

**Aus der Universitätsklinik für Anaesthesiologie und
Intensivmedizin Tübingen**

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. P. Rosenberger

**Die Rolle von IL-1 β bei der Aktivierung der MAP Kinase
p38 in RSV infizierten Epithelzellen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Jürgen Reinhardt
aus
Balingen
2012**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. H. Häberle

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. S. Beckert

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
1.1 Respiratory Syncytial Virus.....	1
1.1.1 Virologie	1
1.1.2 Epidemiologie.....	2
1.1.3 Pathogenese.....	3
1.1.4 Klinisches Erscheinungsbild.....	4
1.1.5 Immunantwort nach RSV Infektion.....	6
1.2 Mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK)	9
1.2.1 p38 MAP Kinase	9
1.3. Inflammatorische Mediatoren.....	13
1.3.1 Interleukin-1 β	18
1.3.2 Tumornekrosefaktor	19
1.3.3 Interleukin-10	20
1.3.4 Interleukin-6	21
1.3.5 Macrophage Inflammatory Protein 1 (MIP-1)	22
1.3.6 MIP-2 und KC (Keratinocyten Cytokin)	22
1.3.7 Mediatoren im Rahmen der RSV Infektion.....	23
1.4. Fragestellung.....	26
2 MATERIAL UND METHODEN.....	27
2.1 Material.....	27
2.1.1 Chemikalien	27
2.1.2 Geräte und Hilfsmittel.....	29
2.1.3 Fertiglösungen und selbst hergestellte Lösungen	31
2.2. Zellkultur	34
2.2.1 Zelllinien	34
2.2.2 Zellkulturmedien.....	35
2.2.3 Zellkulturmethoden und –bedingungen	36
2.3 Zellstimulation	39
2.3.1 Stimulation der MLE-12 und LA-4 Zellen mit mL-1 β	39

2.3.2 Infektion der MLE-12 Zellen mit Respiratory Syncytial Virus (RSV) und UV-inaktiviertem Respiratory Syncytial Virus (UV-RSV)	40
2.3.3 Inkubation von MLE-12 Zellen mit p38 MAP Kinase Inhibitor (SB 203580) und anschließende Infektion mit RSV	41
2.3.4 Kultivierung von MLE-12 Zellen mit den Überständen RSV infizierter MH-S Zellen mit und ohne Anti-Maus IL-1 β Antikörper	42
2.4 Gesamtproteingewinnung und Gewinnung der Zellüberstände für die ELISAS	44
2.5 Western Blot	45
2.5.1 Elektrophorese	45
2.5.2 Transfer der Proteine vom Gel auf PVDF Membran	47
2.5.3 Immundetektion.....	48
2.6. Bestimmung der Chemokin- und Zytokinkonzentrationen im Überstand mittels ELISA (Enzym linked immunosorbent assay)	51
2.6. Statistik	51
3. ERGEBNISSE	52
3.1 Infektion von MLE-12 Zellen mit RSV und UV-inaktiviertem RSV	52
3.1.1 Expression von pp38 sowie Aktivierung der p38 MAP Kinase nach RSV-Infektion	53
3.1.2 Aktivierung der p38 MAP Kinase und pp38 Expression in MLE-12 Zellen nach Infektion mit UV-inaktiviertem RSV.....	56
3.1.3 Freisetzung unterschiedlicher Mediatoren durch MLE-12 Zellen nach RSV und UV-RSV Infektion	60
3.2 Infektion von MLE-12 Zellen mit RS-Virus nach Vorbehandlung mit p38 MAP Kinase Inhibitor	64
3.2.1 Aktivierung der p38 MAP Kinase nach Vorbehandlung mit SB 203580	64
3.2.2 Mediatorfreisetzung durch MLE-12 Zellen nach Inkubation mit SB 203580 und anschließender RSV-Infektion	66
3.3 Expression von pp38 in den Zelllinien LA-4 und MLE-12	68
3.3.1 Expression von pp38 in LA-4 Zellen nach IL-1 β Stimulation.....	68
3.3.2 Expression von pp38 MLE-12 Zellen	70
3.4 Aktivierung der p38 MAP Kinase in den Zelllinien LA-4 und MLE-12	72
3.4.1 Aktivierung der p38 MAP Kinase Aktivität in LA-4 Zellen	72
3.4.2 Aktivierung der p38 MAP Kinase Aktivität in MLE-12 Zellen	74

3.5 Produktion von Mediatoren durch LA-4 und MLE-12 Zellen nach Stimulation mit IL-1β	75
3.5.1 mKC Konzentration im Überstand mL-1 β stimulierter LA-4 und MLE-12 Zellen	76
3.5.2 CCL-4 Konzentration im Überstand mL-1 β stimulierter MLE-12 Zellen	78
3.6 Einfluss von Überständen RSV-infizierter Alveolarmakrophagen auf MLE-12 Zellen..	79
3.6.1 Expression von pp38 durch MLE-12 Zellen im Rahmen der Inkubation mit Alveolarmakrophagen-Überständen.....	80
3.6.2 Freisetzung von Mediatoren durch MLE-12 Zellen nach Inkubation mit Überständen RSV-infizierter MH-S Zellen	81
4. DISKUSSION.....	87
4.1 Die Rolle von IL-1 β im Rahmen der RSV Infektion	88
4.2. Einfluss einer Infektion mit RSV und UV-RSV auf die Mediatorproduktion	89
4.3 Stellenwert der p38 MAP Kinase bei RSV Infektion	91
5. ZUSAMMENFASSUNG	94
6. ANHANG	96
6.1. Abkürzungsverzeichnis	96
6.2. Literaturverzeichnis	98

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau von RSV (und des nahe verwandten Parainfluenzaviruses).....	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen Epithelzellen des Respirationstraktes und Alveolarmakrophagen	8
Abbildung 3: Stoffwechselwege der Mitogen aktivierte Protein Kinasen (MAP Kinasen)	10
Abbildung 4: Chemische Struktur des p38 MAP Kinase Inhibitors SB 203580	12
Abbildung 5: Einteilung der Chemokine modifiziert nach Zlotnik	18
Abbildung 6: Einfluss unterschiedlicher Zytokine bzw. Chemokine im Rahmen der RSV Infektion sowie Darstellung der interzellulären Vernetzung im Rahmen RSV Infektion	26
Abbildung 7: Schema zur Befüllung der Transfer-Kammer	48
Abbildung 8: Phosphorylierung von ATF-2 Fusion Protein durch die p38 MAP Kinase	50
Abbildung 9: p38 und pp38 Expression nach RSV Infektion	53
Abbildung 10: p38 MAP Kinase Aktivierung nach RSV-Infektion	55
Abbildung 11: p38 und pp38 Expression Infektion mit UV-inaktiviertem RSV	57
Abbildung 12: p38 MAP Kinase Aktivierung nach Infektion mit UV-inaktiviertem RSV.....	58
Abbildung 13: Mediatoren in den Überständen RSV und UV-RSV infizierter MLE-12 Zellen.....	60
Abbildung 14: Konzentration von mIL-6 nach Infektion mit RSV bzw. UV-RSV	61
Abbildung 15: Konzentration von mMIP-1 β nach RSV bzw. UV-RSV Infektion	62
Abbildung 16: Konzentration von mKC nach RSV bzw. UV-RSV Infektion	63
Abbildung 17: Aktivierung der p38 MAP Kinase nach Inkubation mit SB 203580 Inhibitor.....	65
Abbildung 18: Mediatoren im Überstand von MLE-12 Zellen nach SB 203580 Vorbehandlung.....	66
Abbildung 19: Konzentration von mKC im Zellüberstand RSV-infizierter MLE-12 Zellen nach vorheriger Inkubation mit p38 MAP Kinase Inhibitor SB 203580	67
Abbildung 20: Expression von pp38 in LA-4 Zellen nach Stimulation mit mL-1 β	69
Abbildung 21: Expression von pp38 in MLE-12 Zellen nach Stimulation mit mL-1 β	71
Abbildung 22: Aktivierung der p38 MA Kinase in LA-4 Zellen nach IL-1 β Stimulation.....	73
Abbildung 23: Aktivierung der p38 MAP Kinase in MLE-12 Zellen nach IL-1 β Stimulation	74
Abbildung 24: Untersuchte Mediatoren im Überstand mL-1 β stimulierter LA-4 und MLE-12 Zellen	76
Abbildung 25: Konzentration von mKC im Überstand mL-1 β stimulierter LA-4 Zellen	76
Abbildung 26: Konzentration von mKC im Überstand mL-1 β stimulierter MLE-12 Zellen	77
Abbildung 27: Konzentration von mKIP-1 β im Überstand mL-1 β stimulierter MLE-12 Zellen ..	78
Abbildung 28: Expression von pp38 in MLE-12 Zellen nach Inkubation mit MH-S Überständen ..	80
Abbildung 29: mL-1 β Konzentration nach Inkubation mit Überständen RSV-infizierter Makrophagen (MH-S Zellen)	81
Abbildung 30: mL-6 Konzentration nach Inkubation mit Überständen RSV-infizierter Makrophagen (MH-S Zellen)	82

Abbildung 31: mKC Konzentration nach Inkubation mit Überständen RSV-infizierter Makrophagen (MH-S Zellen)	83
Abbildung 32: CCL4 Konzentration nach Inkubation mit Überständen RSV-infizierter Makrophagen (MH-S Zellen)	84
Abbildung 33: mMIP-2 Konzentration nach Inkubation mit Überständen RSV-infizierter Makrophagen (MH-S Zellen)	85
Abbildung 34: mTNF-alpha Konzentration nach Inkubation mit Überständen RSV-infizierter Makrophagen (MH-S Zellen)	86

1 Einleitung

1.1 Respiratory Syncytial Virus

Das Respiratory Syncytial Virus wurde zum ersten mal im Jahre 1957 von einer Gruppe an Schimpansen isoliert, die Zeichen einer Erkältung zeigten¹. Heute weiß man, dass RSV die häufigste Ursache für Infektionen des unteren Respirationstraktes bei Säuglingen und Kleinkindern darstellt. Bis zu einem Alter von 2 Jahren ist RSV der häufigste Erreger der Bronchiolitis und ein häufiger Erreger von Pneumonien^{2, 3} und nahezu jedes Kind bis zu diesem Alter hat mindestens eine RSV Infektion durchgemacht^{4, 5}.

