppen 1 bis 4 im zeitlichen Verlauf der Immunreaktionen zu. Die hier zu Vergleichszwecken und als Kontrollen dienenden Seren von Mäusen, die mit PBS und Phospholipase A<sub>2</sub> aus Rinderpankreas injiziert wurden, enthielten erwartungsgemäß keine gegen die *VP1-unique region* gerichteten Antikörper. Interessant ist jedoch, dass auch Seren von Mäusen der Gruppe 7, welche in hohem Maße Antikörper gegen  $\beta$ 2-GP1 enthalten (s. Abb. 18), keine Wechselwirkung mit der *VP1-unique region* zeigen. Während in Mäusen, denen die *VP1-unique region* ohne CFA verabreicht wurden, bis zu Tag 60 leicht zunehmende Mengen an gegen die *VP1-unique region* gerichtete Antikörper nachgewiesen wurden, zeigten Seren von Mäusen aus Gruppe 7, denen  $\beta$ 2-GP1 zusammen mit CFA injiziert wurde, stets mit der PBS-Kontrolle vergleichbare Werte. Dies spricht gegen strukturelle Ähnlichkeiten zwischen der *VP1-unique region* und  $\beta$ 2-GP1.

Antikörper gegen die Phospholipase A<sub>2</sub> aus Rinderpankreas konnten in keinem Serum nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Dies legt nahe, dass in Mäusen, die mit diesem Protein gespritzt wurden, keine proteinspezifische Immunantwort etabliert werden konnte. Dies liegt möglicherweise daran, dass die Phospholipase A<sub>2</sub> aus dem Rinderpankreas der mauseigenen sehr stark ähnelt und deshalb nicht als fremd erkannt wird. Eine Positivkontrolle war in diesem Fall nicht vorhanden, da keine Seren zur Verfügung standen, die mit Sicherheit Antikörper gegen die PLA<sub>2</sub> aus Rinderpankreas enthielten. Alle Mäuse der Gruppe 7 bilden hingegen Antikörper gegen das injizierte Protein  $\beta$ 2-GP1 (s. Abb. 18).

Im weiteren sollte untersucht werden, ob Antikörper gegen den C-terminalen Teil der VP1-*unique region* gerichtet sind, welcher das Phospholipase A<sub>2</sub>-ähnliche aktive Zentrum enthält. Hierfür wurden ELISA-Platten mit den N- und C-terminalen Hälften der VP1-*unique region* beschichtet. Seren von Mäusen der Gruppe 1, die mit der VP1-*unique region* zusammen mit CFA inokuliert worden waren, wurden auf das Vorliegen von spezifischen Antikörpern gegen die gesamte VP1-*unique region* bzw. gegen die aminoternale Hälfte (VP1n-N) und den carboxyterminalen Teil (VP1n-C) analysiert.



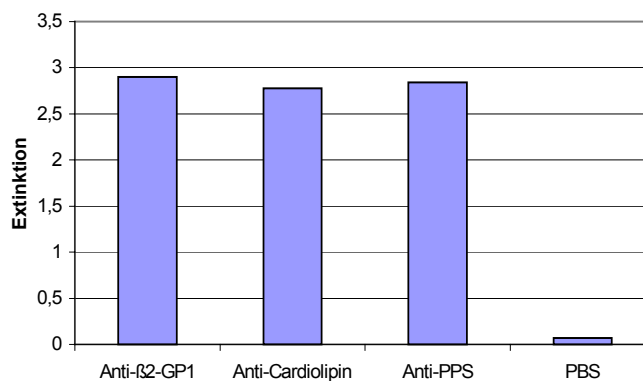
**Abbildung 17:** ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen den N- und C-terminalen Teil der VP1-*unique region* (VP1n-C bzw. VP1n-N) in an den Tagen 20, 30 und 60 entnommenen Seren der mit der VP1-*unique region* (VP1n) und CFA immunisierten Mäuse. Die ELISA-Platten wurden jeweils mit den im Diagramm unten angegebenen Proteinen beschichtet (100 ng/Napf) und Seren von Mäusen der Gruppen 1 und 5 in einer 1:100-Verdünnung getestet. Die primären Antikörper wurden mit 1:5000-verdünnten HRP-gekoppelten Anti-Maus-IgG-Antikörpern nachgewiesen. Die Quantifizierung der Reaktion erfolgte durch photometrischen Nachweis des durch die Peroxidase umgesetzten Substrats TMB bei einer Wellenlänge von 450 nm. Gezeigt sind die Mittelwerte von Seren der Tage 20, 30 und 60. Als Negativwerte wurden die Mittelwerte der PBS-Gruppe bei der Testung auf Antikörper gegen die VP1-*unique region* sowie ihren N- und C-terminalen Fragmenten angegeben, als Positivkontrolle dienten mit der VP1-*unique region* beschichtete ELISA-Platten.

Die Untersuchungen zeigten, dass in allen drei Proteinvarianten Regionen vorhanden sind, die von Antikörpern in den Mausseren erkannt werden (s. Abb. 17). Weiter lassen die Resultate erkennen, dass Antikörper vor allem gegen den C-terminalen Teil der VP1-*unique region*, welcher auch das PLA<sub>2</sub>-Motiv enthält, gebildet werden. Diese Beobachtungen bestätigten sich für alle Seren unabhängig vom Abnahmezeitraum, wobei jedoch eine mit der Zeit kontinuierlich ansteigende Menge an Antikörpern zu verzeichnen war. Analoge Ergebnisse wurden bei der Testung von Seren der mit der enzymatisch inaktiven Form der VP1-*unique region* inokulierten Mäuse (Gruppe 2) erzielt (nicht gezeigt).

### **C.2.2.2. Nachweis von Anti-Phospholipid-Antikörpern**

Neben der Immunreaktion gegen die Epitope der injizierten Antigene, musste eine zweite Antikörperreaktion untersucht werden: die Bildung von Autoantikörpern. Die Induktion von Anti- $\beta$ 2-GP1-Antikörpern in Gruppe 7 wird direkt durch das injizierte  $\beta$ 2-GP1 verursacht. Die Erzeugung von Anti- $\beta$ 2GP1-Antikörpern in den Gruppen 1-6 würde hingegen, wie auch die Induktion von Anti-Cardiolipin- und Anti-Phosphatidylserin-Antikörpern, über einen indirekten Weg ablaufen. Um Aufschluß darüber zu bekommen, inwieweit die unterschiedlichen, in die Mäuse inokulierten Proteine zur Induktion von Anti-Phospholipid-Antikörpern in der Lage sind, wurden die Mausseren auf Antikörper gegen  $\beta$ 2-GP1, Cardiolipin und Phosphatidylserin im ELISA getestet.

Hierfür wurden die Mausseren 1:100-verdünnt auf ELISA-Platten, die mit den Antigenen  $\beta$ 2-GP1, Cardiolipin bzw. Phosphatidylserin beschichtet waren, aufgetragen. Zur Detektion muriner Anti-Phospholipid-Antikörper fanden HRP-gekoppelte Anti-IgM/G-Sekundärantikörper in einer 1:50000-Verdünnung Verwendung. Diese speziellen Antikörper erkennen sowohl die schwere als auch die leichte Kette von IgG. Da alle Immunglobulinklassen die gleichen leichten Ketten (entweder  $\lambda$  oder  $\kappa$ ) aufweisen, gehen diese Sekundärantikörper neben IgGs auch Wechselwirkungen mit den für die frühe Immunantwort typischen IgMs ein.



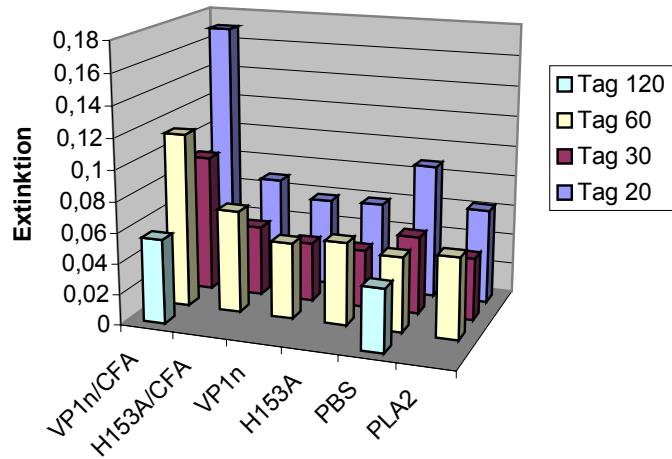
**Abbildung 18: ELISA zum Nachweis von Anti-Phospholipid-Antikörpern in Seren von Mäusen (Gruppe 7), denen  $\beta$ 2-GP1 zusammen mit CFA inokuliert wurde.** Beispielhaft sind hier die Mittelwerte von an Tag 20 gewonnenen Seren gezeigt. Die Mausseren wurden 1:100-verdünnt auf bereits mit den Antigenen  $\beta$ 2-GP1, Cardiolipin bzw. Phosphatidylserin beschichtete ELISA-Platten pipettiert. Als Sekundärantikörper kamen HRP-gekoppelte Anti-Maus-IgM/G-Antikörper in einer 1:50000-Verdünnung zum Einsatz. Die Peroxidase-katalysierte Umsetzung des Substrates TMB wurde photometrisch bei 450 nm ermittelt. Der Negativwert ergab sich aus den gemittelten Resultaten aller Messungen der PBS-Gruppe von Tag 20.

Die Inokulation von Mäusen aus Gruppe 7 mit  $\beta$ 2-GP1 und CFA hatte erwartungsgemäß zur Folge, dass Antikörper gegen  $\beta$ 2-GP1, Cardiolipin und Phosphatidylserin gebildet wurden (s. Abb. 18). Bereits in Seren, die 20 Tage nach der ersten Inokulation der Proteinlösungen entnommen worden waren, konnten hohe Titer an Anti-Phospholipid-Antikörpern nachgewiesen werden, Seren der Tage 30 und 60 enthielten ähnlich hohe Werte (nicht gezeigt). Dies bestätigt die von Blank M *et al.* (1994) beschriebenen Daten, dass die Inokulation von  $\beta$ 2-GP1 zur Bildung einer breiten Palette von Anti-Phospholipid-Antikörpern in Mäusen führt.

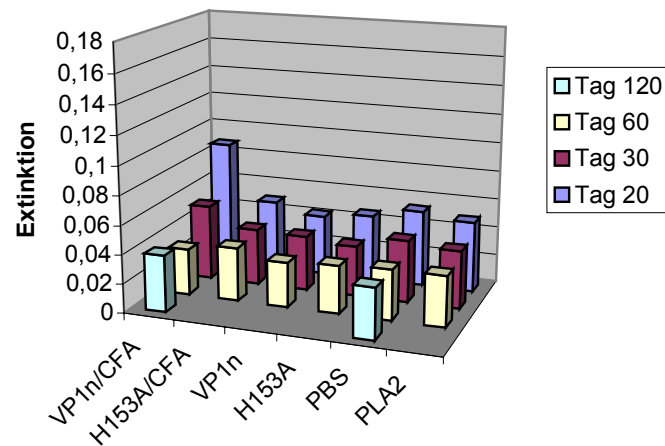
Die Untersuchung der Mausseren aus den Gruppen 1-6 wurde analog zur Testung der Mausgruppe 7 durchgeführt. Hierbei dienten die Seren der mit  $\beta$ 2-GP1 inokulierten Mäusen als qualitative Positivkontrolle des grundsätzlichen Funktionierens der ELISA-Tests. Anti- $\beta$ 2-GP1-Antikörper waren an Tag 20 in den mit der VP1-*unique region* zusammen mit CFA inokulierten Mäusen (Gruppe 1) im Gegensatz zu allen anderen Gruppen deutlich erhöht (s. Abb. 19.A). Dieser Befund konnte für Seren, die an den Tagen 30 und 60 entnommen wurden, bestätigt werden. Ebenso liegen erhöhte Werte für Anti-Cardiolipin-Antikörper in Seren der Mausgruppe 1 vor (s. Abb. 19.B), wobei hier im zeitlichen Verlauf der Immunantwort ein Rückgang bis auf das Niveau der PBS-Kontrolle zu verzeichnen war. Antikörper gegen Phosphatidylserin waren hingegen in sämtlichen Mausseren nicht detektierbar (s. Abb. 19.C). Die erneute Inokulation der VP1-*unique region* in Mäuse der Gruppe 1 (Tag 105 nach Erstinokulation) führte zu keinem Anstieg der  $\beta$ 2-GP1-spezifischen Antikörper (s. Tabelle 6 und Abb. 19 A-C). Es war hingegen eine weitere, leichte Abnahme zu verzeichnen. Auch Antikörper gegen die anderen Phospholipide wurden nicht gefunden. In einem ELISA-Test zum Nachweis zusätzlicher Anti-Phospholipid-Antikörper gegen Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylinositol konnten ebenfalls in keiner der Proben erhöhte Werte festgestellt werden (nicht gezeigt).

In den Seren der Gruppen 3 (VP1-*unique region* ohne CFA), 4 (Mutante H153A ohne CFA) und 6 (Phospholipase A<sub>2</sub> aus Rinderpankreas ohne CFA) konnten keine Antikörper gegen  $\beta$ 2-GP1, Cardiolipin und Phosphatidylserin nachgewiesen werden.

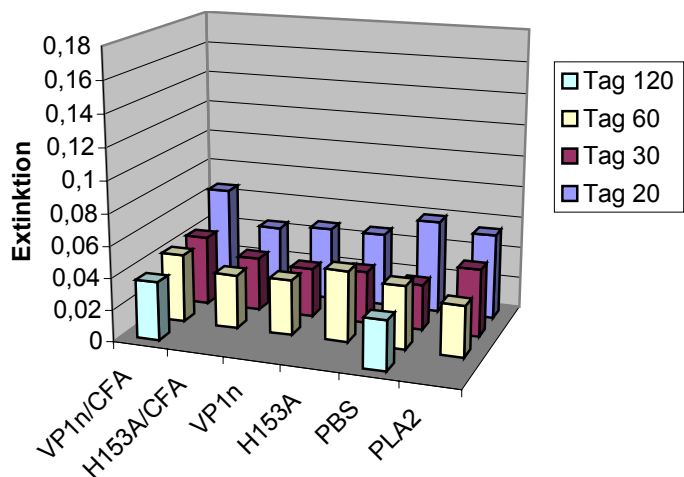
**Abbildung 19.A:**  
Nachweis von Anti- $\beta$ 2-GP1-  
Antikörper



**Abbildung 19.B:**  
Nachweis von Anti-  
Cardiolipin-Antikörper



**Abbildung 19.C:**  
Nachweis von Anti-  
Phosphatidylserin-  
Antikörper



**Abbildung 19:** ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen  $\beta$ 2-GP1 (19.A), Cardiolipin (19.B) und Phosphatidylserin (19.C) in Seren von Mäusen der Gruppen 1-6 an den Tagen 20, 30 und 60 nach Erstinokulation mit den unterschiedlichen Proteinantigenen bzw. PBS. Die Mausseren wurden 1:100-verdünnt auf bereits mit den Antigenen  $\beta$ 2-GP1, Cardiolipin bzw. Phosphatidylserin beschichteten ELISA-Platten gegeben. Als Sekundärantikörper kamen HRP-gekoppelte Anti-Maus-IgM/G-Antikörper in einer 1:50000-Verdünnung zum Einsatz, welche durch enzymatische Umsetzung des Substrates TMB eine photometrische Quantifizierung der Reaktion ermöglichten. In den Diagrammen sind unten die Proteine angegeben, mit denen die Mäuse der jeweiligen Gruppe inokuliert wurden. Die Ergebnisse von Proben der Tage 20 (blau), 30 (rot), 60 (gelb) und 120 (grün) sind als Medianwerte angegeben.

Indem die Ergebnisse aus den einzelnen Serumproben der verschiedenen Mausgruppen jeweils zusammengefasst als Median dargestellt sind, werden stark vom Durchschnitt abweichenden Einzelwerte nicht gewichtet und folglich als Ausreißer deklariert (s. Abb. 19). Angesichts der ansonsten sehr einheitlichen Messwerte scheint die Wahl dieses Lagemaßes im Gegensatz zur Berechnung des Mittelwertes sehr sinnvoll. Erhöhte Antikörperwerte gegen  $\beta$ 2-GP1, Cardiolipin und Phosphatidylserin, wie sie in jeweils einer Maus aus den Gruppen 2, 4 und 6 gefunden wurden, könnten ihre Ursache in bakteriellen Infektionen haben, welche mit der Bildung von Anti-Phospholipid-Antikörpern in Verbindung gebracht werden (Blank M *et al.*, 2002). Auch ist nicht auszuschließen, dass diese Mäuse bereits vor der Immunisierung Anti-Phospholipid-Antikörper besaßen oder ihre Bildung von den injizierten Proteinen herrührt.