1.1.1 Virologie

RSV gehört zur Familie der Paramyxoviridae und wird der Untergruppe der Pneumoviridae zugeordnet. Es gibt zwei RSV-Hauptgruppen (A und B), die sich bezüglich ihrer Antigeneigenschaften v.a. durch Variationen im G-Protein unterscheiden. Dabei dominieren meist RS-Viren der Gruppe A. Der Virus hat eine Größe von etwa 120 – 350 nm. Das Genom besteht aus linearer Einzelstrang RNA von negative Polarität, umfasst 15 200 Basenpaare und liegt in Form eines helikalen Nukleokapsids vor^{6, 7}. Die Virushülle besteht aus einer Lipiddoppelschicht und enthält drei Transmembran-Oberflächenglykoproteine. Das G-Protein ist für die Adhäsion des Virus an die Wirtszellen verantwortlich⁸. Durch das F-Protein (Fusion Protein) wird die Penetration des Virus ins Zellinnere, sowie die Bildung von Synzytien durch Zellfusion ermöglicht⁹. Die Funktion des dritten Hüllproteins – des sogenannten SH-Proteins - ist noch nicht hinreichend bekannt, wahrscheinlich verstärkt es aber die Membranfusion.

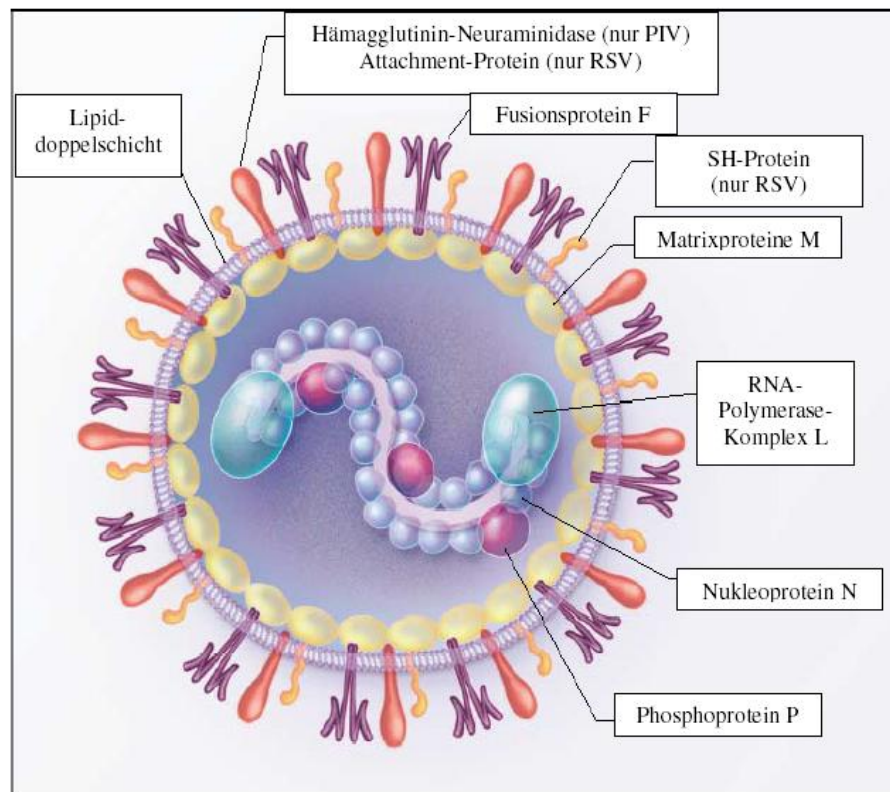


Abbildung 1: Aufbau von RSV (und des nahe verwandten Parainfluenzavirusses (nach Hall, 2001)

1.1.2 Epidemiologie

Das RSV ist weltweit verbreitet. Erkrankungen durch Respiratory Syncytial Virus zeigen einen saisonalen Verlauf. Hauptsächlich betroffen ist die Zeit zwischen November und April mit Erkrankungsspitzen im Januar und Februar¹⁰. Im Durchschnitt dauern diese Perioden mit hohen Erkrankungsraten etwa 22 Wochen an. RSV stellt wie oben bereits beschrieben die häufigste Ursache für Infektionen des unteren Respirationstraktes bei Kleinkindern bis zum zweiten Lebensjahr dar. Bis zu diesem Alter haben nahezu alle Kinder eine Infektion mit dem RS-Virus durchgemacht^{11, 12}. Das Alter von Kindern, die aufgrund einer RS-Infektion stationärer Behandlung bedürfen, liegt meist zwischen dem 2. und 6. Lebensmonat¹³ mit einem Peak im 3. Lebensmonat. Jedes Jahr können in den USA mehr als 120 000 stationäre Behandlungen auf RSV zurück geführt werden, mit steigender Tendenz^{14, 15}. In Europa macht man RSV für circa 42-45 % der Krankenhausaufenthalte von Kindern unter 2 Jahren verantwortlich, die

die Zeichen einer Infektion des unteren Respirationstraktes zeigen¹⁶. Die dabei am häufigsten mit RSV assoziierten Erkrankungen sind Bronchiolitiden, die bei Kleinkinder zu etwa 70% durch RSV verursacht werden¹⁷, Pneumonien, die bis zum Alter von 2 Jahren in 50% der Fälle auf RSV zurückgehen¹⁸ und Tracheobronchitiden. Aufgrund einer nicht ausreichenden Immunität nach einer Primärinfektion^{19, 20}, kommt es in den ersten Lebensjahren sehr häufig zu Reinfektionen^{4, 5}. Als zusätzliche Risikofaktoren bei Kindern wurden desweiteren eine Geburt vor der 35. Schwangerschaftswoche^{21, 22}, chronische Lungenerkrankungen wie beispielsweise eine bronchopulmonale Dysplasie sowie kongenitale Herzfehler beschrieben^{21, 23}.

Lange Zeit wurde der Einfluss von RSV bei der Reinfektion Erwachsener unterschätzt. Heute weiß man jedoch, dass RSV auch im höheren Alter schwere Infektionen verursachen kann. Bei ansonsten gesunden Erwachsenen kann bereits der Kontakt mit infizierten Kindern zu einer Infektion führen. Meist läuft sie dort aber recht mild ab und wird deshalb oft nicht als RSV assoziiert erkannt²⁴. Eine sehr hohe Mortalität und Morbidität, verursacht durch Respiratory Syncytial Virus, findet man bei Patienten mit kardio-pulmonalen Vorerkrankung²⁵, Knochenmarkstransplantierten und anderen immunsupprimierten Patienten^{26, 27}, sowie bei älteren Menschen²⁸. Davon abgesehen sind die oben genannten Risikofaktoren auch bei Kindern für teilweise bis zu 90%-ige Mortalitätsraten verantwortlich²⁹⁻³¹.

1.1.3 Pathogenese

Die Inkubationszeit nach einer Infektion mit RSV beträgt 2 bis 8 Tage. Meist wird RSV durch direkten Kontakt mit erkrankten Personen übertragen, die z.B. virushaltiges Sekret auf ihren Händen tragen. Durch Kontakt kommt es zur Übertragung des Virus und daraufhin zur Selbstinokkulation in Nase und Augen, selten hingegen in den Mund. Desweiteren spielt die Infektion durch Tröpfchen mit Virusmaterial eine wichtige Rolle³²⁻³⁴. RSV ist in der Lage mehrere Stunden auf Händen und Gegenständen zu überleben und

replikationsfähig zu bleiben³⁵. Dies verdeutlicht, dass gründliches Händewaschen eine entscheidende Maßnahme darstellt, um die Ausbreitung des Virus zu verhindern. Die Replikation des Virus beginnt in den Epithelzellen des Nasopharynx und breitet sich in Richtung des unteren Respirationstraktes aus. Die Ausbreitung des Virus von Zelle zu Zelle spielt dabei die wichtigste Rolle, jedoch kann es auch durch Aspiration virushaltigen Sekrets zu einer Ausbreitung der Infektion in die Lungen kommen. Die Infektion des unteren Respirationstraktes tritt im Schnitt 1-3 Tage nach Infektion des oberen Respirationstraktes auf³⁶.

Das für eine RSV Infektion charakteristische pathologische Korrelat ist die Zerstörung und Ablösung der Epithelzellen der kleinen Atemwege mit Verlust der mukoziliären Funktion. Der Untergang der Epithelzellen führt in den betroffenen Bereichen zur ödematösen Schwellung und zu einer vermehrten Schleimsekretion²⁴. Ein Abtransport des Schleims ist folglich aufgrund der eingeschränkten Zilienfunktion nur schlecht möglich und es kommt zur Verstopfung der kleinen Atemwege mit abgeschilferten Epithelzellen und Mukus. Die Folge ist eine Obstruktion der unteren Atemwege mit Überblähung der Lungen, Bildung von Atelektasen und Atemnot. Der in dieser Arbeit unter anderem untersuchten Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen durch Epithelzellen des Respirationstraktes wird bei der Pathogenese der Bronchiolitis eine wichtige Rolle zugeschrieben³⁷⁻⁴⁰.

1.1.4 Klinisches Erscheinungsbild

Das klinische Erscheinungsbild einer Infektion mit Respiratory Syncytial Virus variiert sehr stark. Die unterschiedliche Ausprägung der Erkrankung hängt dabei zum einen vom Alter, zum anderen natürlich auch von den Grunderkrankungen des jeweiligen Patienten ab. Eine asymptomatische Infektion mit RS-Virus ist vor allem bei Kleinkindern sehr selten (<1%)⁴¹, Reinfektionen im Erwachsenenalter hingegen können mit lediglich geringen Symptomen einhergehen und werden häufig verkannt.

Die Primärinfektion mit RSV bei Kindern imponiert typischerweise als eine Infektion des oberen Respirationstraktes, die in etwa 40% der Fälle eine mild verlaufende Entzündung des unteren Respirationstraktes nach sich zieht⁴². Typische Zeichen einer Infektion des oberen Respirationstraktes sind Husten und Schnupfen. Recht häufig gehen diese mit einer Konjunktivitis und/oder Otitis media einher. Zusätzlich zu den genannten Symptomen treten häufig bereits im Anfangsstadium subfebrile Temperaturen bzw. leichtes Fieber auf. Die Beteiligung des unteren Respirationstraktes meist in Form einer Bronchiolitis, die meist einige Tage nach den ersten Infektionszeichen wie Husten und Schnupfen folgt, zeigt sich charakteristischerweise durch einen sich verschlechternden „kruppähnlichen“ Husten und Zeichen der Dyspnoe wie beispielsweise Tachypnoe, Nasenflügeln und Einziehungen. Meist treten auch uncharakteristische Beschwerden wie allgemeines Unwohlsein und Appetitlosigkeit auf⁴¹. Bei der klinischen Untersuchung imponieren ein expiratorisches Giemen, Krepitationsgeräusche, sowie eine klinisch und radiologisch fassbare Überblähung der Lungen¹³. Etwa 1-2% der Kinder, die an einer RSV assoziierten Bronchiolitis erkranken bedarf einer stationären Behandlung. Dabei stellt in etwa 20 % der Fälle eine Apnoe die häufigste Komplikation der Erkrankung dar⁴³⁻⁴⁶, wobei vor allem Frühgeborene und Säuglinge mit Sauerstoffmangel vor oder während der Geburt betroffen sind⁴⁵.

Aufgrund der Schwere der Erkrankungen müssen circa 2-5% der hospitalisierten Kinder intubiert und beatmet werden⁴⁷. In Industrieländern wird die RSV bedingte Mortalität auf 0,005 – 0,02% (weltweit ca. 1-3%^{23, 48-50}) geschätzt. Bei der Betrachtung dieser Zahlen sollte man sich jedoch im Klaren darüber sein, dass fast ausschließlich Kinder mit schweren Vorerkrankungen wie z.B. kardiopulmonalen Störungen oder Immunsuppression für die letalen Ausgänge einer RSV Infektion verantwortlich sind wohingegen zuvor gesunde Kinder nur sehr selten an einer lebensbedrohlichen Infektion erkranken^{13, 17}.

Bei Erwachsenen und älteren Kindern manifestiert sich eine Infektion durch Respiratory Syncytial Virus sehr oft in weit geringerer Ausprägung als bei Kleinkindern. Infektion des oberen Respirationstraktes, Rhinitis, Pharyngitis, Tracheobronchitiden und Mittelohrentzündungen stellen die Hauptbeschwerden dieser Altersgruppe dar. Interessanterweise neigt jedoch auch hier die RSV assoziierte Entzündung des oberen Respirationstraktes zu stärkeren Beschwerden als bei Verursachung durch andere „Erkältungsviren“⁴¹. Wie bereits unter 1.1.2 beschrieben haben auch Erwachsene mit bestimmten Vorerkrankungen ein sehr hohes Risiko an einer lebensbedrohlichen RSV-Infektion zu erkranken oder daran zu versterben^{28, 51, 52}.

1.1.5 Immunantwort nach RSV Infektion

Die primären Zielzellen für das Respiratory Syncytial Virus sind die Epithelzellen der Atemwege. Diese stellen die erste Barriere im Kampf gegen den Virus dar. So ist es auch nicht verwunderlich, dass genau sie am meisten von der RSV assoziierten Entzündung betroffen sind.

Bei der Bindungsvermittlung des RS-Virus mit der Epithelzelle spielen sowohl das G- als auch das F-Protein, die sich beide auf der Oberfläche des Virus befinden, eine entscheidende Rolle. Nach dem Eindringen des Virus in den Respirationstrakt stellt die Osponisierung mit Surfactant Protein-A und -D (SP-A und SP-D) den ersten wichtigen Schritt der angeborenen Immunabwehr dar. Hierbei handelt es sich um von Epithelzellen des Respirationstraktes sezernierte Polypeptide, deren Aufgabe es ist, an in den Körper eingedrungene Mikroorganismen wie Bakterien, Viren oder Pilze zu binden⁵³. Durch diesen Schritt können die Erreger von Abwehrzellen wie z.B. Makrophagen besser erkannt und phagozytiert werden, gleichzeitig sind die Surfactant-Proteine aber auch in der Lage, Makrophagen direkt zu stimulieren und zur Chemotaxis, Phagozytose und Zytokinsekretion anzuregen^{54, 55}. Die Bindung von SP-A und SP-D an RS-Viren zeigte sich auch dahingehend, dass bei Patienten mit RSV Infektion niedrigere Werte der Surfactant-Proteine gemessen wurden^{56, 57}. Durch die Bindung von SP kommt es außerdem zu einer stärkeren Bindung des

Virus an die Zielzelle (genauer an TLR4) und im Anschluss zu einer gesteigerten Aufnahme des Virus in die Zielzelle^{58, 59}. Für die Bindung des Virus an die Zelle sind das F-Protein und G-Protein von entscheidender Bedeutung. Dabei kommt es zur Interaktion zwischen G-Protein und dem CX3CR1 Rezeptor und zur Bindung von F-Protein an den Toll-like Rezeptor 4 (TLR4)⁶⁰. Dies führt zum einen zur Vermittlung von Chemotaxis in Zellen die auf Fractalkine (Chemokin und strukturelles Homolog des G-Protein) reagieren⁶¹, zum anderen zu einer verstärkten Expression von TLR4 auf der Zelloberfläche, einer Aktivierung von NFkappaB⁶² sowie einer Sensitivierung von Atemwegsepithelzellen auf Endotoxin⁶³. Zusätzlich zu den erwähnten Glykoproteinen gibt es weitere Strukturen in der Zelloberfläche der Wirtszellen, die in der Lage sind, das F- und P- Protein des Respiratory Syncytial Virus zu binden. Dazu gehören unter anderem Heparinsulfat-haltige Strukturen, die sowohl F- als auch G-Protein binden können sowie das GTP-bindende RhoA, das die Virus-induzierte Synzytienbildung erleichtert⁶⁴. In diesem Punkt besteht ein direkter Zusammenhang zwischen RSV induzierter Signalkaskade und der Signalkaskade, die durch IL-1 β durch Bindung an den IL-1 Rezeptor (IL-1R) ausgelöst wird. Auch durch die Stimulation von Zellen durch IL-1 β kommt es zu einer umgehenden Aktivierung von RhoA, das mit der intrazellulären Domäne des IL-1R verbunden und das für die Aktivierung verschiedener IL-1 β assoziierter Stoffwechselwege eine entscheidende Rolle zu spielen scheint^{65, 66}. Gleichzeitig sind sowohl RSV als auch IL-1 β in der Lage, für eine Aktivierung der Interleukin-1 Rezeptor assoziierten Kinase (IRAK) zu sorgen. In mehreren Studien konnte zudem die Aktivierung von RAF-1, MAPK/ERK Kinase1 (MEK1), ERK, JNK sowie der p38 MAP Kinase durch Respiratory Syncytial Virus nachgewiesen werden⁶⁷⁻⁶⁹. Dabei spielt die p38 MAP Kinase v.a. bei der NFkappa-B gesteuerten Expression inflammatorischer Zytokine und Chemokine in Makophagen und Epithelzellen eine wichtige und entscheidende Rolle⁷⁰⁻⁷³. Besondere Bedeutung bei der RSV Infektion wird dabei v.a. den CXC und CC Chemokinen zugeschrieben.

Auch alveolaren Makrophagen wird eine wichtige Rolle in der Abwehr einer RSV Infektion zugeschrieben. Dabei sind RS- Viren in der Lage, direkt auf

alveolare Makrophagen einzuwirken und eine Sekretion unterschiedlichster Mediatoren wie z.B. MIP-1alpha, IL-10, TNF-alpha, IL-6, IL-8 u.a hervorzurufen⁷⁴⁻⁷⁷. Dabei wirken die proinflammatorischen Zytokine TNF-alpha und IL-1 β wieder direkt auf Makrophagen sowie auf Epithelzellen des Respirationstraktes ein. In Epithelzellen führt diese Stimulation zu einer zusätzlichen Freisetzung verschiedener Mediatoren, die in der Pathologie der RSV-Infektion eine entscheidende Rolle spielen indem sie beispielsweise chemotaktische Wirkung zeigen.