Diese Ergebnisse lassen einige bemerkenswerte Schlüsse zu: Erstens konnte gezeigt werden, dass durch Inokulation der VP1-*unique region* in Mäuse unter bestimmten Bedingungen die Bildung von Antikörpern gegen  $\beta$ 2-GP1 sowie in geringeren Mengen auch von Antikörpern gegen Cardiolipin induziert werden. Zweitens lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass die Bildung der Anti-Phospholipid-Antikörper direkt auf die enzymatische Wirkung der viralen Phospholipase A<sub>2</sub> zurückgeht, da in allen Proben der Gruppe 1 (enzymatisch aktive VP1-*unique region* mit CFA) deutlich mehr Anti- $\beta$ 2-GP1-Antikörper gebildet werden als in Gruppe 2 (enzymatisch inaktive Mutante H153A mit CFA). Drittens zeigte sich, dass die Induktion von Anti-Phospholipid-Antikörpern neben der aktiven Phospholipase A<sub>2</sub>-ähnlichen Funktion auch von der Anwesenheit des Immunadjuvants CFA abhängt.

### **C.2.2.3. Nachweis von Cytokinen**

Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Phospholipase A<sub>2</sub>-ähnliche Aktivität der VP1-*unique region* an der Induktion von Anti- $\beta$ 2-GP1-Antikörper beteiligt ist. Unklar bleiben jedoch die dabei zu Grunde liegenden molekularen Prozesse.

Durch Verwendung einer relativ neuen Methode zur Quantifizierung von Cytokinen mittels Luminex (s. B.2.2.3.), sollte eine Palette 18 verschiedener Cytokine in den Seren der einzelnen Mäusegruppen untersucht werden und ihnen so ein bestimmtes Cytokinprofil zugeordnet werden, welches potentielle Effekte der Phospholipase A<sub>2</sub> aufdecken könnte. Der große Vorteil dieser Methode ist die Verwendung geringer Mengen an Serum, mit der eine ganze Bandbreite an Cytokinen untersucht und somit schnell ein umfassender Überblick über

das Cytokinprofil einer Immunantwort gewonnen werden kann. Nach Möglichkeit sollte eine Tendenz bezüglich der Art der durch die VP1-*unique region* ausgelösten Immunantwort gewonnen werden, indem die detektierten Cytokine in Gruppen eingeteilt werden: Cytokine, die typischerweise mit einer Phospholipase A<sub>2</sub>-Aktivität assoziiert werden (MCP-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ), solche die mit T<sub>h</sub>1- (IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-12) bzw. T<sub>h</sub>2-Immunantworten (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) in Verbindung stehen und schließlich typische, in entzündeten Geweben vorkommende Chemokine (MIP-1, MCP-1, RANTES, IL-8, KC) (Hernandez M *et al.*, 2001; Triggiani M *et al.*, 2000, 2002, 2003; Janeway CA *et al.*, 2001).

Eine Auswertung der Ergebnisse war nicht möglich, da die Cytokinwerte überwiegend unter der Detektionsgrenze lagen. Die Ursache der niedrigen Werte lag darin, dass die Proben unvermeidbar einmal eingefroren wurden, was eine Reduktion einiger Cytokine im Extremfall um bis zu 80% zur Folge haben kann (persönliche Mitteilung *Fa. Biorad*). Ferner konnten wegen der geringen, zur Verfügung stehenden Mengen der Mausseren nur 1:2,5-verdünnten Proben eingesetzt werden. Jedoch zeigte sich bei der Analyse von Humanseren, dass durch den Einsatz von 50  $\mu$ l unverdünnten Mausserums sehr gute Ergebnisse hätten erzielt werden können (s. Abschnitt C.3.2.). Dieses war in diesem Versuchsansatz jedoch nicht möglich. Deswegen sollten diese Werte erneut bestimmt werden, wobei eine größere Anzahl von Tieren mit dem Antigen inokuliert werden sollte, um so ausreichende Mengen an Serum zu gewinnen. Um maximale Effekte der viralen Phospholipase A<sub>2</sub>-ähnlichen Aktivität zu untersuchen, sollten in einem Folgeversuch bereits wenige Tage nach der ersten Inokulation der Proteine Blutproben entnommen und auf Cytokine hin untersucht werden.

### **C.2.3. Diskussion der Mausexperimente**

In den bisher beschriebenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die VP1-*unique region* ausschließlich mit der enzymatisch aktiven Phospholipase A<sub>2</sub>-ähnlichen Funktion und zusammen mit dem Immunadjuvants CFA in der Lage ist, in Mäusen die Bildung von Anti-Phospholipid-Antikörpern zu induzieren. In Seren von Mäusen, die mit der enzymatisch inaktiven Mutante H153A inokuliert wurden, konnten hingegen keine Anti-Phospholipid-Antikörper nachgewiesen werden.

Diese Beobachtung wirft die Frage auf, ob die VP1-*unique region* ihre Aktivität in einem lipidreichen Milieu, wie es durch die Anwesenheit von CFA gegeben ist, aufrechterhalten kann. Im PLA<sub>2</sub>-Enzymtest kann dies aus technischen Gründen nicht geprüft werden, da das lipidreiche CFA-Gemisch die Ergebnisse im Massenspektrometer zu stark beeinträchtigen

würde. Im Hinblick auf Enzyme, die wie Phospholipasen A<sub>2</sub> Lipide binden und Lipidmembranen als Substrat verwenden, ist es jedoch sehr wahrscheinlich, dass sie in Wasser/Öl-Emulsionen stabilisiert werden und ihre Aktivität auch in CFA erhalten bleibt. Beispielsweise wird die Enzymaktivität von Glucocerebrosidasen in lipidreichen Umgebungen wie anionischen Detergenzien oder Lipiden (z.B. Phosphatidylserin und Oleoyle Säuren) bis zu 30-fach gesteigert und auch für Ceramidasen sind anionische Lipide im Reaktionsgemisch für eine effiziente Hydrolyse notwendig (Wilkening G *et al.*, 1998; Linke T *et al.*, 2001). Deswegen kann davon ausgegangen werden, dass auch die VP1-*unique region* und die von ihr ausgehende Phospholipase A<sub>2</sub>-ähnliche Aktivität durch CFA nicht zerstört, sondern stabilisiert wurde.

Zusammenhänge zwischen Anti-Phospholipid-Antikörpern und Enzymaktivitäten wie Phospholipasen sind bis auf wenige Ausnahmen, wie z.B. bei der Erzeugung von Antikörpern gegen oxidierte Lipoproteine geringer Dichte, kaum bekannt (Wu R *et al.*, 1999). Da die Induktion von Autoantikörpern durch molekulare Mimikry in der Literatur sehr häufig diskutiert und auch die mögliche Bildung SLE-typischer Autoantikörper durch das Parvovirus B19 mit Kreuzreaktionen in Verbindung gebracht wird, soll auch in dieser Arbeit auf dieses Phänomen eingegangen werden (Lunardi C *et al.*, 1998).

Grundsätzlich ist es möglich, dass die VP1-*unique region* Sequenzhomologien zu  $\beta$ 2-GP1 besitzt, dadurch in der Lage ist, die Bildung von Anti- $\beta$ 2-GP1-Antikörpern und, wie auch  $\beta$ 2-GP1, anderer Anti-Phospholipid-Antikörper zu induzieren. In erster Linie wird ein spezielles Motiv in der fünften Domäne von  $\beta$ 2-GP1, einer Phospholipid-Bindedomäne, für die Induktion von Anti-Phospholipid-Antikörpern verantwortlich gemacht. Sie ist gekennzeichnet durch mehrere Lysine, die von hydrophoben Aminosäuren eingegrenzt sind. Synthetische Peptide, die das Motiv GDKVRSFFCKNKEKKC (GDKV) enthalten, können auf Grund ihrer positiven Ladungen an anionische Phospholipide binden und dadurch Antikörper gegen  $\beta$ 2-GP1, Cardiolipin und Phosphatidylserin induzieren (Gharavi EE *et al.*, 1999).

Im Falle der VP1-*unique region* konnte bei einem Sequenzvergleich (Swiss-Datenbank) keine Homologie zu  $\beta$ 2-GP1 oder ähnlichen Motiven gefunden werden, allein die bereits bekannte Sequenzhomologie zum aktiven Zentrum der Phospholipase A<sub>2</sub> fiel auf. Bei Sequenzvergleichen zwischen der VP1-*unique region*,  $\beta$ 2-GP1 und dem synthetischen Peptid GDKV mit dem Programm gcg zeigte sich keine Identität zwischen  $\beta$ 2-GP1 und der VP1-*unique region*, allerdings konnte wie erwartet eine Identität von 100% (über 13 Aminosäuren) zwischen  $\beta$ 2-GP1 und dem GDKV-Peptid gefunden werden. Die VP1-*unique region* und das

GDKV-Peptid waren zu 66,6% (über 6 Aminosäuren) homolog. Dieser, das Motiv VQFYEK umspannende Bereich (AS 24-29 im VP1-Protein), ist vermutlich nicht für die Induktion von Antikörpern gegen  $\beta$ 2-GP1 verantwortlich: Einerseits folgen diesem Abschnitt in der VP1-*unique region* keine weiteren Lysine, andererseits dürfte die negativ geladene Seitenkette der Aminosäure Glutamat (E) eine Wechselwirkung mit anionischen Phospholipiden verhindern. Zwar lieferte der direkte Sequenzvergleich keine Sequenzhomologien, allerdings wurden kreuzreagierende Proteinabschnitte in nur sehr wenigen Fällen über Sequenzalignments identifiziert (Karlsen AE und Dyrberg T, 1998). Meist ist eine ähnliche antigene Oberfläche für das Phänomen der molekularen Mimikry ausschlaggebend, weshalb zur genauen Prüfung homologer Abschnitte ein Vergleich der räumlichen Strukturen unabdingbar wäre. Diese ist für die VP1-*unique region* jedoch noch nicht bekannt.

Die Beobachtung, dass Mausseren der Gruppe 7 ( $\beta$ 2-GP1/CFA), welche nachweisbar hohe Titer an Anti- $\beta$ 2-GP1-Antikörpern enthalten (s. Abb. 18), keine Wechselwirkung mit der VP1-*unique region* eingehen (s. Abb. 16), spricht gegen eine strukturelle Ähnlichkeit zwischen  $\beta$ 2-GP1 und der VP1-*unique region* und macht damit auch eine durch Kreuzreaktionen verursachte Produktion von Anti- $\beta$ 2-GP1-Antikörpern in Mäusen der Gruppe 1 (VP1-*unique region*/CFA) unwahrscheinlich. Zudem führt die Substitution einer Aminosäure in der VP1-*unique region* zwar zum Verlust der Enzymaktivität, vermutlich jedoch nicht zu strukturellen Veränderungen, da die Erkennung der Mutante H153A durch Antikörper, die gegen die VP1-*unique region* gerichtet sind, in vollem Umfang erhalten bleibt (nicht gezeigt).

Die Anti-Phospholipid-Antikörper in Mäusen der Positivkontrolle wurden in hier beschriebenem Mausmodell durch die Inokulation mit humanem  $\beta$ 2-GP1 hervorgerufen (s. Abb. 18). Hierdurch werden neben Anti- $\beta$ 2-GP1-Antikörpern, welche menschliches wie murines  $\beta$ 2-GP1 erkennen, auch Antikörper gegen Cardiolipin und Phosphatidylserin gebildet (Gharavi AE *et al.*, 1992; Blank M *et al.*, 1994; Tincani A *et al.*, 2002). Dies zeigt, dass die Anwesenheit von  $\beta$ 2-GP1 und damit die Bildung von Anti- $\beta$ 2-GP1-Antikörpern der Induktion weiterer Anti-Phospholipid-Antikörper vorausgeht. Da aus Patienten isolierte Autoantikörper gegen Cardiolipin und Phosphatidylserin Wechselwirkungen mit  $\beta$ 2-GP1 eingehen, wird vermutet, dass  $\beta$ 2-GP1 die Bildung entsprechender Autoantikörper durch Bindung an die anionischen Lipide Cardiolipin und Phosphatidylserin induziert (McNeil HP *et al.*, 1990). Lipide wie Cardiolipin sind selbst schwach antigen, weshalb ihre Inokulation in Mäuse nicht

zur Produktion von Anti-Phospholipid-Antikörpern führt (Marcus DM *et al.*, 1976; Inoue K *et al.*, 1967).

Im hier vorliegenden Mausmodell stellt sich die Frage, weshalb in allen Proben nach Inokulation der enzymatisch aktiven VP1-*unique region* Anti- $\beta$ 2-GP1-Antikörper detektierbar sind, während Anti-Cardiolipin-Antikörper nur in geringen Mengen in Seren von Tag 20 und Antikörper gegen Phosphatidylserin nicht nachzuweisen waren. Der entscheidende Unterschied zu Mäusen der Gruppe 7 ( $\beta$ 2-GP1/CFA) ist die Tatsache, dass Anti- $\beta$ 2-GP1-Antikörper in Gruppe 1 (VP1-*unique region*/CFA) indirekt induziert wurden, während ihre Produktion in Gruppe 7 durch direkte Zugabe des entsprechenden Antigens hervorgerufen wurde. Somit ist  $\beta$ 2-GP1 in Mäusen der Gruppe 7 in nicht vergleichbar höherer Quantität im Blut vorhanden. Das Ausbleiben bzw. die geringen Konzentrationen weiterer Anti-Phospholipid-Antikörper dürfte in Gruppe 1 deshalb in erster Linie an den zu geringen Mengen des für ihre Bildung benötigten Co-Faktors  $\beta$ 2-GP1 liegen und das System vermutlich in diesem Schritt limitiert sein.

Ein weiterer Punkt soll hier in die Diskussion aufgenommen werden. Da die erhöhten Titer an Anti- $\beta$ 2-GP1-Antikörpern in Gruppe 1 nicht zwangsläufig Ursache erhöhter  $\beta$ 2-GP1-Werte sein müssen, stellt sich die Frage, wie die detektierten Anti- $\beta$ 2-GP1-Antikörper unabhängig von erhöhten Mengen des Cofaktors  $\beta$ 2-GP1 weitere Anti-Phospholipid-Antikörper hervorrufen können. Hier sei kurz auf die mögliche Bildung idiotypischer Antikörper hingewiesen. Denkbar ist, dass Anti-Anti- $\beta$ 2-GP1-Antikörper, die eine zu  $\beta$ 2-GP1 homologe Strukturdomäne besitzen, in ähnlicher Weise Kontakt zu Cardiolipin und Phosphatidylserin aufnehmen und so deren Erkennung als Fremdstoffe vermitteln (Shoenfeld Y, 1994; Whittingham S and Rowley M, 1997). Zur Annäherung an diese Fragestellung könnten monoklonale Antikörper gegen die VP1-*unique region* ein wichtiges Hilfsmittel darstellen (s. B.2.2.1.4.).

Bei Messungen der Proben aus Gruppe 1 wurden an Tag 20 die höchsten Werte an Anti- $\beta$ 2-GP1-Antikörpern verzeichnet und zudem, im Gegensatz zu Seren der Tage 30, 60 und auch 120, Anti-Cardiolipin-Antikörper detektiert (s. Abb. 19). Zudem sind Antikörper, die gegen den C-terminalen Teil der VP1-*unique region* gerichtet sind, bereits 20 Tage nach Inokulation der Proteine in den Mäusen detektierbar. Beide Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass die virale Phospholipase A<sub>2</sub>-Funktion bereits nach wenigen Tagen durch Komplexbildung mit Antikörpern inaktiviert wird. Hinzu kommt der natürliche Abbau der injizierten Proteine, die im Gegensatz zu persistierenden Virusinfektionen nicht ständig neu nachgebildet werden.

Folglich könnte die durch die virale Phospholipase A<sub>2</sub>-ähnliche Aktivität hervorgerufene Bildung von Anti-Phospholipid-Antikörpern in diesem System nur während einer kurzen Phase vom Zeitpunkt der Inokulation der Proteine in die Mäuse bis zur rasch einsetzenden Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen nach etwa 5 Tagen vor sich gehen (Murakami M *et al.*, 1990). Beispielsweise wird auch die Effizienz der durch Herpes simplex virus-1 hervorgerufenen stromalen Keratitis, welche von autoreaktiven T-Zellen herrührt, im Falle weiterer Wiederholung-Injektionen auf Grund bereits vorliegender neutralisierender Antikörper nicht mehr gesteigert (Zhao Z *et al.*, 1998). Zudem konnte in einem *in-vitro*-Experiment die Phospholipase A<sub>2</sub>-ähnliche Aktivität des Schweineparvovirus durch Zugabe von Antikörpern um mehr als 60% reduziert werden (Zadori Z *et al.*, 2001). Durch Viruseliminierung als Folge einer erfolgreichen Immunreaktion im Menschen dürfte auch im natürlichen System die Enzymaktivität schnell verloren gehen. Bei persistierenden Parvovirus B19-Infektionen können jedoch schwerere Symptome auftreten, die möglicherweise von einer unzureichenden humoralen Immunantwort und damit einer ständig aktiven Phospholipase A<sub>2</sub>-ähnlichen Funktion des Virus herrühren (Kurtzman GJ *et al.*, 1989a und b).

Ein weiterer Grund für die niedrigen Werte an Anti-Phospholipid-Antikörpern kann darauf beruhen, dass das Parvovirus B19 ausschließlich humanpathogen ist. Die im Menschen noch nicht geklärten Effekte der viralen Phospholipase A<sub>2</sub> könnten in der Maus möglicherweise weniger stark ausgeprägt sein. Ferner ist anzumerken, dass Anti-Phospholipid-Antikörper nur bei persistierenden B19-Infektionen auftreten und sich vermutlich erst im Zusammenspiel mit bisher unbekanntem Faktoren einer Grunderkrankung manifestieren. Im Gegensatz dazu ist die Phospholipase A<sub>2</sub> im vorliegenden Modell vermutlich nur kurzzeitig aktiv. Auch Infektionszyklus und Pathogenese werden in diesem Modell nicht berücksichtigt. So wäre vorstellbar, dass inflammatorische Reaktionen und Anti-Phospholipid-Antikörper erst durch die lokale Ansammlung viraler Partikel in den Gelenkspalten bzw. durch Reaktivierung latenter Viren im entzündeten Gewebe in erhöhtem Maße induziert werden. Zwar wurde den Mäusen ein Überschuss an VP1-*unique region* injiziert, allerdings verteilt sich das Protein in der Blutbahn, während Viruspartikel in den Gelenken über längere Zeiträume detektierbar sind (Lehmann HW *et al.*, 2003).

Wenngleich in hier beschriebenen Mausmodell bisher nur niedrige Werte an Anti-Phospholipid-Antikörpern detektiert wurden, liefert es Ansatzpunkte für viele Fragen, die zur Aufklärung der molekularen Grundlagen Parvovirus B19-vermittelter

Autoimmunerkrankungen essentiell sind. Die Annahme, dass der VP1-*unique region* das Potential innelegt, unter anderen Bedingungen größere Mengen an Antikörper gegen  $\beta$ 2-GP1, Cardiolipin und Phosphatidylserin hervorzurufen, macht es zu einem wertvollen Modell für zukünftige Projekte. Möglicherweise ruft die virale Phospholipase A<sub>2</sub> erst bei einem allgemein stimulierten Immunsystem, beispielsweise während einer vorliegenden Grunderkrankung wie SLE, bei unzureichender Immunabwehr in immunsupprimierten Wirten oder im Falle persistierender Virusinfektionen vielfältigere Symptome hervor. Die Blockierung der viralen Enzymaktivität durch im Zuge einer humoralen Immunantwort gebildeten Antikörper könnte ebenfalls eine entscheidende Rolle spielen.

Es ist anzunehmen, dass der Bildung von Anti-Phospholipid-Antikörpern ein komplexes Netzwerk zu Grunde liegt. Die im folgenden durchgeführte Analyse von Cytokinen in humanen Seren und Synovialflüssigkeiten von teils mit Parvovirus B19 infizierten Rheumapatienten könnte bisher aufgezeigte Tendenzen in einem breiteren Rahmen weiterführen.

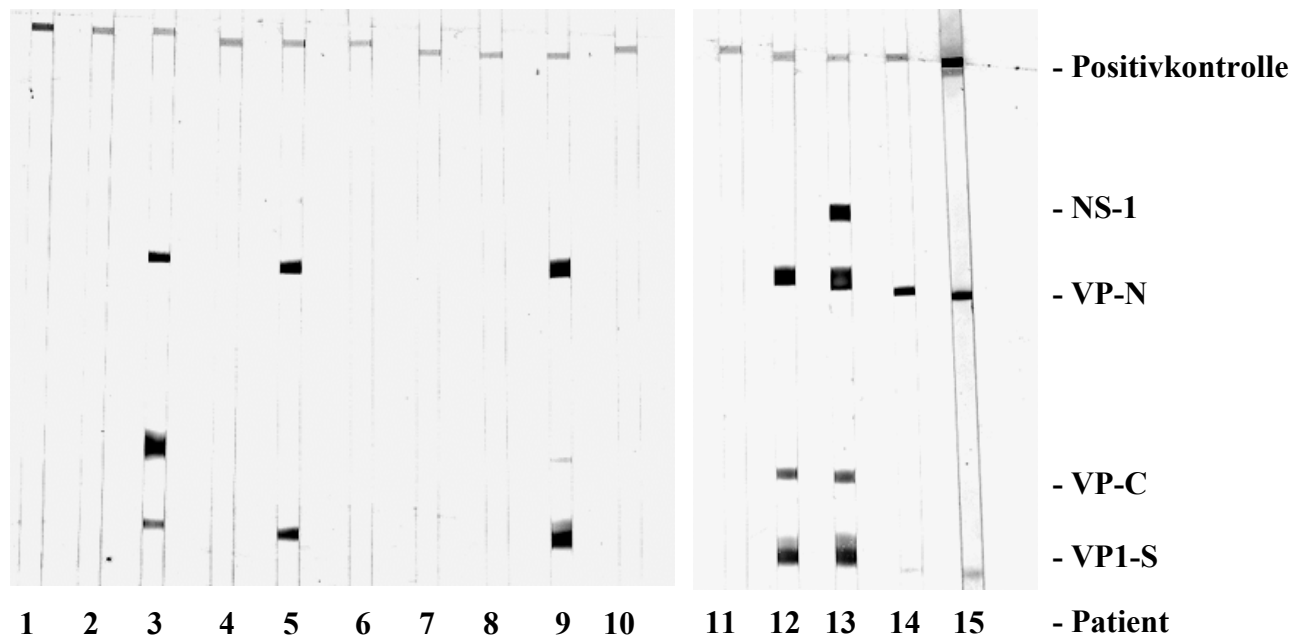
### **C.3. Untersuchung der antigenen Eigenschaften von Parvovirus B19 in Rheumapatienten**

Um ein detaillierteres Bild über die Ursache rheumatischer Erkrankungen zu bekommen, sollen Seren und Synovialflüssigkeiten von Kindern, die an unterschiedlichen, sehr schweren Ausprägungen juveniler idioplastischer Arthritis leiden, hinsichtlich einer Reihe von Cytokinen untersucht werden. Einerseits könnte dies Aufschlüsse über die Art der ablaufenden Immunantwort geben, andererseits dienen die Messungen zu Vergleichszwecken mit noch zu messenden Mauscytokinen des in Abschnitt C.2. beschriebenen Tiermodells. Die zusätzliche Untersuchung der humanen Proben hinsichtlich Parvovirus B19-spezifischer Antikörper sowie parvoviraler DNA sollte dabei eine mehrfach beschriebene Assoziation zwischen Parvovirus B19 und rheumatischen Erkrankungen prüfen und ein mögliches virusspezifisches Cytokinmuster aufdecken.

#### **C.3.1. Charakterisierung des Infektionsstatus**

Zur Einstufung des Infektionsstatus der Rheumapatienten wurden die Seren und Gelenkflüssigkeiten hinsichtlich parvoviraler DNA mittels quantitativer *real-time* PCR (Taqman) untersucht (s. Abb. 11). Hierfür wurden jeweils 20 µl unverdünnter Seren und Gelenkflüssigkeiten eingesetzt und Dreifachbestimmungen durchgeführt. Bei Titern über 100 Genomäquivalenten pro ml wurden die Proben als positiv gewertet. Der Test ermöglicht es, ein einzelnes bis zu  $5 \cdot 10^7$  Genomäquivalente pro Reaktion zu detektieren (Knöll A *et al.*, 2002).

Der nach dem Prinzip eines Western Blots funktionierende *recomBlot* (Fa. Mikrogen) bietet eine sehr effiziente Methode, um die Anwesenheit Parvovirus B19-spezifischer Antikörper in den Seren zu untersuchen. In Abbildung 20 sind die Seren von 15 Rheumapatienten hinsichtlich der Erkennung verschiedener parvoviraler Proteinabschnitte dargestellt. Bezüglich Antikörpern gegen VP1S, das der VP1-*unique region* entspricht, und VP-N, das den N-terminalen Teil von VP1 sowie einen kurzen Abschnitt von VP2 einschließt, wurden jeweils identische Ergebnisse gemessen, was für das Erkennen eines VP1-spezifischen Epitops spricht (s. Abb. 9). Der Übersicht halber werden diese Ergebnisse deshalb zusammengefasst als Anti-VP1-Antikörper deklariert. Die Erkennung von VP-C erfolgt durch VP2-spezifische Antikörper. Zusammen mit den Resultaten der *real-time* PCR erlauben die *recomBlot*-Ergebnisse eine Einstufung der Patienten in abgelaufene, akute und chronische B19-Infektionen sowie Virus-negative Patienten (s. Tabelle 7).



**Abbildung 20: Nachweis B19-spezifischer Antikörper in den Seren von 15 Rheumapatienten mittels *recomBlot*.** Die verwendeten Teststreifen enthalten aufgetrennte, Parvovirus B19-spezifische Antigene. Nach dem Prinzip einer Western Blot-Färbung können spezifische Antikörper gegen das NS1-Protein (NS-1), gegen die Strukturproteine VP1 (VP-1S) und VP2 (VP-C) sowie gegen einen beide Strukturproteine umfassenden Abschnitt (VP-N) nachgewiesen werden. In den Test wurden je 20 µl unverdünntes Humanserum eingesetzt, die Detektion der virusspezifischen Antikörper erfolgte mit HRP-gekoppelten Antikörpern gegen menschliches IgG. Die Banden wurden durch Zugabe von TMB-Substratlösung sichtbar gemacht.

Bei den in Tabelle 7 aufgeführten Krankheitsbildern handelt es sich um Formen juveniler idioblastischer Arthritis, welche bei ca. 1 von 1000 Kindern unter 16 Jahren auftreten (Minden K, Internet-Vortrag, HELIOS-Klinikum Berlin). Dieser Sammelbegriff umfasst die Erkrankungen Oligoarthritis (50%), Rheumafaktor (RF)-negative Polyarthritis (10-15%), RF-positive Polyarthritis (3-5%), Arthritis mit Enthesitis (10-15%), systemische Arthritis (7-10%) und Psoriasisarthritis (5-10%). Bei allen hier untersuchten Kindern lagen derart ernste Beschwerden vor, dass Gelenkflüssigkeit punktiert werden musste.

Patient	Erkrankung	B19-DNA ( <i>TaqMan</i> )		B19-AK ( <i>recomBlot</i> )			Infektionsstatus
		Serum	Synovialflüssigkeit	NS-1	VP-1	VP-2	
P1	Oligo/Polyarthritis	neg	neg	neg	neg	neg	<b>Negativ</b>
P2	?	neg	neg	neg	neg	neg	<b>Negativ</b>
P3	Oligoarthritis	neg	neg	neg	<b>pos</b>	<b>pos</b>	<b>Chronisch<sup>#</sup></b>
P4	Reaktive Arthritis/ Chlamydieninfektion	neg	neg	neg	neg	neg	<b>Negativ</b>
P5	chronische entzündliche Darmerkrankung und Arthritis	<b>pos</b>	<b>pos</b>	<b>pos</b>	<b>pos</b>	neg	<b>Chronisch</b>
P6	Polyarthritis	neg	neg	neg	neg	neg	<b>Negativ</b>
P7	Oligoarthritis/Uveitis	neg	neg	neg	neg	neg	<b>Negativ</b>
P8	?	neg	neg	neg	neg	neg	<b>Negativ</b>
P9	Juvenile idiopath. Arthritis	<b>pos</b>	<b>pos</b>	neg	<b>pos</b>	<b>pos</b>	<b>Chronisch</b>
P10	?	neg	neg	neg	neg	neg	<b>Negativ</b>
P11	Oligoarthritis	neg	neg	neg	neg	neg	<b>Negativ</b>
P12	?	neg	neg	neg	<b>pos</b>	<b>pos</b>	<b>Abgelaufen</b>
P13	RF+-Polyarthritis	neg	N.D.	<b>pos</b>	<b>pos</b>	<b>pos</b>	<b>Abgelaufen</b>
P14	Polyarthritis/System.	neg	N.D.	neg	<b>pos</b>	neg	<b>Abgelaufen</b>
P15	Borreliose-Arthritis	<b>pos</b>	neg	neg	<b>pos</b>	neg	<b>Chronisch</b>

**Tabelle 7: Übersicht zur Zuordnung des Infektionstyps der Patienten.** Zusammenfassend sind die klinisch diagnostizierte Erkrankung der Patienten, welche in einigen Fällen nicht klar ermittelt werden konnte, sowie die Anwesenheit parvoviraler DNA in Serum bzw. Gelenkflüssigkeit und B19-spezifischer Antikörper dargestellt. In der rechten Spalte werden die Patienten in negative, abgelaufene und chronische B19-Infektionen eingeteilt. <sup>#</sup>Patient 3 war in früheren Proben wiederholt B19-DNA positiv.

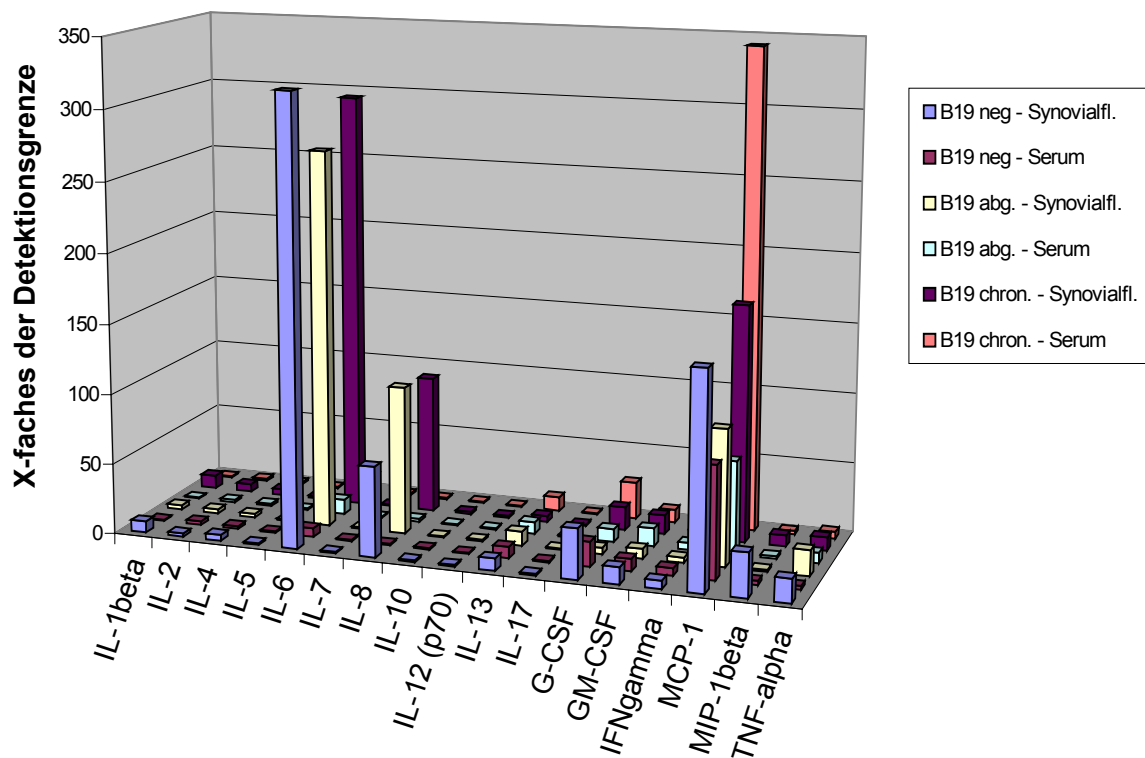
Bei der Untersuchung der 15 Rheumapatienten stellte sich heraus, dass vier Kinder (P3, P5, P9 und P15) chronisch mit Parvovirus B19 infiziert sind, drei weitere (P12, P13 und P14) hatten bereits Kontakt mit dem Virus. Das Vorhandensein B19-spezifischer Antikörper zusammen mit den negativen TaqMan-Ergebnissen deutet bei letzteren auf eine abgelaufene Infektion hin. Im Vergleich zu Kontrollseren von 124 Kindern in einer Studie von Lehmann HW *et al.* (2002) zeigen die hier beschriebenen Ergebnisse eine erhöhte Anzahl an chronisch infizierten Patienten mit nachweisbarer B19-DNA (26,6% zu 7%), während die Anwesenheit von Antikörpern gegen die parvoviralen Proteine VP1/2 (47% zu 52%) und NS-1 (13,3% zu 22%) leicht unter dem allgemeinen Durchschnitt liegt. Die vermutete Assoziation zwischen persistierendem Parvovirus B19 und juveniler idioblastischer Arthritis konnte somit bestätigt werden.