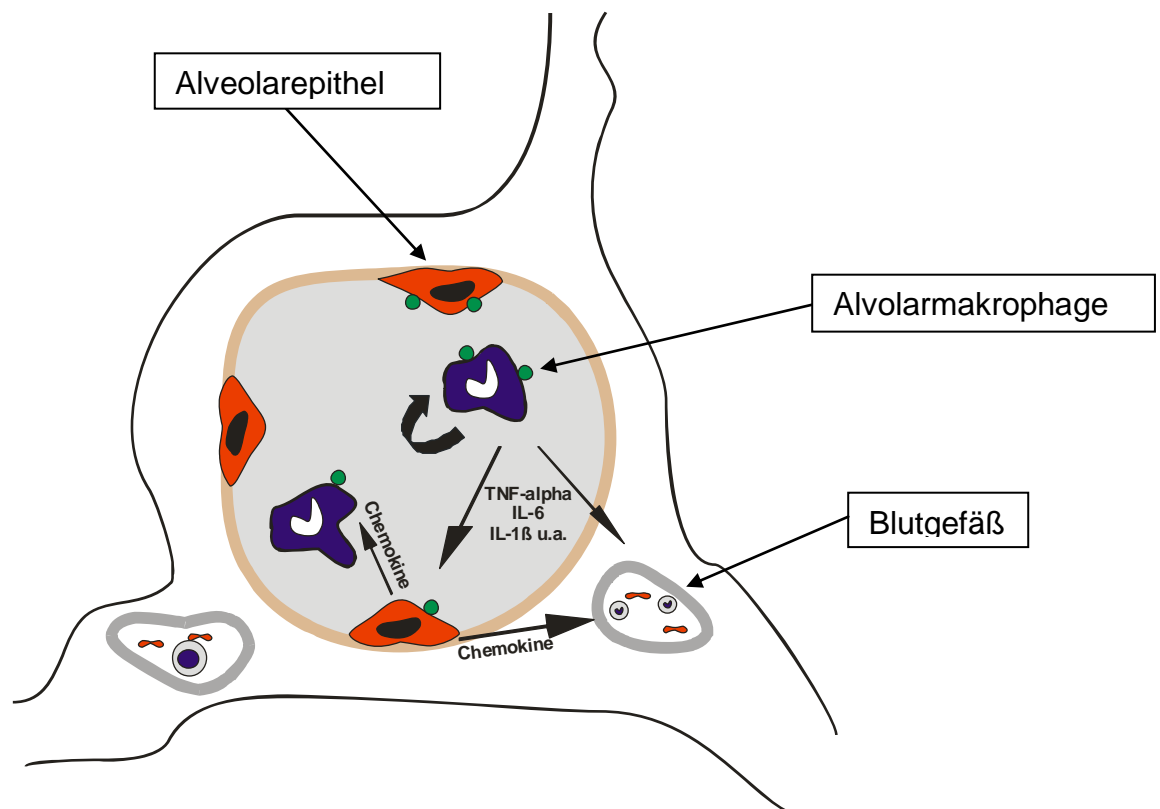


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen Epithelzellen des Respirationstraktes und Alveolarmakrophagen

1.2 Mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK)

Bis heute sind unterschiedliche MAP-Kinase Stoffwechselwege bekannt, die für die Signaltransduktion, d.h. die intrazelluläre Weiterleitung von Reizen in eukaryotischen Zellen von entscheidender Bedeutung sind.

Dabei handelt es sich z.B. um die Extrazellulär regulierte Proteinkinase (ERK), die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) sowie die p38 MAP Kinase. In dieser Arbeit wurde besonderes Augenmerk auf die p38-MAP Kinase und deren Aktivierung nach unterschiedlichen Stimuli gelegt.

1.2.1 p38 MAP Kinase

Die p-38 MAP Kinase, ein Mitglied der MAP Kinase Familie wurde erstmals 1994 im Zusammenhang mit einer Antwort auf die Stimulation muriner Zellen mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) beschrieben⁷⁸. Bis heute ist es gelungen 4 verschiedene Isoformen der p38 MAP Kinase zu identifizieren, wobei die p38 α bis heute zur häufigsten der untersuchten Isoformen gehört.

Die Aktivierung von p38 α konnte in vielen unterschiedlichen hämatopoetischen sowie nicht hämatopoetischen Zelllinien nach Kontakt mit unterschiedlichen Stimuli nachgewiesen werden. Als weitere Isoformen konnten bis heute p38beta, p38gamma und p38delta nachgewiesen werden. Bei p38beta + p38beta2 handelt es sich um die nächsten Homologe zu p38alpha. P38gamma und p38delta hingegen sind nur zu 63% bzw. 61% mit p38alpha identisch. Während die Alpha- und Beta-Unterformen in den unterschiedlichsten Zellen exprimiert werden, findet man p38gamma nahezu nur in Skelettmuskelzellen, p38 delta vornehmlich in Hoden, Pankreas, Prostata und Speicheldrüsen⁷⁹.

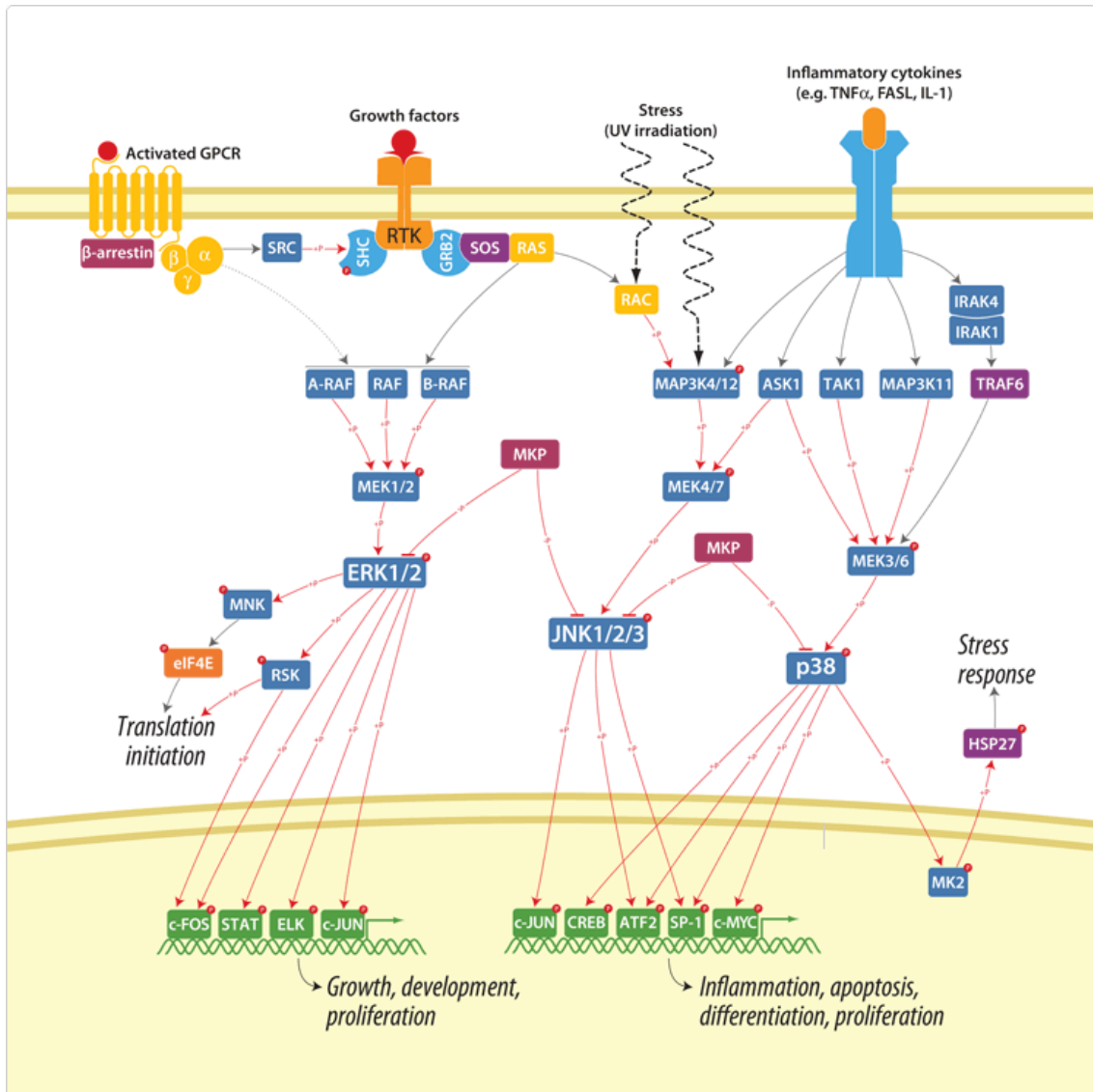


Abbildung 3: Stoffwechselwege der Mitogen aktivierte Protein Kinasen (MAP Kinasen)

Allen Mitgliedern der p38 MAPK-Familie gemeinsam ist eine aus 12 Aminosäuren bestehende „Aktivierungs-Tasche“, welche durch übergeordnete MAP-Kinase-Kinasen am Thr-Gly-Tyr-Ende phosphoryliert werden kann^{80, 81}. Inzwischen ist bekannt, dass die p38 MAP Kinase in der Lage ist, unterschiedlichste Substrate wie Kinasen (z.B. MAPKAP-2)⁸², Transkriptionsfaktoren (z.B. ATF-2)⁸³ und MEF-2⁸³⁻⁸⁵ zu phosphorylieren. In dieser Arbeit wurde dabei besonderes Augenmerk auf ATF-2 (Activating transcription factor-2) gelegt, der als eines der ersten Substrate für p38 und

JNK identifiziert werden konnte⁸⁶. Aus der Phosphorylierung von ATF-2 an Thr69 und Thr71 resultiert letztendlich eine Erhöhung der Transkriptionsaktivität⁸⁶.