### **C.3.2. Nachweis von Cytokinen**

Zur Untersuchung des Cytokinmusters in den Seren und Synovialflüssigkeiten der Rheumapatienten, wurden die Proben nach nur einmaligen Einfrieren und Auftauen direkt mittels Luminex (*Bio-Plex Cytokine Assay, Fa. Bio-Rad, München*) analysiert (siehe B.2.2.3.). Hierzu wurden 50 µl je Proben unverdünnt mit Polystyrenperlen zusammengegeben, an die für das jeweilige Cytokin spezifische Antikörper gekoppelt sind. Zudem waren die Perlen jeweils mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, wodurch eine Unterscheidung der zu detektierenden Cytokine möglich ist. Die durch die Antikörper auf der Oberfläche der Perlen gebundenen Cytokine werden mit einem biotinylierten, gegen ein weiteres Epitop des jeweiligen Cytokins gerichteten Sekundärantikörpers nachgewiesen. Die Quantifizierung der Komplexe wird unter Verwendung eines weiteren Fluoreszenzfarbstoffes, Phycoerythrin, ermöglicht. Dieser ist durch Kopplung an Streptavidin in der Lage, mit Biotin zu wechselwirken. Im *Bio-Plex Array Reader* (Luminex) wurden die Perlen schließlich einzeln von zwei, den Wellenlängen der Fluoreszenzfarbstoffen entsprechenden Lasern abgetastet und ausgewertet. Auf eine Behandlung der teilweise etwas zähen Gelenkflüssigkeiten mit Hyaluronidase bei einer Temperatur von 37 °C wurde verzichtet, da dies die Stabilität der Cytokine vermutlich zu stark beeinträchtigen würde.

Um typische Cytokinmuster eines bestimmten Parvovirus B19-Infektionsstatus zu ermitteln, wurden die Patienten in drei Gruppen eingeteilt: Virus-negative Patienten (P1, 2, 4, 6, 7, 8, 10 und 11) sowie Patienten mit abgelaufener (P12, 13 und 14) bzw. chronischer Infektion (P3, 5, 9 und 15). Zusätzlich wurde zwischen Seren und Gelenkflüssigkeiten unterschieden.

In den Gelenkflüssigkeiten aller Patientengruppen waren inflammatorische Cytokine (IL-6) und Chemokine (IL-8, MCP-1) stark erhöht (s. Abb. 21). Zudem zeigten sich in allen Gruppen erhöhte Werte an IL-1 $\beta$ , IL-13, TNF- $\alpha$ , G-CSF und GM-CSF. Die erhöhten Cytokinwerte waren fast ausschließlich in den Synovialflüssigkeiten, also den Orten der Entzündungsreaktionen vorzufinden, während die jeweiligen Cytokinkonzentrationen in den Seren allgemein niedriger sind. Ausnahmen stellen hierbei die Cytokine IL-13, G-CSF, GM-CSF und MCP-1 dar, die bei Patienten mit chronischen B19-Infektionen in gleichem, im Falle von MCP-1 in deutlich erhöhtem Maße auch im Serum vorliegen. Eine Verallgemeinerung dieser Tendenz ist auf Grund der geringen Anzahl untersuchter Patienten jedoch nicht möglich. Cytokine, die mit T<sub>h</sub>2-Immunantworten (IL-4, IL-5) in Verbindung gebracht werden, konnten nicht nachgewiesen werden, für die T<sub>h</sub>1-typischen Cytokine IL-2 und IFN- $\gamma$  waren niedrige Werte detektierbar.



**Abbildung 21: Cytokinprofile in Seren und Synovialflüssigkeiten von Rheumapatienten.** Die Patienten wurden in Gruppen mit gleichem Infektionsstatus zusammengefasst: B19-negative sowie abgelaufene und chronische B19-Infektionen. Bei der Darstellung der Cytokinwerte wurde zusätzlich zwischen Seren und Synovialflüssigkeiten unterschieden (in Legende farblich dargestellt). Zur Ermittlung der Cytokinwerte mittels Luminex wurden je 50 µl unverdünnter Proben eingesetzt. Die Ergebnisse wurden als X-faches der für jedes Cytokin leicht variierenden Nachweisgrenze aufgetragen.

### C.3.3. Diskussion der Experimente

Die Untersuchung der Seren und Gelenkflüssigkeiten von Kindern mit juveniler idioplastischer Arthritis brachte mit erhöhten Werten an IL-6, IL-8, MCP-1, MIP-1β, IL-1β, TNF-α, G-CSF und GM-CSF ein deutlich inflammatorisches Muster zum Vorschein. Die gleichzeitig geringen Werte der T-Zell-typischen Cytokine IL-2, IFN-γ, IL-4 und IL-5 zeigen, dass die rheumatischen Erkrankungen möglicherweise von pro-inflammatorischen Cytokinen induziert oder aufrechterhalten werden, während humorale Immunreaktionen nur in sehr geringem Umfang stattfinden. Geringe Mengen T-Zell-typischer Cytokine bei gleichzeitig hohen Werten an Produkten von Makrophagen und Fibroblasten wurde in Rheumapatienten bereits sehr früh vermutet, der hier gezeigte Überblick fasst jedoch beide Tendenzen zusammen und erweitert das bisher bekannte Spektrum an untersuchten Cytokinen (Harigai M *et al.*, 1993; Firestein GS *et al.*, 1990 und 2003).

Die Cytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6 zeigen ein sehr weites Spektrum an Aktivitäten, welche allgemein die körpereigene Antwort bei Infektionen koordinieren: die Freisetzung von Akut-Phase-Proteinen aus der Leber und der damit einhergehenden Aktivierung des Komplementsystems, die Mobilisierung von Neutrophilen, die TNF- $\alpha$ -vermittelte Stimulierung dendritischer Zellen und schließlich die Erhöhung der Körpertemperatur. Die Chemokine G-CSF und GM-CSF spielen eine wichtige Rolle bei der Hematopoiese und fördern maßgeblich die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Neutrophilen, Monozyten und dendritischen Zellen.

In den meisten Fällen sind die Entzündungsreaktionen bei juveniler idioblastischer Arthritis auf spezielle Gewebe begrenzt. Am Prozess des Eintritts entzündungsfördernder Zellen und T-Lymphozyten in die Gewebe sind viele der hier exprimierten Cytokine beteiligt. TNF- $\alpha$  ist an der Hochregulierung von P- und E-Selektinen beteiligt, welche Leukozyten durch Erkennung der Sialyl-Lewis<sup>X</sup>-Domäne abbremsen. Die anschließende Präsentation von Bindungspartnern für Integrine auf der Leukocytenoberfläche wird ebenfalls durch TNF- $\alpha$  bewirkt. Zudem kann IL-13, welches in den Synovialflüssigkeiten der meisten Patienten erhöht ist, die Expression von VCAM-1 und CC-Chemokinen stimulieren (Sundy JS *et al.*, 1999). IL-8 wird direkt von den Makrophagen, die sich bereits am Infektionsherd befinden, sezerniert und bindet von dort aus an Proteoglykane der extrazellulären Matrix. Dadurch bilden sie einen Matrix-assoziierten Konzentrationsgradienten aus, an dem Leukocyten entlangwandern und so in das Gewebe eintreten können. Auf die gleiche Weise werden zeitlich etwas versetzt Monozyten und Gedächtniszellen durch die Wirkung des Chemokins MCP-1 an den Ort der Entzündung gelotst.

Neben MCP-1 und IL-8 konnten die CC-Chemokine MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  und RANTES sowie die CXC-Chemokine ENA-78, MIG und IP-10 in Patienten mit rheumatischer Arthritis detektiert werden (Patel DD *et al.*, 2001; Kraan MC *et al.*, 2001; Hayashida K *et al.*, 2001; Olszewski WL *et al.*, 2001; Katrib A *et al.*, 2001). Viele Monozyten aus dem peripheren Blut und CD4<sup>+</sup>-Gedächtniszellen präsentieren CC- und CXC-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, welche es ihnen erlauben, an den Großteil der obigen Chemokine zu binden und in entzündete Gewebe einzuwandern (Hayashida K *et al.*, 2001; Katschke KJ Jr *et al.*, 2001). CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aus den Gelenken zeigen dabei in höherem Maße Rezeptoren, die RA-typische Chemokine binden können, als zirkulierende CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (Garcia-Lopez MA *et al.*, 2001; Kim CA *et al.*, 2001).

Da MCP-1 vermutlich eine sehr zentrale Rolle in RA spielt und zudem besonders in den Seren chronisch mit Parvovirus B19-infizierter Rheumapatienten stark erhöhte Werte zeigt,

könnte es als Marker für den Verlauf inflammatorischer Gelenkentzündungen fungieren (Ellingsen T *et al.*, 2001). Interessant ist zudem, dass Ratten, die an einer RA-analogen Krankheit leiden (*AIA, adjuvant-induced arthritis*), ein sehr ähnliches Cytokinprofil (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, MIP-1 $\alpha$  und MCP-1) wie die hier untersuchten Patienten aufweisen (Szekanecz Z *et al.*, 2000).

#### **C.4. Parvovirus B19 in Inflammation und Autoimmunerkrankungen**

Hinter den Krankheitsbildern der rheumatischen Arthritis sowie anderer Autoimmunerkrankungen verbirgt sich ein komplexes Netzwerk aus genetischen Faktoren, zeitgleichen Erkrankungen sowie dem Immunstatus des Patienten. Das Parvovirus B19 wird mit einer Reihe derartiger Krankheiten (RA, APS und SLE) in Verbindung gebracht, seine funktionelle Beteiligung an der Pathogenese ist jedoch noch unklar. Aufbauend auf Ergebnissen dieser Diplomarbeit können einige Hypothesen aufgestellt bzw. bestätigt werden und das Parvovirus B19 mit seiner Phospholipase A<sub>2</sub>-Aktivität an mehreren Stellen des an der Entstehung der Erkrankungen zugrundeliegenden Netzwerks integriert werden.

Die Testung der parvoviralen Phospholipase A<sub>2</sub>-ähnlichen Aktivität in einem *in-vitro* PLA<sub>2</sub>-Test ergab Werte, die etwa in der Größenordnung der eukaryotischen Phospholipase A<sub>2</sub> aus Rinderpankreas liegen (s. Tabelle 5). Die virale Phospholipase A<sub>2</sub> ist vermutlich auch *in vivo* enzymatisch aktiv und dürfte durch Herstellung von Arachidonsäure entzündungsfördernde Produkte wie Prostaglandine, Leukotriene und Thromboxane hervorrufen (s. Abb. 7 und Abb. 15). In Analogie zu anderen eukaryotischen Phospholipasen A<sub>2</sub> könnte sie die Etablierung eines inflammatorischen Cytokinmilieus bewirken:

Die körpereigene sekretorische Phospholipase A<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>), ein Akut-Phase-Protein, bindet an Monozyten, aktiviert hierdurch die MAPK-Kaskade und fördert so die Freisetzung von MCP-1 (Hernandez M *et al.*, 2001). Auf gleiche Weise erfolgt die Phospholipase A<sub>2</sub>-vermittelte Sekretion von IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  aus Eosinophilen und Monozyten über einen Arachidonsäure-unabhängigen Prozess (Triggiani M *et al.*, 2000, 2002 und 2003). IL-6 und TNF- $\alpha$  sind wiederum in der Lage, wie auch IL-1, die Freisetzung von Gruppe IIA sPLA<sub>2</sub> zu induzieren (Crowl RM *et al.*, 1991). Proinflammatorische Cytokine und sPLA<sub>2</sub> können sich folglich gegenseitig hochregulieren. Ferner spielen cytosolische Phospholipasen A<sub>2</sub> bzw. ihre Reaktionsprodukte (Arachidonsäure, Lysophosphatidylcholin) bei der chemotaktischen

Wanderung von Monocyten entlang des MCP-1-Gradienten eine essentielle Rolle (Carnevale KA *et al.*, 2001; Locati M *et al.*, 1996; Rollins BJ, 1996). Die Beteiligung der parvoviralen Phospholipase A<sub>2</sub>-Aktivität an derartigen Prozessen ist noch unklar. Vorstellbar ist jedoch, dass sie ein sehr ähnliches Cytokinprofil hervorruft wie sPLA<sub>2</sub> und ihr somit ein entzündungsfördernder Effekt zukommt. Dabei muss die Rolle des parvoviralen Nichtstrukturproteins NS1 berücksichtigt werden, welches durch direkte Interaktion mit zellulären Promotoren die Expression der Cytokine IL-6 und TNF- $\alpha$  stimuliert. Das durch die virale Phospholipase A<sub>2</sub> hervorgerufene Cytokinprofil könnte jedoch in unter Abschnitt C.2. beschriebenen Mausmodell in weiteren Experimenten unabhängig von NS-1 geprüft werden. Ferner stützen direkte Zusammenhänge zwischen erhöhten Phospholipase A<sub>2</sub>-Konzentrationen und Arthritiden die Vermutung, dass auch die VP1-*unique region* bei der Induktion und Aufrechterhaltung von RA und anderen Autoimmunerkrankungen beteiligt ist (Pruzanski W *et al.*, 1988; Murakami M *et al.*, 1990; Bomalaski JS *et al.*, 1993).

Die durch Phospholipasen A<sub>2</sub> stimulierte Freisetzung von Cytokinen und Chemokinen könnte den Eintritt von Monozyten und autoreaktiven T-Lymphozyten, darunter auch Gedächtniszellen, in entzündete Gewebe ohne Beteiligung eines spezifischen Antigens ermöglichen (Firestein GS, 2003). Mit dem Einwandern anergischer, potentiell autoreaktiver T-Lymphozyten in Inflammationsherde, könnten diese aus verschiedenen Gründen aktiviert werden: Einerseits besteht die Möglichkeit, dass die Suppression dieser Zellen durch inhibitorische Cytokine im veränderten Cytokinmilieu der entzündeten Gelenke wegfällt. Andererseits könnten inflammatorische Cytokine die Präsentation von Co-Stimulatoren auf Antigen-präsentierenden Zellen bewirken und dadurch unspezifisch anergische T-Zellen reaktivieren. In beiden Fällen spielt der genetische Hintergrund eine maßgebliche Rolle. So kommen bestimmte Allele von MHC-Molekülen, welche allgemein bei der Unterscheidung zwischen Selbst und Fremd maßgeblich beteiligt sind, in einigen Autoimmunerkrankungen häufiger vor.

Neben diesen allgemeinen entzündungsfördernden Effekten ist das Parvovirus B19 vermutlich auch direkt an der Induktion spezifischer Autoantikörper beteiligt. Zum Einen ruft ein Abschnitt aus den Strukturproteinen VP1 und VP2 durch Kreuzreaktion SLE-typische Autoantikörper hervor (Lunardi C *et al.*, 1996). Zum Anderen konnte in dieser Diplomarbeit gezeigt werden, dass die enzymatisch aktive Phospholipase A<sub>2</sub>-ähnliche Aktivität in der VP1-*unique region* die Bildung von Anti- $\beta$ 2-GP1-Antikörpern bewirkt und möglicherweise in der Lage ist, unter entsprechenden Bedingungen das komplette Anti-Phospholipid-Syndrom zu induzieren.

Die Entstehung und Aufrechterhaltung von rheumatischen Erkrankungen umfasst nach obigen Ergebnissen keine Beteiligung T-Zell-typischer Cytokine und ist fast ausschließlich durch proinflammatorische Cytokine charakterisiert. Zwar ist die Beteiligung der Phospholipase A<sub>2</sub> noch nicht geklärt, den Cytokinprofilen zu Folge könnten die Effekte der parvoviralen Phospholipase A<sub>2</sub>-ähnlichen Aktivität jedoch ein identisches Cytokinmilieu hervorrufen. Daher liegt die Vermutung nahe, dass das Parvovirus B19 durch seine Phospholipase A<sub>2</sub>-Funktion direkt an der Induktion und Aufrechterhaltung rheumatischer Erkrankungen und anderen Autoimmunerkrankungen wie dem Anti-Phospholipid-Syndrom oder SLE beteiligt ist. Gerade der Zusammenhang zwischen Parvovirus B19 und einer Reihe verschiedener Autoimmunerkrankungen macht eine allgemeine, unspezifische Beteiligung des Virus durch pro-inflammatorische Effekte wahrscheinlich.

Da Phospholipase A<sub>2</sub>-vermittelte inflammatorische Reaktionen und Autoimmunerkrankungen dem Virus keinen erkennbaren Vorteil verschaffen, ist anzunehmen, dass es sich dabei um Nebeneffekte handelt. Eine für das Virus essentielle Rolle spielt die Phospholipase A<sub>2</sub>-ähnliche Aktivität hingegen während des Infektionsprozesses beim Transfer des Virusgenoms vom späten Endosom/Lysosom in den Nukleus (Zadori *Z et al.*, 2001).

Zur weiteren Klärung dieser Fragen könnte das oben beschriebene Mausmodell in Zukunft wertvolle Beiträge leisten, da es die direkten Effekte der enzymatischen Wirkung und den dabei involvierten Cytokinen und Chemokinen aufdecken und somit auch als Modell zur Beschreibung allgemeiner Induktionsmechanismen von Autoantikörpern fungieren könnte.

## **C.5. Bindung der VP1-unique region an Zelloberflächen**

Neben der Rolle der VP1-*unique region* in inflammatorischen Prozessen und Autoimmunerkrankungen, steht sie auch in der Diskussion, Wechselwirkungen mit den Zielzellen von Parvovirus B19 einzugehen. Grundlage für diesen Versuchsteil ist das Postulat eines Co-Rezeptors, welches auf folgenden Überlegungen fußt: Einerseits wurde gezeigt, dass viele Zellen den Hauptrezeptor, das P-Antigen, auf ihrer Oberfläche präsentieren, jedoch nicht für Parvovirus B19 permissiv sind. Der strikte Zelltropismus kann also nicht allein durch die Anwesenheit einer Globosidbindedomäne erklärt werden. Andererseits ist bekannt, dass Viren ohne VP1-Anteil nicht infektiös sind. Da die VP1-*unique region*, durch dessen Zusatz sich VP1 von VP2 unterscheidet, zudem vermutlich aus der Kapsidstruktur herausragt, ist sie gewissermaßen für eine erste Kontaktaufnahme zur Zielzelle prädestiniert.

Bisher gibt es weder ein Tiermodell für das Parvovirus B19, noch kann es in Zellkultur für längere Zeit kultiviert werden. Bekannt ist jedoch, dass das Virus spezifisch erythroide Vorläuferzellen infiziert und seine Replikation dort kurzzeitig aufrechterhalten werden kann (Ozawa K *et al.*, 1987b). Als Modell für die Zellbindungsexperimente dient die megakaryoblastoide Zelllinie MB-02, die sich nach entsprechender Erythropoietin (EPO)-Behandlung zu einem für das Parvovirus B19 permissiven Stadium differenziert (Munshi N *et al.*, 1993). Erythropoietin ist ein 30,4 kDa Glycoprotein, das durch Eingriff in den *Ras/Mitogen-activated kinase*-Pfad die Reifung und Proliferation roter Blutzellen reguliert (Fisher JW *et al.*, 2003).

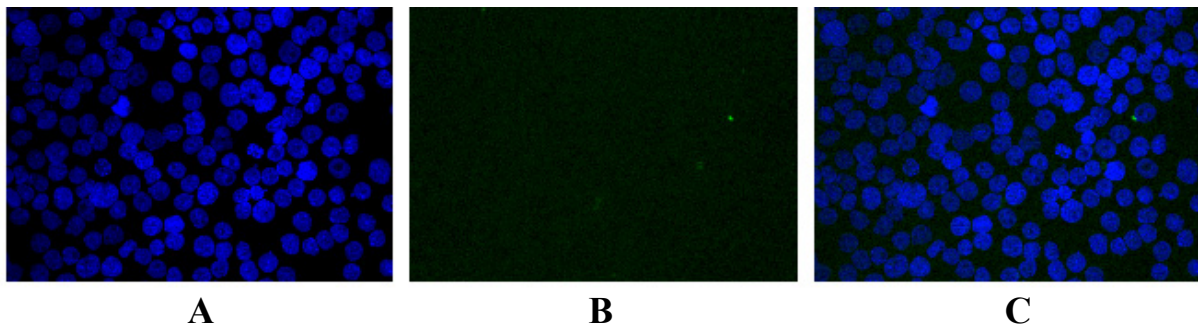
In diesem Zellsystem konnte bereits gezeigt werden, dass die VP1-*unique region* bevorzugt mit ihrem N-terminalen Teil an die Zieloberflächen bindet (Spall T, 2001). Die Ergebnisse werden allerdings sehr kontrovers diskutiert und ein eindeutiger Beweis dieser Interaktion steht noch aus. Deshalb sollte die Bindung der VP1-*unique region* an Zelloberflächen als Teil dieser Diplomarbeit weiter verfolgt werden.

### **C.5.1. Gewinnung markierter Proteine**

Zur Untersuchung der Bindung der gesamten VP1-*unique region* sowie dessen amino- und carboxyterminale Fragmente VP1n-N und VP1n-C an MB-02-Zellen erfolgte zunächst die Produktion der Proteine in Fusion mit einem Inteinabschnitt und einer Chitinbindedomäne in *E. coli* sowie ihre anschließende Aufreinigung über ein Chitin-Intein-System (s. Abb. 8, 13 und 14). Sodann wurden die Proteine mit Alexa Fluor 488, einem Succinimidylester, der speziell an Aminogruppen gekoppelt werden kann, fluoreszenzmarkiert und in die Zellbindungsversuche eingesetzt. Das Bindungsverhalten konnte anschließend fluoreszenzmikroskopisch visualisiert werden.

In den Arbeiten früherer Diplomanden wurden als Negativkontrolle stets K562-Zellen, eine Linie erythroleukämischer Zellen, und Hela S3, eine spezielle Form von Zellen aus Cervixkarzinomen, verwendet. K562-Zellen kommen den für Parvovirus B19 permissiven Zellen sehr nahe, können jedoch nicht infiziert werden und waren deshalb in den Bindungsversuchen meist negativ. Hela S3-Zellen können ebenfalls nicht infiziert werden und sollten daher als Negativkontrolle gut geeignet sein. In einigen Testreihen früherer Versuche zeigten sich hierbei jedoch einzelne Zellen, an welche die VP1-*unique region* band. Das Auffinden einer verlässlichen Negativkontrolle war deshalb Voraussetzung für die anschließenden Bindungsversuche.

Aus diesem Grund wurden zwei weitere humane Zelllinien getestet: eine Linie EBV-infizierter B-Lymphozyten, Raji, sowie HeLa-Zellen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Fritz Schwarzmann und Dr. Hans-Helmut Niller). Hierfür wurde die fluoreszenzmarkierte VP1-*unique region* zusammen mit jeweils  $2 \cdot 10^6$  Zellen inkubiert und die Suspensionen in spezielle Kammern eines Objektträger pipettiert. Nach Fixieren der Zellen mit Paraformaldehyd wurde die DNA der Zellen mit DAPI gefärbt. Bei der Betrachtung der Präparate im Fluoreszenzmikroskop konnten die Zellkerne bzw. das Protein, dessen Bindung an die Zelloberflächen geprüft werden soll, je nach verwendeten Filter getrennt und in Überlagerung sichtbar gemacht werden.



**Abbildung 22: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zur Bindung der VP1-*unique region* an HeLa-Zellen.** Dargestellt sind die mittels DAPI angefärbte DNA (A), die Färbung der VP1-*unique region* mittels AlexaFluor 488 (B) sowie die überlagerten Fluoreszenzen (C).

In vier Testreihen konnte gezeigt werden, dass die VP1-*unique region* keine Wechselwirkung mit HeLa-Zellen eingeht (s. Abb. 22). Die Zelllinie eignet sich daher sehr gut als Negativkontrolle für die weiteren Versuche. Im Gegensatz dazu band die VP1-*unique region* sehr unspezifisch an Raji-Zellen (nicht gezeigt).

### **C.5.2. Bindung der VP1-*unique region* an synchronisierte Zellen**

In den meisten Zellbindungsversuchen, die in unserem Labor durch geführt wurden, konnten bei Versuchen zur Bindung der VP1-*unique region* an EPO-stimulierte MB-02-Zellen bisher nur vereinzelt positive Zellen detektiert werden, wodurch eine Quantifizierung der Ergebnisse schwer möglich war. Aus diesem Grund wurde im folgenden die Synchronisierung von Zellen der Linie MB-02 angestrebt. Für den Fall, dass der Co-Rezeptor zellzyklusabhängig präsentiert wird, könnte durch Synchronisierung eine größere Menge an Zellen in das für

Parvovirus B19 permissive Zellzyklusstadium gebracht werden. Dies sollte eindeutigere Ergebnisse zulassen.

Zunächst wurde versucht, die Synchronisierung des Zellzyklus durch stufenweises Herabsetzen der Konzentration an Humanserum bei konstanter Menge an GM-CSF herbeizuführen. Die Zellen konnten allerdings erst durch das gleichzeitige Herabsetzen von Humanserum und GM-CSF erfolgreich in der G0/G1-Phase arretiert werden (s. Tabelle 3). Nach erneuter Zugabe von Humanserum und GM-CSF durchlaufen die Zellen den Zellzyklus für einige Zeit synchronisiert. Das Cytokin GM-CSF scheint somit für das Zellwachstum notwendig und hinreichend ist. Die Methode der Synchronisierung durch kurzzeitigen Entzug der Wachstumsfaktoren sollte nun bei MB-02-Zellen angewandt werden.

In drei Versuchsreihen mit gleichzeitig synchronisierten und stimulierten Zellen zeigte sich im Gegensatz zu nicht-synchronisierten MB-02-Zellen keine Zunahme an positiven Zellen (nicht gezeigt). Die niedrigen Werte rühren vermutlich daher, dass der Bindungspartner für die VP1-*unique region* an den Zielzellen nicht zellzyklusabhängig präsentiert wird und sich zudem nur eine begrenzte Anzahl an Zellen in dem für das Parvovirus B19 permissiven Differenzierungsstadium befinden (Shimomura S et al., 1992). Auch könnte der Co-Rezeptor bei der Wechselwirkung des Virus mit seiner Zielzelle nur eine untergeordnete Rolle spielen, während die eigentliche Anhaftung durch Bindung der Globosidbindedomäne im VP2-Strukturprotein an das P-Antigen erreicht wird. Um den Erfolg der Synchronisierung zu untersuchen und die exakte Charakterisierung der im Versuch eingesetzten Zellpopulationen zu ermöglichen, ist deren Analyse mittels *Fluorescence-activated cell sorting* (FACS) unabdingbar.

### **C.5.3. Bindung der verschiedenen Abschnitte der VP1-*unique region* an Zelloberflächen**

Um den für die Bindung an Zielzellen verantwortlichen Abschnitt der VP1-*unique region* genauer einzugrenzen, wurden in den folgenden Versuchen N- und C-terminale Abschnitte dieser Proteindomäne eingesetzt. Nach Fluoreszenzmarkierung der Proteine wurde ihre Bindung an EPO-stimulierte und nicht-stimulierte MB-02-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie geprüft.

In der hier gezeigten Versuchreihe wurde bei niedrigen Negativwerten nicht-stimulierter MB-02-Zellen eine gleichzeitig deutlich erhöhte Zahl positiver Zellen in den stimulierten Zellpopulationen detektiert. Eine standardisierte Quantifizierung der positiven Zellen ist auf

den Objektträgern technisch schwer zu bewerkstelligen. Eine annähernde Bestimmung der Anzahl positiver Zellen wurde im folgenden durch die zufällige Auswahl von zehn 40-fach vergrößerten Präparatausschnitten mit etwa 80%-iger Zellkonfluenz erreicht.

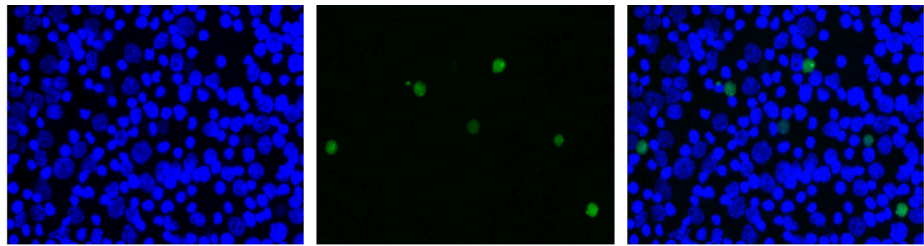
	MB-02 – Tag 3 (stim./nicht stim.)	MB-02 – Tag 5 (stim./nicht stim.)	MB-02 – Tag 7 (stim./nicht stim.)
VP1n	12/4	22/0	38/3
VP1n-C	n.D.	26/1	7/2
VP1n-N	48/8	54/9	25/6

**Tabelle 8: Bindung der VP1-unique region (VP1n) sowie ihrer C- und N-terminalen Teile (VP1n-C bzw. VP1n-N) an EPO-stimulierte und nicht-stimulierte MB-02-Zellen.** An den Tagen 3, 5 und 7 nach der EPO-Stimulierung wurden positive Zellen aus je zehn Feldern mit 80%-iger Zellkonfluenz ausgezählt. Dargestellt ist jeweils die Anzahl positiver Zellen in den mit EPO stimulierten bzw. nicht-stimulierten Zellpopulationen.

Die Auszählung der positiven Zellen in den einzelnen Ansätzen ergab, dass die VP1-unique region sowie ihre C- und N-terminalen Abschnitte in der Lage sind, an stimulierte MB-02-Zellen zu binden, während sie nur in vereinzelten Fällen mit nicht-stimulierten Zellen interagieren (s. Tabelle 8). Diese Tendenz konnte für Proben der Tage 3, 5 und 7 nach EPO-Stimulierung der Zellen gezeigt werden. Auffallend ist zudem die Beobachtung, dass der aminoterminaler Teil der VP1-unique region in allen Proben ein deutlich ausgeprägteres Bindungsverhalten aufweist, als der carboxyterminale Abschnitt.

Beispielhaft sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Proben an Tag 5 nach EPO-Stimulierung der Zielzellen gezeigt (s. Abb. 23). Sie bestätigen die Bindung der VP1-unique region sowie ihrer aminoterminalen und carboxyterminalen Hälfte an die Oberflächen EPO-stimulierter MB-02-Zellen (s. Abb. 23.1-3). Im Gegensatz dazu ist die VP1-unique region nicht in der Lage, an nicht-stimulierte Zielzellen zu binden (s. Abb. 23.4.). Die Abbildungen zeigen jeweils fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der durch die DAPI-Färbung der DNA sichtbar gemachten Zellkerne (A), der fluoreszenzmarkierten Proteine (B) sowie der Überlagerung beider Fluoreszenzsignale (C).

**Abbildung 23.1:**  
Bindungsverhalten  
der VP1-*unique*  
*region* an  
stimulierte MB-02-  
Zellen.

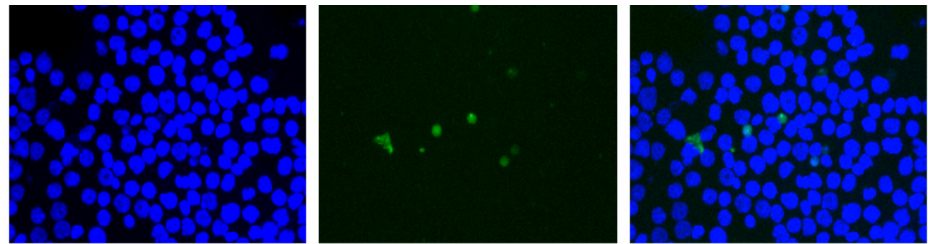


A

B

C

**Abbildung 23.2:**  
Bindungsverhalten  
des C-terminalen  
Teils der VP1-  
*unique region* an  
stimulierte MB-02-  
Zellen.

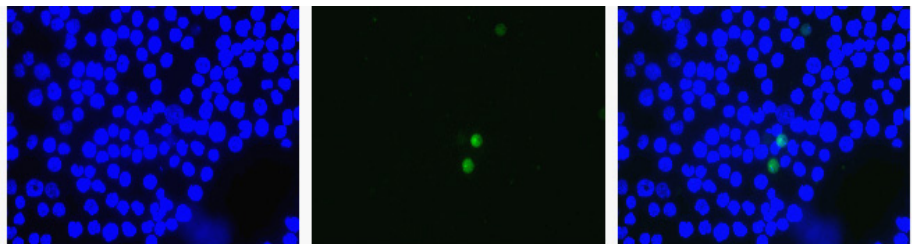


A

B

C

**Abbildung 23.3:**  
Bindungsverhalten  
des N-terminalen  
Teils der VP1-  
*unique region* an  
stimulierte MB-  
02-Zellen.