Die Aktivierung aller 3 MAP Kinasen erfolgt durch spezifische und übergeordnete MAP-Kinase-Kinasen (MKK) und wiederum übergeordnete MAP-Kinase-Kinase-Kinasen (MKKK). MKK-3 sowie MKK-6 bilden dabei, wie auch im Schaubild ersichtlich, die Upstream-Kinasen für p38.

Die p38 MAP Kinase spielt eine wichtige Rolle bei einer großen Anzahl an Erkrankungen. Dabei ist bekannt, dass die Regulation der Zytokin- und Chemokin-Biosynthese in unterschiedlichen Zellarten eng mit einer Aktivierung der p38 MAP Kinase verbunden ist⁸⁷. Als Aktivatoren der MAP-Signalkaskade dienen dabei unterschiedlichste Reize. Dazu gehören unter anderem unterschiedliche Zytokine (z.B. IL-1 β), Lipopolysaccharide (LPS), Röntgen-Strahlen, UV-Strahlen oder auch virale Infektionen (z.B. mit RSV)⁸⁷. Unterschiedlichste Studien konnten nachweisen, dass p38 v.a. bei der Vermittlung inflammatorischer Prozesse eine entscheidende Rolle zukommt. Dies gilt ebenso für Erkrankungen wie Asthma bronchiale und COPD als auch für akute Lungenerkrankungen wie Pneumonien oder Bronchiolitiden. Dabei ist v.a. die Produktion proinflammatorischer Mediatoren wie TNF-alpha, IL-1 β , RANTES oder IL-8, die bei der Entstehung und Aufrechterhaltung inflammatorischer Prozesse eine entscheidende Rolle spielen, sehr oft eng mit einer Aktivierung der p38 MAP Kinase verbunden⁸⁷.

Aufgrund dieser entscheidenden Rolle der p38 MAP Kinase bei entzündlichen Prozessen sind bis heute mehr als 100 MAP Kinase Inhibitoren entwickelt worden. Den Inhibitoren gemeinsam ist die kompetitive Hemmung der Bindung von ATP an die p38 MAP Kinase. In dieser Arbeit wurde die Wirkung des p38 MAP Kinase Inhibitors SB 203580 untersucht. Dabei handelt es sich um einen Pyridinyl-Imidazol-Inhibitor

(4(4-fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)imidazole), der sowohl die p38 α - als auch die p38 β -Isoformen der p38 MAP Kinase durch kompetitive Bindung an die ATP-Bindungs-Stelle inhibiert.

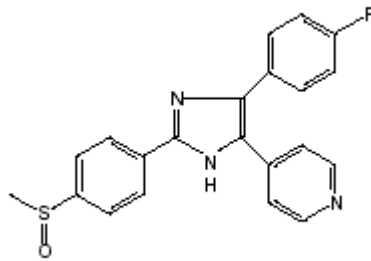


Abbildung 4: Chemische Struktur des p38 MAP Kinase Inhibitors SB 203580

1.3. Inflammatorische Mediatoren

Zytokine sind Peptide bzw. Proteine mit einer Länge von etwa 100–200 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 15-25 kD, die von fast allen kernhaltigen Körperzellen – einschließlich Zellen des Immunsystems – sezerniert werden⁸⁸. Als Mediatoren können sie entweder in der gleichen Zelle (autokrin), in benachbarten Zellen (parakrin) oder aber systemisch in entfernten Zielzellen (endokrin) ein zell- und zytokinspezifisches Signal auslösen. Sie umfassen Familien von Regulatoren wie Interleukine (IL), Tumornekrosefaktoren (TNF), Interferone (IF) und bestimmte Wachstumsfaktoren. Ihre Wirkung entfalten Zytokine durch Bindung an spezifische Membranrezeptoren und lösen dadurch definierte zelluläre Antworten aus. In der Regel werden Zytokine *de novo* synthetisiert und im Gegensatz zu glandulären Hormonen wie beispielweise Insulin nicht als präformierte Moleküle in spezialisierten Organen gespeichert. Zytokine besitzen nur kurze Halbwertszeiten, ihre Aktivität kann jedoch durch Bindung an bestimmte Strukturen wie die extrazelluläre Matrix verlängert werden. Neben den klassischen löslichen Formen existieren Zytokine auch als membranständige Proteine (Bsp. Tumornekrosefaktor)⁸⁹ oder werden als inaktive Pro-Formen sezerniert (TGFβ1)⁹⁰. Da Zytokine oftmals in Kaskaden produziert werden, beeinflussen sie die Wirkung anderer Zytokine additiv, synergistisch oder auch antagonistisch.

Eine Einteilung der Zytokine kann grob in pro- und antiinflammatorische Zytokine vorgenommen werden, deren Gleichgewicht für den adäquaten Ablauf einer Entzündungsreaktion von entscheidender Bedeutung ist. In die Gruppe der proinflammatorischen Zytokine gehört neben Tumornekrosefaktor und Interleukin-6 auch Interleukin-1, das in dieser Arbeit besonders untersucht wurde. IL-10, IL-13 und IL-1-Rezeptor-Antagonist zählen zur Gruppe der antiinflammatorischen Zytokine. Es konnte bereits mehrfach bewiesen werden, dass eine Sekretion von IL-10 und IL-13 zu einer Inhibierung von IL-6, TNF-alpha und Interleukin-1 führt. IL-13 führt außerdem zur vermehrten Expression von IL-1-Rezeptor-Antagonisten (IL-1-RA)^{91, 92}, welche durch Bindung von IL-1 dessen Aktivität inhibieren können. Desweiteren konnte in Studien an einem

Tiermodell eine protektive Wirkung von IL-10 und IL-13 auf Lungenepithelzellen nachgewiesen werden ⁹³. Eine weitere Gruppe der inflammatorischen Mediatoren bilden die Chemokine. Diese chemotaktisch wirksamen Zytokine haben normalerweise ein niedriges Molekulargewicht zwischen 7-15 kDa und sind v.a. für die Rekrutierung von Leukozyten an den Ort der Entzündung unabdingbar⁸⁸. Typischerweise wird die Sekretion von Chemokinen u.a. durch andere Zytokine aber auch durch Viren induziert ⁷⁷

Die aus etwa hundert Aminosäuren aufgebauten Chemokine besitzen eine 20-70%ige Homologie bezüglich der Aminosäuresequenz und können je nach Anordnung der zwei N-terminalen Zystein-Moleküle in vier Gruppen eingeteilt werden: CC-, CXC-, XC- und CX3C-Chemokine ^{94, 95}. Die CC-Chemokine besitzen zwei aneinander gereihte Zystein-Moleküle während in den CXC-Chemokinen die beiden Zystein-Moleküle durch eine andere Aminosäure getrennt sind. Die Chemokine der XC-Gruppe haben nur ein Zystein-Molekül und bei den Chemokinen der CX3C-Gruppe liegen zwischen den Zystein-Molekülen drei Aminosäuren. Die früher gebräuchliche Nomenklatur anhand der biologischen Funktion wurde aufgrund der Unübersichtlichkeit aufgegeben und die Chemokine nach ihrer Struktur neu benannt. Ihre Wirkung entfalten Chemokine über die Bindung an transmembranöse G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Dabei sind Chemokine in der Lage, unterschiedliche Rezeptoren zu aktivieren und ein Rezeptor kann darüber hinaus zusätzlich von unterschiedlichen Chemokinen besetzt und anschließend aktiviert werden. Wahrscheinlich ist dabei die Selektivität in vivo höher als in vitro ⁹⁶.

Den beiden am besten untersuchten Chemokin-Gruppen - CC- und CXC-Chemokine- wird eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von Erkrankungen des Respirationstraktes zugeschrieben ⁹⁷. Alle bisherigen Studien zur RSV-Infektion unterschiedlicher Zelllinien und im Tierversuch konnten nachweisen, dass RSV eine schnelle Produktion von Chemokinen innerhalb der ersten 24 Stunden, inklusive der CXC-Chemokine IL-8 (CXCL8),

IP-10 (CXCL10) und MIP-2, der CC-Chemokine MIP-1 alpha (CCL3) und MIP-1beta (CCL4), RANTES (CCL5), Eotaxin (CCL11), MCP-1 (CCL2) und der XC-Chemokine (Lymphotactin, XCL1) induziert. Diese Ergebnisse konnten sowohl in vitro in humanen Zelllinien als auch in vivo bei Menschen und Mäusen nachgewiesen werden ^{77, 98-107}.

Bezüglich der Immunantwort scheinen deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Zelltypen zu bestehen ^{108, 109}. Die Menge der inokulierten RSV-Viren scheint dabei für die Konzentration der sezernierten Chemokine sowie für die Schwere der Inflammation in Lungenepithelzellen verantwortlich zu sein ^{77, 105, 110}. Im Rahmen der RSV-Infektion und der dadurch ausgelösten Immunantwort spielen Alveolarmakrophagen eine entscheidende Rolle. Sie sind in der Lage nach Kontakt mit RSV proinflammatorische Mediatoren wie IL-1 β , TNF-alpha, IL-6 oder IL-8 freizusetzen und somit zur Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion beizutragen ^{62, 111}. Desweiteren konnte bereits gezeigt werden, dass Alveolarmakrophagen durch Sekretion von IL-10 zu einer lokalen Immunsuppression beitragen können und somit in der Lage sind eine Antikörpervermittelte Abwehr zu induzieren ¹¹².

Die Produktion von IL-12, welches die zelluläre Immunabwehr unterstützt und Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) stimuliert, wird durch RSV jedoch inhibiert ¹¹³⁻¹¹⁶.

Die Arbeitsgruppen um Sarmiento und Hegele konnten bereits beweisen, dass RS-Viren neben einer direkten Infektion von Epithelzellen als primärem Angriffspunkt auch in der Lage sind, Alveolarmakrophagen direkt zu infizieren und eine weniger effektive aber kontinuierliche Virusreplikation aufrechtzuerhalten ^{117, 118}.

CC-Chemokine

Systematischer Name			
nach neuer Nomenklatur	Ligand bei Menschen	Ligand bei der Maus	Rezeptor
CCL1	I-309	TCA-3	CCR8
CCL2	MCP-1, MCAF	JE	CCR2
CCL3	MIP-1 α	MIP-1 α	CCR1, CCR5
CCL4	MIP-1 β	MIP-1 β	CCR5, CCR8
CCL5	RANTES	RANTES	CCR1, CCR3, CCR5
CCL6		MRP-1	
CCL7	MCP-3	MARC	CCR1, CCR2, CCR3
CCL8	MCP-2	MCP-2	CCR3
CCL9		MRP-2, MIP-1 γ	
CCL10		CCF18	
CCL11	Eotaxin	Eotaxin	CCR3
CCL12		MCP-5	CCR2
CCL13	MCP-4		CCR2, CCR3
CCL14	CCL14, HCC-1. CK β 1		CCR1
CCL15	HCC-2, Lkn-1. MIP-5		CCR1, CCR3
CCL16	HCC-4, LEC, Mtn-1	LCC-1	CCR1
CCL17	TARC	TARC	CCR4
CCL18	DC-CK1. PARC		
CCL19	MIP-3 β , ELC, ck β 11	MIP-3 β , ELC	CCR7
CCL20	MIP-3 α , LARC	MIP-3 α , LARC	CCR6
CCL21	6Ckine, SLC, ck β 9	SLC, TCA-4	CCR7
CCL22	MDC, STCP1	abcd-1	CCR4
CCL23	MPIF-1, ck β 8-1		CCR1
CCL24	MPIF-2, Eotaxin-2		CCR3
CCL25	TECK, ck β 15	TECK, ck β 15	CCR9
CCL26	Eotaxin-3, MIP-4 α		CCR3
CCL27	CTAL, ILC, ESkine	ALP, Skinkine	CCR10

CXC-Chemokine

Systematischer Name			
nach neuer	Ligand bei Menschen	Ligand bei der Maus	Rezeptor
Nomenklatur			
CXCL1	GROalpha, MGSA	MIP-2, KC	CXCR2
CXCL2	GROβ, MIP-2α	KC	CXCR2
CXCL3	GROγ, MIP-2β	KC	CXCR2
CXCL4	PF4	PF4	CXCR2
CXCL5	ENA-78	LIX	CXCR1, CXCR2
CXCL6	GCP-2	CKα-3	
CXCL7	NAP-2		CXCR2
CXCL8	Interleukin-8		CXCR1, CXCR2
CXCL9	Mig	Mig	CXCR3
CXCL10	IP-10	IP-10, CRG-2	CXCR3
CCL11	I-TAC		CXCR3
CCL12	SDF-1	SDF-1	CXCR4
CCL13	BLC, BCA-1	BLC, BCA-1	CXCR5
CCL14	BRAK		
CCL15		Lungkine	
CCL16	CXCL16	CXCL16	CXCR6

CX3C-Chemokine

Systematischer Name			
nach neuer	Ligand bei Menschen	Ligand bei der Maus	Rezeptor
Nomenklatur			
CX3CL1	Fractalkine	Fractalkine	CX3CR1

C-Chemokine

Systematischer Name			
nach neuer	Ligand bei Menschen	Ligand bei der Maus	Rezeptor
Nomenklatur			
XCL1	Lymphotaktin	Lymphotaktin	XCR1
XCL2	SCM-1 β		XCR2

Abbildung 5: Einteilung der Chemokine modifiziert nach Zlotnik ¹¹⁹

Im Rahmen der Infektion von RSV spielen wie bereits oben beschrieben inflammatorische Mediatoren eine entscheidende Rolle. Als einer davon ist IL-1 β , das im Rahmen einer Infektion alveolärer Makrophagen mit RSV sezerniert werden kann, selbst in der Lage, auf die angrenzenden Lungen- bzw. Alveolarepithelzellen einzuwirken und in diesen unterschiedliche Stoffwechselwege in Gang zu setzen. In dieser Arbeit sollte die Rolle von IL-1 β im Rahmen der RSV-Infektion deshalb besonders hervorgehoben werden. Die in dieser Arbeit neben IL-1 β näher untersuchten pro- und antiinflammatorischen Mediatoren sollen im Folgenden nochmals besonders hervorgehoben werden.

1.3.1 Interleukin-1 β

Interleukin-1 β ist ebenso wie TNF-alpha ein multifunktionales (proinflammatorisches) Zytokin, dessen Wirkungsschwerpunkt in der Initialphase von Entzündungs- und Immunreaktionen liegt. Zusammen mit IL-1alpha wird IL-1 β als IL-1 bezeichnet. Die Freisetzung von IL-1 β erfolgt durch eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen. Dazu gehören unter anderem Makrophagen und Monozyten ¹²⁰, Endothelzellen ¹²¹, Megakaryozyten und Blutplättchen ^{122, 123}, natürliche Killerzellen ¹²⁴ und Neutrophile ¹²⁵. Kommt es beispielsweise durch bakterielle Lipopolysaccharide oder Immunglobuline zur Bindung an die entsprechenden Rezeptoren auf Monozyten bzw. Makrophagen,

sind diese in der Lage IL-1 β zu sezernieren^{126 127}. Einmal freigesetzt vermag IL-1 β auf unterschiedlichste Zellen Einfluss zu nehmen. Die primären Zielzellen bei entzündlichen Prozessen sind dabei die kapillären Endothelzellen. Diese sezernieren nach Kontakt mit Interleukin-1 β unter anderem proinflammatorische Mediatoren wie MCP-1. Desweiteren kommt es zur Hochregulation der Expression vaskulärer Adhäsionsmoleküle wie E-Selectin, ICAM-1 und VCAM-1¹²⁸. Dadurch wird die Diathese von Leukozyten und die folgende Migration ins Gebiet der Inflammation ermöglicht. Dabei ist IL-1 β in der Lage durch Kontakt mit Monozyten seine eigene Expression anzuregen und somit zu einer Verstärkung der Entzündung beizutragen.

Die biologische Aktivität von IL-1alpha und -beta entsteht über die Interaktion mit spezifischen Rezeptoren. Bisher konnten zwei verschiedene Rezeptorproteine identifiziert werden¹²⁹⁻¹³¹, von denen jedes drei Immunglobulin-ähnliche Domänen besitzt. Die Rezeptoren werden als Typ I IL-1-Rezeptor (IL-1 RI) bzw. Typ II IL-1-Rezeptor (IL-1 RII) bezeichnet. Abhängig vom Zelltyp zeigen die Rezeptoren eine unterschiedliche Affinität gegenüber IL-1alpha und IL-1beta. Typischerweise interagiert IL-1alpha vorzugsweise mit dem IL-1 RI, während für IL-1beta eher eine Interaktion mit dem IL-1 RII nachgewiesen werden konnte^{132, 133}.

1.3.2 Tumornekrosefaktor

Tumornekrosefaktor-alpha (Synonym: TNFSF1a, Kachektin) ist neben IL-1 β eines der proinflammatorischen Zytokine. Dabei handelt es sich um ein pleiotropes Molekül, das in unterschiedlichsten Bereichen z.B. Zelldifferenzierung oder apoptotischen Prozessen eine zentrale Rolle einnimmt. Eine der wichtigsten ist die Induktion und Aufrechterhaltung inflammatorischer Prozesse. Hier steuert TNF-alpha unter anderem die Rekrutierung von Leukozyten an den Ort der Inflammation durch Aktivierung vaskulärer Endothelzellen und vermehrter Expression von Adhäsionsmolekülen wie

Selektinen sowie durch die Aktivierung von Makrophagen¹³⁴. Neben der Freisetzung durch Alveolarmakrophagen im Lungengewebe können auch Monozyten, Neutrophile, Mastzellen, Keratinozyten, T-Zellen, glatte Muskelzellen oder natürliche Killerzellen auf bestimmte Reize mit einer Sekretion von TNF-alpha reagieren^{135, 136}. Nach Sekretion ist TNF in der Lage parakrin am Ort der Sekretion seine Wirkung zu entfalten oder über den Blutstrom entfernte Gewebe zu erreichen. Bis heute konnten viele Mediatoren bestimmt werden, die die Sekretion von TNF-alpha induzieren können. Dazu gehören neben den von Bakterien produzierten Lipopolysaccharide, Zytokine wie beispielsweise IL-1 β , GM-CSF oder auch TNF-alpha selbst, die Substanz P, Bradykinin oder platelet activating factor. Zu einem Ungleichgewicht bei der Sekretion der sezernierten Zytokine bzw. zu einer Überproduktion von TNF-alpha kommt es z.B. im Rahmen des septischen Schocks, der Kachexie oder im Rahmen einiger Autoimmunerkrankungen¹³⁷⁻¹³⁹.

Seine Wirkung übt TNF-alpha über Bindung an TNF-Rezeptoren aus. Hierbei unterscheidet man die beiden Rezeptortypen p55 (Typ I) und p75 (Typ II). Diese findet man mit Ausnahme auf Erythrozyten in allen Körperzellen. Nach Bindung an Ihren Rezeptor können unterschiedlichste Second-messenger Prozesse in Gang gesetzt werden, unter anderem auch die Aktivierung der in dieser Arbeit untersuchten MAP Kinasen.