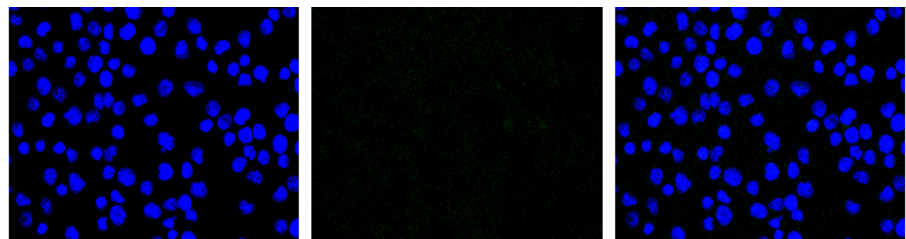


A

B

C

**Abbildung 23.4:**  
Bindungsverhalten  
der VP1-*unique*  
*region* an nicht-  
stimulierte MB-  
02-Zellen.



A

B

C

**Abbildung 23:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zur Bindung der VP1-*unique region* an EPO-stimulierte (23.1.) und nicht-stimulierte MB-02-Zellen (23.4.) sowie zur Bindung ihrer C- und N-terminalen Abschnitte (23.2. bzw. 23.3.) an EPO-stimulierte MB-02-Zellen. Dargestellt sind die durch DAPI angefärbte DNA (A), die Färbung der jeweils getesteten Proteine mittels AlexaFluor (B) sowie die überlagerten Fluoreszenzen (C).

### **C.5.4. Diskussion der Ergebnisse**

Die hier beschriebenen Zellbindungsstudien zeigen, dass die VP1-*unique region* sowie ihre N- und C-terminalen Abschnitte Wechselwirkungen mit Oberflächenstrukturen von MB-02-Zellen eingehen, die wenige Tage nach deren EPO-Stimulierung vermutlich im Zuge von Zelldifferenzierungsprozessen präsentiert werden.

Die Beobachtung, dass sowohl der C- als auch der N-terminale Teil der VP1-*unique region* an erythroide Vorläuferzellen bindet, weist darauf hin, dass die für die Zellbindung verantwortliche Region möglicherweise Teile beider Fragmente umfasst. Die Anhaftung der VP1-*unique region* an Oberflächen erythroider Vorläuferzellen über ihre N-terminale Hälfte stützt die Vermutung, dass sich die Substratbindedomäne der Phospholipase A<sub>2</sub>-ähnliche Aktivität im aminoterminalen Bereich der VP1-*unique region* befindet. So könnte die VP1-*unique region* über ihren N-terminalen Abschnitt Wechselwirkungen mit Phospholipiden auf der Erythrozytenmembran eingehen, während die in der C-terminalen Hälfte befindliche Phospholipase A<sub>2</sub>-ähnliche Aktivität in einem zweiten Schritt den Eintritt in die Zelle oder aber die Freisetzung der Viruspartikel aus den Endosomen vermittelt. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Substratspezifität der Phospholipase A<sub>2</sub>-ähnlichen Aktivität, welche verschiedene L- $\alpha$ -Phosphatidylcholine sowie in geringerem Maße auch Phosphatidylethanolamin hydrolysiert, auffallend mit der Phospholipidverteilung im äußeren *Leaflet* der Erythrozytenmembran übereinstimmt (Netuschil N, 2003). Die eingehendere Charakterisierung des für die Wechselwirkung mit der Zielmembran verantwortlichen Proteinabschnitts könnte in Zukunft wichtige Hinweise zur Klärung des engen Zelltropismus des Virus, seiner Aufnahme in die Zelle sowie seiner Freisetzung aus intrazellulären Kompartimenten geben. Zur Eingrenzung der Bindungsregion könnte die Analyse von Mutanten sowie weiteren, verkürzten Fragmenten der VP1-*unique region* hilfreich sein.

Da auch in nicht-stimulierten MB-02-Populationen vereinzelt positive Zellen auftreten, stellt sich die Frage nach dem Charakter dieser Zellen (s. Tabelle 8). Bei 100-facher Vergrößerung der Präparate fällt auf, dass dieser durch alle Testansätze hindurch sehr ähnlich ist: In Durchlichtaufnahmen weisen die Zellen meist „gekräuselte“ Oberflächen auf. Zudem beginnt sich der Zellkern in einem für Erythrozyten typischen Prozess aufzulösen, weshalb die Kerne dieser Zellen in der DAPI-Färbung meist nur schwach zu erkennen sind.

Theoretisch wäre denkbar, dass EPO-stimulierte MB-02-Zellen in Folge der Differenzierungsprozesse stärker beschädigt werden als nicht-stimulierte Zellen und deshalb für markierte Proteine bzw. freie Farbstoffmoleküle leichter zugänglich sind. Da jedoch der

Anteil an defekten, mit Trypanblau anfärbbaren Zellen, bei stimulierten wie nicht-stimulierten Zellpopulationen jeweils bei etwa 5% liegt, kann diese Vermutung weitgehend ausgeschlossen werden.

Um die Bindungseigenschaften der VP1-*unique region* deutlicher zu charakterisieren und mögliche Artefakte auszuschließen, könnte eine genauere Analyse der positiven Zellen mittels konfokaler Mikroskopie nützlich sein. Auch die Frage, ob fluoreszenzmarkierte Proteine in die Zellen aufgenommen und in den Zellkern transportiert werden, würde dadurch geklärt. Ferner könnten in einem Folgeexperiment zusätzlich zu den markierten Proteinen auch Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper gegen die jeweiligen Proteine eingesetzt werden. Dies würde Gewissheit über die Spezifität der Zellbindung geben und könnte ausschließen, dass lediglich freier Farbstoff in die Zellen eindringt und ihren positiven Charakter hervorruft.

Schließlich könnte das vorliegende Testsystem durch die Methode des *Fluorescence-activated cell sorting* (FACS) erweitert werden, um eine Charakterisierung der Zellpopulation zu ermöglichen. Dies würde beispielsweise die Entfernung toter Zellen oder die gezielte Isolierung von Zellen eines bestimmten Differenzierungsstadiums erlauben.

## **D. Zusammenfassung**

Parvovirus B19 ist das kleinste bisher bekannte humanpathogene Virus. Sein ikosaedrisch aufgebautes Kapsid besteht zu 95% aus dem Strukturprotein VP2, die restlichen 5% der 60 Kapsomere machen das VP1-Protein aus. Die beiden Strukturproteine unterscheiden sich lediglich um einen 227 Aminosäuren langen N-terminalen Abschnitt, der im VP2-Protein fehlt. Diese sogenannte *VP1-unique region* liegt oberflächenexponiert vor und enthält eine Phospholipase A<sub>2</sub>-Aktivität.

Die häufigste von Parvovirus B19 verursachte Krankheit ist die meist mild verlaufende Kinderkrankheit der Ringelröteln (*Erythema infectiosum*). Auf Grund seines engen Zelltropismus für erythroide Vorläuferzellen ist der Erreger oft Ursache von Anämien und aplastischen Krisen. Bei schwangeren Frauen besteht die Gefahr der Ausbildung eines *Hydrops fetalis*, der häufig zum Tod des Kindes führt. Zudem wird das Virus mit einer Reihe von Autoimmunerkrankungen (RA, JIA, SLE, APS) assoziiert.

Zur Etablierung eines Mausmodells, in dem die potentiell entzündungsfördernden Eigenschaften der *VP1-unique region* untersucht werden können, wurden Balb/C-Mäuse sowohl mit der enzymatisch aktiven wie auch der inaktiven Form inokuliert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die *VP1-unique region* nur mit aktiver Phospholipase A<sub>2</sub> appliziert in CFA in der Lage ist, die für das Anti-Phospholipid-Syndrom typischen Anti-β<sub>2</sub>-GP1-Antikörper sowie in sehr geringem Maße auch Anti-Cardiolipin-Antikörper zu induzieren. Somit könnte dieses Mausmodell in Zukunft wertvolle Hinweise zu den molekularen Mechanismen der Induktion von Autoantikörper geben.

Die Untersuchung von Seren und Synovialflüssigkeiten von 15 Patienten mit unterschiedlichen Ausprägungen juveniler idioblastischer Arthritis ergab deutlich inflammatorische Cytokinprofile in den Gelenkflüssigkeiten. Bei der Messung 17 verschiedener Cytokintypen mittels Luminex waren in erster Linie das Cytokin IL-6 sowie die Chemokine IL-8 und MCP-1 stark erhöht. Auch konnten erhöhte Werte an IL-1β, IL-13, IFN-γ, GM-CSF, G-CSF sowie TNF-α nachgewiesen werden, während T-Zell-typische Cytokine kaum detektierbar waren. Die juvenile idioblastische Arthritis wird folglich fast ausschließlich von inflammatorischen Reaktionen induziert und aufrechterhalten. Denkbar ist die Beteiligung der Chemokine IL-8 und MCP-1 an der Infiltration von Monozyten und T-Zellen in die entzündeten Gewebe. Ob die parvovirale Phospholipase A<sub>2</sub>-ähnliche Aktivität *in vivo* oder im Mausmodell ein ähnliches Cytokinmilieu hervorruft und damit die Entzündungsreaktionen ursächlich beeinflusst, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt

werden, ist jedoch der Literatur zu Folge denkbar. Die Analyse der Cytokinprofile in mit der VP1-*unique region* inokulierten Mäusen könnte in zukünftigen Experimenten wichtige Beiträge zur Klärung dieser Frage liefern.

Neben ihren potentiell entzündungsfördernden Eigenschaften gilt die VP1-*unique region* als möglicher Kandidat für die Bindung an einen Co-Rezeptor. In Bindungsversuchen mit fluoreszenzmarkierten Proteinfragmenten konnte bestätigt werden, dass bevorzugt der N-terminale Teil der VP1-*unique region* Wechselwirkungen mit EPO-stimulierten megakaryoblastoiden MB-02-Zellen eingeht. Die Synchronisierung des Zellzyklus brachte dabei keine erhöhten Bindungseffekte. Zur gezielten Auswahl der Zielzellen sowie zur besseren Charakterisierung der Bindungseigenschaften könnte dieses System durch die Methoden des *Fluorescence-activated cell sorting* (FACS) und der konfokalen Mikroskopie erweitert werden.

Die hier diskutierten Versuche eröffnen mehrere potentielle Angriffspunkte für neue Therapeutika gegen Parvovirus B19-assoziierte Inflammationen und Autoimmunerkrankungen. Denkbar sind Phospholipase A<sub>2</sub>-Hemmer oder Antikörper, die direkt gegen die virale Phospholipase A<sub>2</sub> bzw. gegen die Co-Rezeptor-Bindungsdomäne gerichtet sind. Schließlich könnten Cytokine und Chemokine (v.a. TNF- $\alpha$  und MCP-1) Ziel neuer therapeutischer Mittel werden.

## **E. Verzeichnisse**

### **E.1. Abkürzungsverzeichnis**

β2-GP1	β2-Glykoprotein 1
(B)AA	(Bis-)Acrylamid
(L)PC	(Lyso-)Phosphatidylcholin
°C	Grad Celsius
μ	micro (10 <sup>-6</sup> )
A	Ampere
AAV	Adenoassoziierte Viren
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>
Amp	Ampicillin
APS	Anti-Phospholipid-Syndrom
AS	Aminosäure(n)
BFU-E	<i>erythrocyte burst forming unit</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
c	centi (10 <sup>-2</sup> )
cAMP	cyclisches Adenosin-monophosphat
CBD	<i>Chitin-binding domain</i>
CFA	Komplettes Freud'sches Adjuvants
CFU-E	<i>erythrocyte colony forming unit</i>
CMV	Cytomegalovirus
Da	Dalton
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>

EPO	Erythropoetin
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI-MS	<i>Electrospray ionisation mass spectroscopy</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung
G-CSF	<i>Granulocyte colony stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-monocyte colony stimulating factor</i>
Grb2	<i>Growth factor receptor-binding protein 2</i>
Gro	<i>Growth related oncogene</i>
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HSV-1	Herpes-Simplex Virus-1
IFN $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IgG/M	Immunglobulin G/M
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
ITR	<i>inverted terminal repeat</i>
JIA	Juvenile idioblastische Arthritis
k	kilo ( $10^3$ )
kDa	Kilodalton ( $10^3$ Dalton)
l	Liter
LTR	<i>long terminal repeat</i>
M	Molar (Mol / Liter)
m	Meter bzw. milli ( $10^{-6}$ )
MCP-1	<i>Macrophage chemoattractant protein-1</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
min	Minute
MIP-1	<i>Macrophage inflammatory protein-1</i>
n	nano ( $10^{-9}$ )
N.D.	<i>not determined</i>
NBT	4-Nitro-Blau-Tetrazoliumchlorid
NS-1	Nichtstrukturprotein-1
OD <sub>xxx</sub>	optische Dichte bei xxx nm

---

ORF	<i>open reading frame</i>
oxLDL	oxidierte Lipoproteine geringer Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PPV	porcines Parvovirus ( Schweineparvovirus)
PPS	Phosphatidylserin
RA	Rheumatische Arthritis
RANTES	<i>Regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted</i>
RF	Rheumafaktor
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SH3	Src homologie 3
SLE	systemischer Lupus erythemathodes
ssDNA	einzelsträngige DNA
stim.	stimuliert
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
T <sub>H</sub> 1/2	T-Helferzelle 1 bzw. 2
TMB	<i>Tetramethylbenzidine</i>
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
V	Volt
v.a.	vor allem
VP1/2	Virales Protein 1 bzw. 2
VP1n	<i>VP1-unique region</i>
VP1n-C	C-Terminus der <i>VP1-unique region</i>
VP1n-N	N-Terminus der <i>VP1-unique region</i>

## **E.2. Literaturverzeichnis**

Anderson MJ, Jones SE, Fisher HS, Lewis E, Hall SM, Bartlett CL, Cohen BJ, Mortimer PP, Pereira MS (1983). Human parvovirus, the cause of erythema infectiosum (fifth disease)? *Lancet* **1**, 1378.

Anderson MJ, Lewis E, Kidd IM, Hall SM, Cohen BJ (1984). An outbreak of erythema infectiosum associated with human parvovirus infection. *J. Hyg. (Lond)* **93**, 85-93.

Anderson MJ, Higgins PG, Davis LR, Willman JS, Jones SE, Kidd IM, Pattison JR, Tyrrell DA (1985). Experimental parvoviral infection in humans. *J. Infect. Dis.* **152**, 257-65.

Bashir T, Horlein R, Rommelaere J, Willwand K (2000). Cyclin A activates the DNA polymerase delta -dependent elongation machinery in vitro: A parvovirus DNA replication model. *PNAS* **97**, 5522-7.

Blank M, Faden D, Tincani A, Kopolovic J, Goldberg I, Gilburd B, Allegri F, Balestrieri G, Valesini G, Shoenfeld Y. (1994). Immunization with anticardiolipin cofactor (beta-2-glycoprotein I) induces experimental antiphospholipid syndrome in naive mice. *J. Autoimmunity* **7**, 441-55.

Blank M, Krause I, Fridkin M, Keller N, Kopolovic J, Goldberg I, Tobar A, Shoenfeld Y (2002). Bacterial induction of autoantibodies to beta2-glycoprotein-I accounts for the infectious etiology of antiphospholipid syndrome. *J. Clin. Invest.* **109**, 797-804.

Bligh EG, Dyer WJ (1956). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911-917.

Bomalaski JS, Clark MA (1993). Phospholipase A2 and arthritis. *Arthritis Rheum.* **36**, 190-8.

Brown CS, Van-Lent JW, Vlak JM, Spaan WJ (1991). Assembly of empty capsids by using baculovirus recombinants expressing human parvovirus B19 structural proteins. *J. Virol.* **65**, 2702-2706.

Brown KE, Anderson SM, Young NS. (1993). Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. *Science* **262**, 114-7.

Brown KE, Hibbs JR, Gallinella G, Anderson SM, Lehman ED, McCarthy P, Young NS (1994). Resistance to parvovirus B19 infection due to lack of virus receptor (erythrocyte P antigen). *N. Engl. J. Med.* **330**, 1192-6.

Brown KE, Young NS, Liu JM (1994). Molecular, cellular and clinical aspects of parvovirus B19 infection. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **16**, 1-31.

Brown KE, Young NS (1995). Parvovirus B19 infection and hematopoiesis. *Blood Rev.* **9**, 176-82.

Brown KE (2000). Haematological consequences of parvovirus B19 infection. *Baillieres Best. Pract. Res. Clin. Haematol.* **13**, 245-59.