Lösliche Formen beider Rezeptortypen konnten bei Patienten mit Fieber, Sepsis und malignen Erkrankungen im Serum und im Urin nachgewiesen werden¹⁴⁰⁻¹⁴³. Diese können Tumor-Nekrose-Faktoren binden und die biologischen Aktivitäten dieser Zytokine dadurch neutralisieren. Sie stellen also wahrscheinlich physiologische Inhibitoren der TNF-Wirkung dar.

1.3.3 Interleukin-10

Bei Interleukin-10 (Synonym: CSIF) handelt es sich um ein pleiotropes Zytokin¹⁴⁴⁻¹⁴⁶. Die Hauptfunktion von IL-10 scheint die Limitierung und Terminierung

der inflammatorischen Antwort auf bestimmte Reize sowie die Regulierung der Differenzierung und Proliferation vieler „Immunzellen“ wie T-Zellen, B-Zellen, Natürliche Killerzellen, Mastzellen oder Granulozyten zu sein. Als Zytokin mit sehr potenten antiinflammatorischen Eigenschaften ist es in der Lage, die Sekretion inflammatorischer Mediatoren wie TNF-alpha, Interleukin-1, Interleukin-6 oder Interleukin-8 zu unterdrücken. Das humane Zytokin ist ein Homodimer mit einer Molekülmasse von 37 kDa. Dabei besteht jedes Monomer aus 160 Aminosäuren mit 18,5 kDa. Murines und humanes IL-10 weisen eine ca. 80%-ige Homologie auf. Bis heute konnten zudem eine ganze Reihe viraler Homologe von IL-10 wie Epstein-Barr-Virus (EBV), Herpes-Simplex-Virus (HSV-2) oder Cytomegalievirus (CMV) nachgewiesen werden¹⁴⁷⁻¹⁴⁹.

1.3.4 Interleukin-6

Interleukin-6 wird als wichtigem Zytokin der Akute-Phase-Reaktion eine entscheidende Rolle bei unterschiedlichen biologischen Vorgängen zugeschrieben. Dazu gehören unter anderem die Hämatopoese, die Immunabwehr, die Wundheilung, der Knochenmetabolismus sowie entzündliche Prozesse.

Nach Infektionen und Verletzungen wird das 26 kDa große Zytokin vor allem von Monozyten und Makrophagen, Kupffer-Zellen, Epithelzellen, T-Zellen, B-Zellen, Mastzellen, Neutrophilen, Fibroblasten, Keratinozyten, Endothelzellen, vaskulären glatten Muskelzellen und Osteoblasten sezerniert¹⁵⁰. Die Synthese von IL-6 erfolgt häufig nach Stimulation mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 und TNF-alpha. Auch bakterielle Infektionen bzw. bakterielle Endotoxine oder virale Infektionen können zu einer Freisetzung von IL-6 führen. Neben einer Induktion der Akute-Phase-Proteine CRP und Haptoglobin besitzt IL-6 eine antivirale Wirkung, indem es die vermehrte Sekretion von TNF-alpha und Interleukin-1 hemmt^{151, 152}. Es konnte bereits von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass Interleukin-6 bei Asthmapatienten sowie bei Patienten mit RSV Infektion vermehrt sezerniert wird¹⁵²⁻¹⁵⁴.

1.3.5 Macrophage Inflammatory Protein 1 (MIP-1)

MIP-1 gehört zur Klasse der CC-Chemokine und lässt sich in die beiden Hauptformen MIP-1alpha und MIP-1β differenzieren. Erstmals konnte die Arbeitsgruppe um Sherry 1988 beide Proteine aus dem Überstand einer Makrophagen-Zelllinie isolieren¹⁵⁵, die zuvor mit bakteriellen Lipopolysacchariden stimuliert worden war. Beim Menschen sind beide Gene für CCL-3 und CCL-4 auf Chromosom 17 lokalisiert. Macrophage Inflammatory Protein kann außer von Makrophagen v.a. im Rahmen eines inflammatorischen Prozesses noch von einer Reihe weiterer Zellarten, wie beispielsweise Mastzellen oder Endothelzellen produziert werden¹⁵⁶⁻¹⁵⁸. Nach Sekretion ist MIP-1 in der Lage, die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie TNF-alpha, IL-6 oder IL-1β zu initiieren. Bei Mäusen stellt MIP-1 alpha den Hauptstimulus für eine TNF-Produktion von Makrophagen dar, wohingegen MIP-1beta diesem Effekt antagonistisch entgegenwirkt. Zusätzlich scheinen sowohl MIP-1 alpha als auch MIP-1 beta eine entscheidende Rolle für die Chemotaxis von Leukozyten zu spielen¹⁵⁹. In mehreren in-vivo Studien sowohl beim Menschen als auch bei Mäusen konnte gezeigt werden, dass MIP-1alpha im Rahmen einer Infektion mit RSV vermehrt produziert wird. Dabei waren neben erhöhten Konzentrationen an MIP-1β im Nasen- bzw. Trachealsekret RSV-infizierter Kinder¹⁶⁰ auch bei Mäusen nach RSV-Infektion deutlich erhöhte Konzentrationen an MIP-1alpha nachzuweisen⁷⁷. Genetisch veränderte Mäuse mit fehlendem MIP-1alpha Gen (MIP-1alpha -/-) zeigten darüber hinaus deutlich geringere Inflammation im Bereich der Atemwege nach RSV Infektion als die genetisch unveränderten Mäuse mit vorhandenem MIP-1alpha Gen⁷⁷.

1.3.6 MIP-2 und KC (Keratinocyten Cytokin)

Die beiden murinen Chemokine KC (CXCL1) und MIP-2 (CXCL2) gelten als die vorrangigen Chemoattraktanten, die für die Rekrutierung von neutrophilen Leukozyten verantwortlich sind. Beide Chemokine sind in der Lage an den selben Rezeptor (CXCR2) zu binden¹⁶¹. Die beiden Chemokine sind eng miteinander verwandt und zeigen hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz eine

Übereinstimmung von 65%¹⁶². Darüber hinaus sind sie Homologe der menschlichen GRO Chemokine die funktionell der IL-8 Familie ähneln¹⁶². Neben anderen CXC-Chemokinen wurde die Produktion von KC bereits durch viele unterschiedliche Zellarten beschrieben. Erstmals nachgewiesen wurde KC nach Stimulation von murinen Fibroblasten mit PDGF¹⁶³⁻¹⁶⁵. Auch in Endothelzellen, Epithelzellen und alveoläre Makrophagen konnte bereits eine Sekretion von KC nachgewiesen werden¹⁶⁵. Da es bis heute nicht gelungen ist ein Interleukin-8 Homolog in Mäusen zu identifizieren, geht man davon aus dass es sich bei MIP-2 und KC um die funktionellen Homologe von IL-8 und somit um die wichtigsten proinflammatorischen Chemokine bei der Maus handelt. Mehrere Studien konnten bisher zeigen, dass sowohl KC als auch MIP-2 eine wichtige Rolle bei inflammatorischen Prozessen im Bereich der Lunge von Mäusen darstellen¹⁶⁶. Auch im Rahmen einer Infektion mit RSV wird KC eine Schlüsselposition zugesprochen. Bereits einige Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass KC zu frühen Zeitpunkten nach einer Infektion mit RSV sowohl im Lungengewebe als auch in der bronchoalveolären Lavage von Mäusen den vorherrschenden inflammatorischen Mediator darstellt¹⁶⁷⁻¹⁶⁹. Auch bei Kindern mit RSV Infektion waren deutliche erhöhte Konzentrationen von IL-8 im Plasma und Nasensekret nachzuweisen¹⁷⁰.

1.3.7 Mediatoren im Rahmen der RSV Infektion

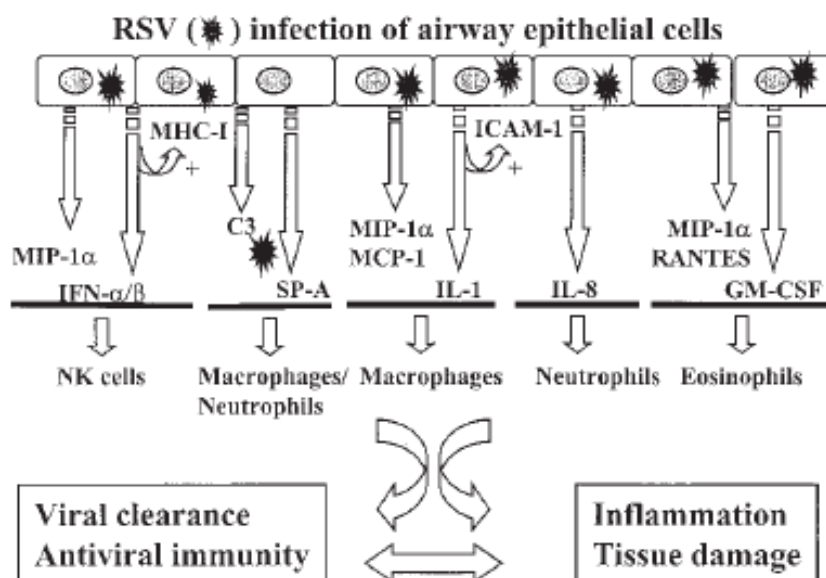
Im Rahmen einer Infektion mit RSV kommt es durch ein komplexes Zusammenspiel mehrerer Zellarten wie z.B. Epithelzellen, Neutrophilen Granulozyten und Makrophagen zur Freisetzung unterschiedlichster Mediatoren, die die Inflammation aufrechterhalten, vorantreiben oder abschwächen können. Bis heute gibt es eine Reihe von Arbeitsgruppen, die die Freisetzung unterschiedlicher Mediatoren wie z.B. IL-1, TNF-alpha, Interleukin-6, Interleukin-8, GRO, MCP-1, MIP-1alpha und RANTES nach RSV in vivo bei Menschen und in Mäusen nachweisen konnten^{77, 110, 171}. Durch diese Mediatoren kommt die für die Inflammation so wichtige Signalvermittlung zwischen den einzelnen Zellen erst zustande. Darüber hinaus konnte gezeigt

werden, dass durch Inhibition der Entzündungskaskade die Ausprägung der RSV-induzierten Pneumonie deutlich reduziert wird.