Brownell AI, McSwiggan DA, Cubitt WD, Anderson MJ (1986). Aplastic and hypoplastic episodes in sickle cell disease and thalassaemia intermedia. *J. Clin. Pathol.* **39**, 121-4.

Brugger B, Erben G, Sandhoff R, Wieland FT, Lehmann WD (1997). Quantitative analysis of biological membrane lipids at the low picomole level by nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *PNAS* **94**, 2339-2344.

Buller RM, Janik JE, Sebring ED, Rose JA (1981). Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication. *J. Virol.* **40**, 241-7.

Carnevale KA, Cathcart MK (2001). Calcium-independent phospholipase A(2) is required for human monocyte chemotaxis to monocyte chemoattractant protein 1. *J. Immunol.* **167**, 3414-21.

Cassinotti P, Burtonboy G, Fopp M, Siegl G. (1997). Evidence for persistence of human parvovirus B19 DNA in bone marrow. *J. Med. Virol.* **53**, 229-32.

Cassinotti P, Siegl G (2000). Quantitative evidence for persistence of human parvovirus B19 DNA in an immunocompetent individual. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis.* **19**, 886-7.

Cassinotti P, Siegl G, Michel BA, Bruhlmann P (1998). Presence and significance of human parvovirus B19 DNA in synovial membranes and bone marrow from patients with arthritis of unknown origin. *J. Med. Virol.* **56**, 199-204.

Cervera R, Piette JC, Font J, Khamashta MA, Shoenfeld Y, Camps MT, Jacobsen S, Lakos G, Tincani A, Kontopoulou-Griva I, Galeazzi M, Meroni PL, Derksen RH, de Groot PG, Gromnica-Ihle E, Baleva M, Mosca M, Bombardieri S, Houssiau F, Gris JC, Quere I, Hachulla E, Vasconcelos C, Roch B, Fernandez-Nebro A, Boffa MC, Hughes GR, Ingelmo M, Euro-Phospholipid Project Group (2002). Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Arthritis Rheum.* **46**, 1019-27.

Chipman PR, Agbandje MM, Kajigaya S, Brown KE, Young NS, Baker TS, Rossmann MG (1996). Cryo-electron microscopy studies of empty capsids of human parvovirus B19 complexed with its cellular receptor. *PNAS* **93**, 7502-7506.

Cossart YE, Field AM, Cant B, Widdows D (1975). Parvovirus-like particles in human sera. *Lancet* **1**, 72-73.

Crowl RM, Stoller TJ, Conroy RR, Stoner CR (1991). Induction of phospholipase A2 gene expression in human hepatoma cells by mediators of the acute phase response. *J. Biol. Chem.* **266**, 2647-51.

Deiss V, Tratschin JD, Weitz M, Siegl G (1990). Cloning of the human parvovirus B19 genome and structural analysis of its palindromic termini. *Virology* **175**, 247-254.

Doerig C, Hirt B, Antonietti JP, Beard P (1990). Nonstructural protein of parvoviruses B19 and minute virus of mice controls transcription. *J. Virol.* **64**, 387-396.

Dorsch S (2001). Funktionelle und immunologische Charakterisierung der unique region im Strukturprotein VP1 des Parvovirus B19. *Dissertation.*

Dorsch S, Liebisch G, Kaufmann B, von Landenberg P, Hoffmann JH, Drobnik W, Modrow S. (2002). The VP1 unique region of parvovirus B19 and its constituent phospholipase A2-like activity. *J. Virology* **76**, 2014-8.

Eis-Hubinger AM, Reber U, Abdul-Nour T, Glatzel U, Lauschke H, Putz U (2001). Evidence for persistence of parvovirus B19 DNA in livers of adults. *J. Med. Virol.* **65**, 395-401.

Ellingsen T, Buus A, Stengaard-Pedersen K (2001). Plasma monocyte chemoattractant protein 1 is a marker for joint inflammation in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **28**, 41-6.

Faden H, Gary GW Jr, Anderson LJ (1992). Chronic parvovirus infection in a presumably immunologically healthy woman. *Clin. Infect. Dis.* **15**, 595-7.

Fan MM, Tamburic L, Shippam-Brett C, Zagrodny DB, Astell CR (2001). The small 11-kDa protein from B19 parvovirus binds growth factor receptor-binding protein 2 in vitro in a Src homology 3 domain/ligand- dependent manner. *Virology* **291**, 285-291.

Fawaz-Estrup F (1996). Human parvovirus infection: rheumatic manifestations, angioedema, C1 esterase inhibitor deficiency, ANA positivity, and possible onset of systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* **23**, 1180-5.

Firestein GS, Alvaro-Gracia JM, Maki R, Alvaro-Garcia JM (1990). Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* **144**, 3347-53.

Firestein GS (2003). Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* **423**, 356-61.

Fisher JW (2003). Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **228**, 1-14.

Fishman P, Falach-Vaknine E, Zigelman R, Bakimer R, Sredni B, Djaldetti M, Shoenfeld Y. (1993). Prevention of fetal loss in experimental antiphospholipid syndrome by in vivo administration of recombinant interleukin-3. *J. Clin. Investigation* **91**, 1834-7.

Flunker G, Peters A, Wiersbitzky S, Modrow S, Seidel W (1998). Persistent parvovirus B19 infections in immunocompromised children. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl)* **186**, 189-94.

Foto F, Saag KG, Scharosch LL, Howard EJ, Naides SJ (1993). Parvovirus B19-specific DNA in bone marrow from B19 arthropathy patients: evidence for B19 virus persistence. *J. Infect. Dis.* **167**, 744-8.

Fournie GJ, Mas M, Cautain B, Savignac M, Subra JF, Pelletier L, Saoudi A, Lagrange D, Calise M, Druet P (2001). Induction of autoimmunity through bystander effects. Lessons from immunological disorders induced by heavy metals. *J. Autoimmun.* **16**, 319-26.

Fu Y, Ishii KK, Munakata Y, Saitoh T, Kaku M, Sasaki M (2002). Regulation of tumor necrosis factor alpha promoter by human parvovirus B19 NS1 through activation of AP-1 and AP-2. *J. Virol.* **76**, 5395-5403.

Fulton RJ, McDade RL, Smith PL, Kienker LJ, Kettman JR Jr (1997). Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix system. *Clin Chem.* **43**, 1749-56.

Garcia-Lopez MA, Sanchez-Madrid F, Rodriguez-Frade JM, Mellado M, Acevedo A, Garcia MI, Albar JP, Martinez C, Marazuela M (2001). CXCR3 chemokine receptor distribution in normal and inflamed tissues: expression on activated lymphocytes, endothelial cells, and dendritic cells. *Lab Invest.* **81**, 409-18.

Gareus R, Gigler A, Hemauer A, Leruez VM, Morinet F, Wolf H, Modrow S (1998). Characterization of cis-acting and NS1 protein-responsive elements in the p6 promoter of parvovirus B19. *J. Virol.* **72**, 609-616.

Gharavi AE, Sammaritano LR, Wen J, Elkon KB (1992). Induction of antiphospholipid autoantibodies by immunization with beta 2 glycoprotein I (apolipoprotein H). *J. Clin. Invest.* **90**, 1105-9.

Gharavi AE, Pierangeli SS, Colden-Stanfield M, Liu XW, Espinola RG, Harris EN (1999). GDKV-induced antiphospholipid antibodies enhance thrombosis and activate endothelial cells in vivo and in vitro. *J. Immunol.* **163**, 2922-7.

Gharavi AE, Pierangeli SS, Harris EN (2000). New developments in viral peptides and APL induction. *J. Autoimmun.* **15**, 227-30.

Gharavi AE, Pierangeli SS, Espinola RG, Liu X, Colden-Stanfield M, Harris EN. (2002). Antiphospholipid antibodies induced in mice by immunization with a cytomegalovirus-derived peptide cause thrombosis and activation of endothelial cells in vivo. *Arthritis Rheumatism* **46**, 545-52.

Gharavi EE, Chaimovich H, Cucurull E, Celli CM, Tang H, Wilson WA, Gharavi AE. (1999). Induction of antiphospholipid antibodies by immunization with synthetic viral and bacterial peptides. *Lupus* **8**, 449-55.

Gianani R, Sarvetnick N (1996). Viruses, cytokines, antigens, and autoimmunity. *PNAS* **93**, 2257-9.

Gill SC, von Hippel PH (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319-326.

Girod A, Wobus CE, Zadori Z, Ried M, Leike K, Tijssen P, Kleinschmidt JA, Hallek M (2002). The VP1 capsid protein of adeno-associated virus type 2 is carrying a phospholipase A2 domain required for virus infectivity. *J Gen Virol* **83**, 973-8.

Harigai M, Hara M, Yoshimura T, Leonard EJ, Inoue K, Kashiwazaki S (1993). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in inflammatory joint diseases and its involvement in the cytokine network of rheumatoid synovium. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **69**, 83-91.

Hayashida K, Nanki T, Girschick H, Yavuz S, Ochi T, Lipsky PE (2001). Synovial stromal cells from rheumatoid arthritis patients attract monocytes by producing MCP-1 and IL-8. *Arthritis Res.* **3**, 118-26.

Heegaard ED, Brown KE. Human parvovirus B19. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 485-505.

Hemauer A, Beckenlehner K, Wolf H, Lang B, Modrow S (1999). Acute parvovirus B19 infection in connection with a flare of systemic lupus erythematoses in a female patient. *J. Clin. Virol.* **14**, 73-7.

Hemauer A, Gigler A, Searle K, Beckenlehner K, Raab U, Broliden K, Wolf H, Enders G, Modrow S (2000). Seroprevalence of parvovirus B19 NS1-specific IgG in B19-infected and uninfected individuals and in infected pregnant women. *J. Med. Virol.* **60**, 48-55.

Hernandez M, Fuentes L, Fernandez Aviles FJ, Crespo MS, Nieto ML (2002). Secretory phospholipase A<sub>2</sub> elicits proinflammatory changes and upregulates the surface expression of fas ligand in monocytic cells: potential relevance for atherogenesis. *Circ Res.* **90**, 38-45.

Inoue K, Nojima S (1967). Immunochemical studies of phospholipids. 3. Production of antibody to cardiolipin. *Biochim Biophys Acta.* **144**, 409-14.

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M (2001). Immunobiology – The immune system in health and disease. *Garland Publishing, NY.*

Karetnyi YV, Beck PR, Markin RS, Langnas AN, Naides SJ (1999). Human parvovirus B19 infection in acute fulminant liver failure. *Arch. Virol.* **144**, 1713-24.

Karlsen AE, Dyrberg T. (1998). Molecular mimicry between non-self, modified self and self in autoimmunity. *Semin. Immunol.* **10**, 25-34.

Katrib A, Tak PP, Bertouch JV, Cuello C, McNeil HP, Smeets TJ, Kraan MC, Youssef PP (2001). Expression of chemokines and matrix metalloproteinases in early rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **40**, 988-94.

Katschke KJ Jr, Rottman JB, Ruth JH, Qin S, Wu L, LaRosa G, Ponath P, Park CC, Pope RM, Koch AE (2001). Differential expression of chemokine receptors on peripheral blood, synovial fluid, and synovial tissue monocytes/macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **44**, 1022-32.

Kerr JR (1996). Parvovirus B19 infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **15**, 10-29.

Kerr JR. (2000) Pathogenesis of human parvovirus B19 in rheumatic disease. *Ann. Rheum. Dis.* **59**, 672-83.

Kerr JR, Barah F, Matthey DL, Laing I, Hopkins SJ, Hutchinson IV, Tyrrell DA. (2001). Circulating tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma are detectable during acute and convalescent parvovirus B19 infection and are associated with prolonged and chronic fatigue. *J. Gen. Virology* **82**, 3011-9.

Kim CH, Kunkel EJ, Boisvert J, Johnston B, Campbell JJ, Genovese MC, Greenberg HB, Butcher EC (2001). Bonzo/CXCR6 expression defines type 1-polarized T-cell subsets with extralymphoid tissue homing potential. *J. Clin. Invest.* **107**, 595-601.

Knoll A, Louwen F, Kochanowski B, Plentz A, Stussel J, Beckenlehner K, Jilg W, Modrow S (2002). Parvovirus B19 infection in pregnancy: quantitative viral DNA analysis using a kinetic fluorescence detection system (TaqMan PCR). *J. Med. Virol.* **67**, 259-66.

Kraan MC, Patel DD, Haringman JJ, Smith MD, Weedon H, Ahern MJ, Breedveld FC, Tak PP (2001). The development of clinical signs of rheumatoid synovial inflammation is associated with increased synthesis of the chemokine CXCL8 (interleukin-8). *Arthritis Res.* **3**, 65-71.

Kurtzman GJ, Cohen BJ, Field AM, Oseas R, Blaese RM, Young NS (1989). Immune response to B19 parvovirus and an antibody defect in persistent viral infection. *J Clin Invest.* **84**, 1114-23.

Kurtzman G, Frickhofen N, Kimball J, Jenkins DW, Nienhuis AW, Young NS (1989). Pure red-cell aplasia of 10 years' duration due to persistent parvovirus B19 infection and its cure with immunoglobulin therapy. *N Engl J Med.* **321**, 519-23.

Lefrere JJ, Bourgeois H (1986). Human parvovirus associated with erythroblastopenia in iron deficiency anaemia. *J. Clin. Pathol.* **39**, 1277-8.

Lehmann HW, Kuhner L, Beckenlehner K, Muller-Godeffroy E, Heide KG, Kuster RM, Modrow S (2002). Chronic human parvovirus B19 infection in rheumatic disease of childhood and adolescence. *J. Clin. Virol.* **25**, 135-43.

Lehmann HW, Knoll A, Kuster RM, Modrow S (2003). Frequent infection with a viral pathogen, parvovirus B19, in rheumatic diseases of childhood. *Arthritis Rheum.* **48**, 1631-8.

Levine JS, Branch DW, Rauch J. (2002). The antiphospholipid syndrome. *N. Engl. J. Med.* **346**, 752-63.

Li Y, Zadori Z, Bando H, Dubuc R, Fediere G, Szelei J, Tijssen P. (2001). Genome organization of the densovirus from *Bombyx mori* (BmDENV-1) and enzyme activity of its capsid. *J. Gen. Virology* **82**, 2821-5.

Linke T, Wilkening G, Sadeghlar F, Mozcall H, Bernardo K, Schuchman E, Sandhoff K (2001). Interfacial regulation of acid ceramidase activity. Stimulation of ceramide degradation by lysosomal lipids and sphingolipid activator proteins. *J. Biol. Chem.* **276**, 5760-8.

Locati M, Lamorte G, Luini W, Introna M, Bernasconi S, Mantovani A, Sozzani S (1996). Inhibition of monocyte chemotaxis to C-C chemokines by antisense oligonucleotide for cytosolic phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* **271**, 6010-6.

Loizou S, Cazabon JK, Walport MJ, Tait D, So AK (1997). Similarities of specificity and cofactor dependence in serum antiphospholipid antibodies from patients with human parvovirus B19 infection and from those with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **40**, 103-108.

Lunardi C, Tiso M, Borgato L, Nanni L, Millo R, De Sandre G, Severi AB, Puccetti A. (1998). Chronic parvovirus B19 infection induces the production of anti-virus antibodies with autoantigen binding properties. *Eur. J. Immunology* **28**, 936-48.

Luo W, Astell CR (1993) A novel protein encoded by small RNAs of parvovirus B19. *Virology* **195**, 448-455.

Magro CM, Crowson AN, Dawood M, Nuovo GJ (2002). Parvoviral infection of endothelial cells and its possible role in vasculitis and autoimmune diseases. *J. Rheumatol.* **29**, 1227-35.

Marcus DM, Schwarting GA (1976). Immunochemical properties of glycolipids and phospholipids. *Adv Immunol.* **23**, 203-40.

McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA (1990). Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *PNAS* **87**, 4120-4.

Mitchell LA (2002). Parvovirus B19 nonstructural (NS1) protein as a transactivator of interleukin-6 synthesis: common pathway in inflammatory sequelae of human parvovirus infections? *J. Med. Virol.* **67**, 267-74.

Möbs M (2002). Molekulare Charakterisierung der Phospholipase A2-Aktivität im VP1-Kapsidprotein des Parvovirus B19. *Diplomarbeit*.

Modrow S, Falke D, Truyen U (2003). Molekulare Virologie. Heidelberg, Berlin, *Spektrum Akademischer Verlag*.

Moffatt S, Tanaka N, Tada K, Nose M, Nakamura M, Muraoka O, Hirano T, Sugamura K (1996). A cytotoxic nonstructural protein, NS1, of human parvovirus B19 induces activation of interleukin-6 gene expression. *J. Virol.* **70**, 8485-8491.

Moffatt S, Yaegashi N, Tada K, Tanaka N, Sugamura K (1998). Human parvovirus B19 nonstructural (NS1) protein induces apoptosis in erythroid lineage cells. *J. Virol.* **72**, 3018-28.

Moore TL, Bandlamudi R, Alam SM, Neshier G (1999). Parvovirus infection mimicking systemic lupus erythematosus in a pediatric population. *Semin. Arthritis Rheum.* **28**, 314-8.

Moore TL (2000). Parvovirus-associated arthritis. *Curr. Opin. Rheumatology* **12**, 289-94.

Munshi NC, Zhou S, Woody MJ, Morgan DA, Srivastava A (1993). Successful replication of parvovirus B19 in the human megakaryocytic leukemia cell line MB-02. *J. Virol.* **67**, 562-6.

Murakami M, Kudo I, Nakamura H, Yokoyama Y, Mori H, Inoue K (1990). Exacerbation of rat adjuvant arthritis by intradermal injection of purified mammalian 14-kDa group II phospholipase A<sub>2</sub>. *FEBS Lett.* **268**, 113-6.

Musiani M, Manaresi E, Gallinella G, Venturoli S, Zuffi E, Zerbini M. (2000). Immunoreactivity against linear epitopes of parvovirus B19 structural proteins. Immunodominance of the amino-terminal half of the unique region of VP1. *J. Med. Virology* **60**, 347-52.

Naides SJ, Scharosch LL, Foto F, Howard EJ (1990). Rheumatologic manifestations of human parvovirus B19 infection in adults. Initial two-year clinical experience. *Arthritis Rheum.* **33**,1297-309.

Netuschil N (2003). Die Phospholipase A<sub>2</sub>-ähnliche Aktivität der unique region im Strukturprotein VP1 des Parvovirus B19: Einfluß der aminoterminalen Domäne auf die Aktivität. *Diplomarbeit.*

Nigro G, Bastianon V, Colloridi V, Ventriglia F, Gallo P, D'Amati G, Koch WC, Adler SP. (2000). Human parvovirus B19 infection in infancy associated with acute and chronic lymphocytic myocarditis and high cytokine levels: report of 3 cases and review. *Clin. Infect. Dis.* **31**, 65-9.

Oliver KG, Kettman JR, Fulton RJ. (1998). Multiplexed analysis of human cytokines by use of the FlowMetrix system. *Clin. Chem.* **44**, 2057-60.

Olszewski WL, Pazdur J, Kubasiewicz E, Zaleska M, Cooke CJ, Miller NE (2001). Lymph draining from foot joints in rheumatoid arthritis provides insight into local cytokine and chemokine production and transport to lymph nodes. *Arthritis Rheum.* **44**, 541-9.

O'Sullivan MG, Anderson DC, Fikes JD, Bain FT, Carlson CS, Green SW, Young NS, Brown KE (1994). Identification of a novel simian parvovirus in cynomolgus monkeys with severe anemia. A paradigm of human B19 parvovirus infection. *J. Clin. Invest.* **93**, 1571-1576.

Ozawa K, Kurtzman G, Young N (1986). Replication of the B19 parvovirus in human bone marrow cell cultures. *Science* **233**, 883-6.

Ozawa K, Ayub J, Hao YS, Kurtzman G, Shimada T, Young N (1987a). Novel transcription map for the B19 (human) pathogenic parvovirus. *J. Virol.* **61**, 2395-406.

Ozawa K, Kurtzman G, Young N (1987b). Productive infection by B19 parvovirus of human erythroid bone marrow cells in vitro. *Blood* **70**, 384-91.

Parker JS, Parrish CR (2000). Cellular uptake and infection by canine parvovirus involves rapid dynamin-regulated clathrin-mediated endocytosis, followed by slower intracellular trafficking. *J. Virol.* **74**, 1919-30.

Parker JS, Murphy WJ, Wang D, O'Brien SJ, Parrish CR (2001). Canine and feline parvoviruses can use human or feline transferrin receptors to bind, enter, and infect cells. *J. Virol.* **75**, 3896-902.

Patel DD, Zachariah JP, Whichard LP (2001). CXCR3 and CCR5 ligands in rheumatoid arthritis synovium. *Clin. Immunol.* **98**, 39-45.

Pattison JR, Jones SE, Hodgson J, Davis LR, White JM, Stroud CE, Murtaza L (1981). Parvovirus infections and hypoplastic crisis in sickle-cell anaemia. *Lancet* **1**, 664-665.

Potter CG, Potter AC, Hatton CS, Chapel HM, Anderson MJ, Pattison JR, Tyrrell DA, Higgins PG, Willman JS, Parry HF (1987). Variation of erythroid and myeloid precursors in the marrow and peripheral blood of volunteer subjects infected with human parvovirus (B19). *J. Clin. Invest.* **79**, 1486-1492.

Prabhakar U, Eirikis E, Davis HM. (2002). Simultaneous quantification of proinflammatory cytokines in human plasma using the LabMAP assay. *J. Immunology Methods* **260**, 207-18.

Pruzanski W, Keystone EC, Sternby B, Bombardier C, Snow KM, Vadas P (1988). Serum phospholipase A2 correlates with disease activity in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **15**, 1351-5.

Raab U, Bauer B, Gigler A, Beckenlehner K, Wolf H, Modrow S (2001). Cellular transcription factors that interact with p6 promoter elements of parvovirus B19. *J. Gen. Virol.* **82**, 1473-1480.

Raab U, Beckenlehner K, Lowin T, Niller HH, Doyle S, Modrow S (2002). NS1 protein of parvovirus B19 interacts directly with DNA sequences of the p6 promoter and with the cellular transcription factors Sp1/Sp3. *Virology* **293**, 86-93.

Reid DM, Reid TM, Brown T, Rennie JA, Eastmond CJ (1985). Human parvovirus-associated arthritis: a clinical and laboratory description. *Lancet* **23**, 422-5.

Reitblat T, Drogenikov T, Sigalov I, Oren S, London D (2000). Transient anticardiolipin antibody syndrome in a patient with parvovirus B19 infection. *Am. J. Med.* **15**, 512-3.

Rollins BJ (1996). Monocyte chemoattractant protein 1: a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease. *Mol. Med. Today* **2**, 198-204.

Rosenfeld SJ, Yoshimoto K, Kajigaya S, Anderson S, Young NS, Field A, Warrenner P, Bansal G, Collett MS (1992). Unique region of the minor capsid protein of human parvovirus B19 is exposed on the virion surface. *J. Clin. Invest.* **89**, 2023-9.

Rouger P, Gane P, Salmon C (1987). Tissue distribution of H, Lewis and P antigens as shown by a panel of 18 monoclonal antibodies. *Rev. Fr. Transfus. Immunohematol.* **30**, 699-708.

Saal JG, Steidle M, Einsele H, Muller CA, Fritz P, Zacher J (1992). Persistence of B19 parvovirus in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* **12**, 147-51.

Scheurlen W, Ramasubbu K, Wachowski O, Hemauer A, Modrow S (2001). Chronic autoimmune thrombopenia/neutropenia in a boy with persistent parvovirus B19 infection. *J. Clin. Virol.* **20**, 173-8.

Schwarz TF, Serke S, Von Brunn A, Hottentrager B, Huhn D, Deinhardt F, Roggendorf M (1992). Heat stability of parvovirus B19: kinetics of inactivation. *Zentralbl. Bakteriolog.* **277**, 219-23.

Serjeant GR, Topley JM, Mason K, Serjeant BE, Pattison JR, Jones SE, Mohamed R (1981). Outbreak of aplastic crises in sickle cell anaemia associated with parvovirus-like agent. *Lancet* **2**, 595-7.

Serjeant,GR, Serjeant BE, Thomas PW, Anderson MJ, Patou G, Pattison JR (1993). Human parvovirus infection in homozygous sickle cell disease. *Lancet* **341**, 1237-1240.

Shade RO, Blundell MC, Cotmore SF, Tattersall P, Astell CR (1986). Nucleotide sequence and genome organization of human parvovirus B19 isolated from the serum of a child during aplastic crisis. *J.Virol.* **58**, 921-936.

Shimomura S, Komatsu N, Frickhofen N, Anderson S, Kajigaya S, Young NS (1992). First continuous propagation of B19 parvovirus in a cell line. *Blood* **79**, 18-24.

Shoenfeld Y (1994). Idiotypic induction of autoimmunity: a new aspect of the idiotypic network. *FASEB J.* **8**, 1296-301.

Shoenfeld Y, Gharavi A, Koike T (1998). Beta2GP-I in the anti phospholipid (Hughes') syndrome--from a cofactor to an autoantigen--from induction to prevention of antiphospholipid syndrome. *Lupus* **7**, 503-6.

Singh RR, Hahn BH, Tsao BP, Ebling FM (1998). Evidence for multiple mechanisms of polyclonal T cell activation in murine lupus. *J. Clin. Invest.* **102**, 1841-9.

Soderlund M, von Essen R, Haapasaari J, Kiistala U, Kiviluoto O, Hedman K (1997). Persistence of parvovirus B19 DNA in synovial membranes of young patients with and without chronic arthropathy. *Lancet* **349**, 1063-5.

Sol N, Le Junter J, Vassias I, Freyssinier JM, Thomas A, Prigent AF, Rudkin BB, Fichelson S, Morinet F (1999). Possible interactions between the NS-1 protein and tumor necrosis factor alpha pathways in erythroid cell apoptosis induced by human parvovirus B19. *J. Virol.* **73**, 8762-8770.

Sol N, Morinet F, Alizon M, Hazan U (1993). Trans-activation of the long terminal repeat of human immunodeficiency virus type 1 by the parvovirus B19 NS1 gene product. *J. Gen. Virol.* **74**, 2011-2014.

Spall T (2001). Untersuchungen zu den funktionellen Eigenschaften der unique region im Kapsidprotein VP1 des Parvovirus B19. *Diplomarbeit*.

St.-Amand J, Astell CR (1993). Identification and characterization of a family of 11-kDa proteins encoded by the human parvovirus B19. *Virology* **192**, 121-131.

Summers J, Jones SE, Anderson MJ (1983). Characterization of the genome of the agent of erythrocyte aplasia permits its classification as a human parvovirus. *J. Gen. Virol.* **64**, 2527-32.

Sundy JS, Patel DD, Haynes BF (1999). Inflammation: Basic Principles and clinical correlates. *Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia*.

Szekanecz Z, Halloran MM, Volin MV, Woods JM, Strieter RM, Kenneth Haines G 3rd, Kunkel SL, Burdick MD, Koch AE (2000). Temporal expression of inflammatory cytokines and chemokines in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* **43**, 1266-77.

Takahashi Y, Murai C, Shibata S, Munakata Y, Ishii T, Ishii K, Saitoh T, Sawai T, Sugamura K, Sasaki T (1998). Human parvovirus B19 as a causative agent for rheumatoid arthritis. *PNAS* **95**, 8227-8232.

Tincani A, Gilburd B, Abu-Shakra M, Blank M, Allegri F, Ottaviani R, Riboni M, Meroni PL, Balestrieri G, Shoenfeld Y. (2002). Immunization of naive BALB/c mice with human beta2-glycoprotein I breaks tolerance to the murine molecule. *Arthritis Rheumatism* **46**, 1399-404.

Tovari E, Mezey I, Hedman K, Czirjak L (2002). Self limiting lupus-like symptoms in patients with parvovirus B19 infection. *Ann. Rheum. Dis.* **61**, 662-3.

Triggiani M, Granata F, Oriente A, De Marino V, Gentile M, Calabrese C, Palumbo C, Marone G (2000). Secretory phospholipases A2 induce beta-glucuronidase release and IL-6 production from human lung macrophages. *J. Immunol.* **164**, 4908-15.

Triggiani M, Granata F, Oriente A, Gentile M, Petraroli A, Balestrieri B, Marone G (2002). Secretory phospholipases A2 induce cytokine release from blood and synovial fluid monocytes. *Eur. J. Immunol.* **32**, 67-76.

Triggiani M, Granata F, Balestrieri B, Petraroli A, Scalia G, Del Vecchio L, Marone G (2003). Secretory phospholipases A2 activate selective functions in human eosinophils. *J. Immunol.* **170**, 3279-88.

Tullis GE, Burger LR, Pintel DJ (1993). The minor capsid protein VP1 of the autonomous parvovirus minute virus of mice is dispensable for encapsidation of progeny single-stranded DNA but is required for infectivity. *J. Virol.* **67**, 131-41.

Vernazza PL, Pfister LA, Siegl G, Cassinotti P (1996). High seroprevalence of parvovirus B19 among patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis.* **22**, 198-9.

Von Landenberg P, Lehmann HW, Knoll A, Dorsch S, Modrow S (2003). Antiphospholipid antibodies in pediatric and adult patients with rheumatic disease are associated with parvovirus B19 infection. *Arthritis Rheum.* **48**, 1939-47.

von Poblitzki A, Gerdes C, Reischl U, Wolf H, Modrow S. (1996). Lymphoproliferative responses after infection with human parvovirus B19. *J. Virology* **70**, 7327-30.

Weigel-Kelley KA, Yoder MC, Srivastava A (2001). Recombinant human parvovirus B19 vectors: erythrocyte P antigen is necessary but not sufficient for successful transduction of human hematopoietic cells. *J. Virol* **75**, 4110-6.

Weigel-Kelley KA, Yoder MC, Srivastava A (2003).  $\alpha 5 \beta 1$  Integrin as a cellular co-receptor for human parvovirus B19: requirement of functional activation of  $\beta 1$  integrin for viral entry. *Blood First Edition Paper*, republished online.

Whittingham S and Rowley M (1997). Autoantibodies. *Encyclopedia of human biology* **1**.

Wilkening G, Linke T, Sandhoff K (1998). Lysosomal degradation on vesicular membrane surfaces. Enhanced glucosylceramide degradation by lysosomal anionic lipids and activators. *J. Biol. Chem.* **273**, 30271-8.

Wu R, Svenungsson E, Gunnarsson I, Andersson B, Lundberg I, Schäfer Elinder L, Frostegard J (1999). Antibodies against lysophosphatidylcholine and oxidized LDL in patients with SLE. *Lupus* **8**, 142-150.

Yaegashi N, Niinuma T, Chisaka H, Uehara S, Moffatt S, Tada K, Iwabuchi M, Matsunaga Y, Nakayama M, Yutani C, Osamura Y, Hirayama E, Okamura K, Sugamura K, Yajima A (1999). Parvovirus B19 infection induces apoptosis of erythroid cells in vitro and in vivo. *J. Infect.* **39**, 68-76.

Yoo BC, Lee DH, Park SM, Park JW, Kim CY, Lee HS, Seo JS, Park KJ, Ryu WS (1999). A novel parvovirus isolated from Manchurian chipmunks. *Virology* **253**, 250-258.

Ytterberg SR. (1999). Viral arthritis. *Curr. Opin. Rheumatology* **11**, 275-80.

Zadori Z, Szelei J, Lacoste MC, Li Y, Garipey S, Raymond P, Allaire M, Nabi IR, Tijssen P (2001). A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity. *Developmental Cell* **1**, 291-302.

Zhao ZS, Granucci F, Yeh L, Schaffer PA, Cantor H (1998). Molecular mimicry by herpes simplex virus-type 1: autoimmune disease after viral infection. *Science* **279**, 1344-7.

## **F. Selbständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, die vorliegende Diplomarbeit selbständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Regensburg, den 25.8.2003

.....

(Christian Eichinger)

## **G. Danksagung**

Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Susanne Modrow für die Vergabe dieses methodisch und thematisch sehr interessanten Projekts sowie für die ausgezeichnete Betreuung der Diplomarbeit.

Weiterer Dank gilt Dr. Philipp von Landenberg für die theoretische und methodische Einführung in das Projekt, die Unterstützung der Arbeit sowie hilfreichen Telefonaten.

Herzlicher Dank gilt meinen Kollegen Markus, Torsten, Ulla, Karin, Alexia, Nikolai und Kathrin für die nette Arbeitsatmosphäre.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Engelbert Meier und Dr. Ludwig Deml für ihre Hilfe bei der Arbeit mit den Mäusen sowie bei Max Stadler für seine Unterstützung bei der Arbeit im Labor.

Weiter danke ich Prof. Dr. Hans Wolf für die Bereitstellung der Laborplätze, Dr. Gerhard Liebisch für die Möglichkeit der Durchführung des PLA<sub>2</sub>-Tests in seinem Labor sowie bei Annette für die Einweisung in die Methodik der quantitativen *Real-time* PCR.

Allen Freunden aus Regensburg möchte ich für die schöne Studienzeit und vieles mehr danken.

Ganz besonders möchte ich mich schließlich bei meinen Eltern für ihre Unterstützung während meines Studiums bedanken.