Im Tiermodell sowie in humanen Zellen konnte bereits eine Produktion von IL-1 β nach RSV-Infektion nachgewiesen werden^{104, 172-175}. Dabei waren es neben Lungenepithelzellen v.a. alveoläre Makrophagen, die nach Infektion mit RSV in der Lage sind IL-1 β freizusetzen. .

Desweiteren konnte bereits die Arbeitsgruppe um Pazdrak einen direkten Zusammenhang zwischen der Aktivierung der p38 MAP Kinase und der Produktion bestimmter Mediatoren nach Infektion mit RSV wie z.B. RANTES⁸⁷ in humanen Zellen (A549) nachweisen.

Ziel dieser Arbeit war es nachzuweisen, welche Rolle IL-1 β bei der RSV-Infektion von Lungenepithelzellen der Maus in-vitro einnimmt. Vornehmliches Augenmerk legten wir dabei auf eine mögliche Aktivierung der Entzündungskaskade durch IL-1 β über Aktivierung von Epithelzellen sowie die Aktivierung der p38 MAP-Kinase.



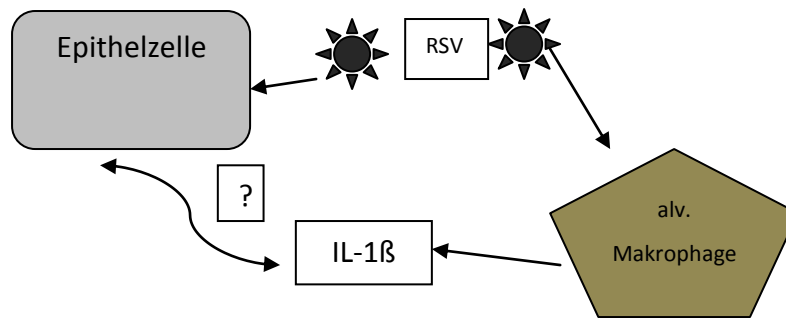


Abbildung 6: Einfluss unterschiedlicher Zytokine bzw. Chemokine im Rahmen der RSV Infektion¹⁷⁶ sowie Darstellung der interzellulären Vernetzung im Rahmen RSV Infektion

1.4. Fragestellung

RSV gilt bis heute als einer der wichtigsten Erreger respiratorischer Infektionen im Kindesalter. Für die Ausprägung und Aufrechterhaltung dieser Infektion spielen unterschiedliche Zelltypen, Mediatoren und intrazellulär ablaufende Stoffwechselfvorgänge eine wichtige Rolle. Im Rahmen dieses komplexen Zusammenspiels ergab sich für uns folgende Fragestellung:

- 1.) Welche Rolle spielt das proinflammatorische Zytokin IL-1 β , das z.B. von RSV-infizierten Makrophagen produziert wird, bei der Infektion von murinen Lungenepithelzellen mit RSV?
- 2.) Welchen Einfluss haben RSV, UV-RSV sowie IL-1 β auf die Aktivierung der p38 MAP Kinase?
- 3.) Welchen Einfluss hat die Neutralisierung von IL-1 β bzw. die Inhibierung der p38 MAP Kinase bei einer Infektion mit RSV?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Insulin	Sigma-Aldrich, St. Louis
holo-Transferrin	Sigma-Aldrich, St. Louis
Natriumselenit	Gibco GmbH, Eggenstein
Hydrocortison	Sigma-Aldrich, St. Louis
β -Estradiol	Sigma-Aldrich, St. Louis
DAPI	Sigma-Aldrich, St. Louis
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, St. Louis
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, St. Louis
Natriumbicarbonat	Sigma-Aldrich, St. Louis
Glucose	Sigma-Aldrich, St. Louis
HEPES	Sigma-Aldrich, St. Louis
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, St. Louis
2-Mercaptoethanol 90%	Sigma-Aldrich, St. Louis
Murines IL-1 β (0,1mg/ml)	Sigma-Aldrich, St. Louis
Aprotinin (1mg/ml gelöst in H ₂ O)	Sigma-Aldrich, St. Louis
Benzamidin (1mg/ml gelöst in H ₂ O)	Sigma-Aldrich, St. Louis
Pepstatin (1mg/ml gelöst in Methanol)	Sigma-Aldrich, St. Louis
Leupeptin (1mg/ml gelöst in H ₂ O)	Sigma-Aldrich, St. Louis
EDTA (100nM Lösung in H ₂ O, pH 7,4)	Sigma-Aldrich, St. Louis
PMSF (200nM Lösung in Isopropanol)	AppliChem, Darmstadt
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, St. Louis
NP-40 (10 % Lösung in H ₂ O)	Biovision, USA
Na-deoxycholat (10 % Lösung in H ₂ O)	Sigma-Aldrich, St. Louis
Protein Assay	Bio-Rad, München
Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis
30 % Acrylamid	Biorad, München

Material und Methoden

TEMED	Biorad, München
Ammonium Persulfat (APS)	Biorad, München
10 x Tris/Glycine/SDS Puffer	Biorad, München
Natriumdodecylsulfat	Merck, Darmstadt
10x Tris-Glycine Buffer (Transfer Puffer)	Biorad, München
Methanol	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Töpfer, Dietmannsried
Proteinstandard RPN 800	Amersham, Schweden
3 x SDS Proben Puffer	
Tween 20	Merck, Darmstadt
TBS 1x	
Magermilchpulver	Töpfer GmbH, Dietmannsried
Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)	Roche, Basel
5-Brom-4-chlor-3-idolyl-phosphat (BCIP)	Roche, Basel
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich, St. Louis
Tween-20	Merck, Darmstadt
ELISA-Kits DUO-SET (mTNF-alpha, mIL-1 β , mMIP-1alpha, mMCP 5, mMIP-1 β , mInterleukin 6, mKC, mMIP-2, mL-10)	R & D Systems, Minneapolis

Antikörper:

Anti-mouse IL-1 β Antikörper	R & D, Minneapolis
p-p38 (Tyr 182) rabbit IgG Antikörper	Santa Cruz, USA
p-38 monoclonal mouse IgG Antikörper	Santa Cruz, USA
Goat F(ab) ₂ Anti-Mouse Antikörper	Biosource, USA
Goat F(ab) ₂ Anti-Rabbit Antikörper	Biosource, USA
P38 MAP Kinase Assay Kit	CellSignaling, USA

RS-Virus:

Bei dem verwendeten RS-Virus handelte es sich um ein Geschenk von Prof. Garofalo, Department of Pediatrics, The University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas, USA. Die Virus-Konzentration der Proben betrug $1,15 \times 10^6$ PFU/ μ l

2.1.2 Geräte und Hilfsmittel

Sterile Werkbank:	Hanau LaminAir	Heraeus, Hanau
Brutschrank:	Hanau Cytoperm 2	Heraeus, Hanau
Mikroskop:	Leica DMIL	Leica, Solms
Fluoreszenz-Mikroskop:	Leitz DM IRV	Leitz, Wetzlar
Zentrifuge:	Hanau Megafuge 1,0R	Heraeus, Hanau
Feinwaage:	HR-120 EC	A&D Instr., Ahrensburg
Pipettiergerät:	Pipettboy acu	Integra GmbH, Fernwald
Pipetten:	1-10 μ l	Eppendorf AG, Hamburg
	10-100 μ l	Eppendorf AG, Hamburg
	100-1000 μ l	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen:		Eppendorf AG, Hamburg
Stripettenspitzen, steril:	1, 5, 10, 25, 50 ml	Nunc GmbH, Wiesbaden
Zellschaber:	Cell lifter	Corning, Wiesbaden
Sterile Falcon Röhrchen:	15 ml Blu max jr.	Nunc GmbH, Wiesbaden
	50 ml Blu max	Nunc GmbH, Wiesbaden
Röhrchenständer:		Nalgene, Rochester, USA
Neubauer-Zählkammer:		Brand, Wertheim
Sterile Latexhandschuhe:	Safe Skin	Kimberly & Clark, Koblenz
Reaktionsgefäße:	1,5 ml	Greiner, Nürtingen
	0,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Photometer:	Ultrospec 3000 pro	Amersham, Schweden
Einmalküvetten:		Corning, Wiesbaden
Rührer RH-Basic		IKA-Werke, Staufen

Material und Methoden

75 cm ² Zell-Kulturflaschen		TPP, Schweiz
Gelkassetten 1,5 mm		Biorad, München
Gelkämme 1,5 mm		Biorad, München
Cell SureLock Mini-Cell		Biorad, München
Netzgerät Power Pac 1000		Biorad, München
Schaumstoffschwimmer		Biorad, München
Thermoblock:	Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg
Wasserbad:	GFL 1038	
Einschweißgerät:	Impulse sealer	TEW, Taiwan
Minicentrifuge:	Micro Centrifuge	Roth, Karlsruhe
Vortexer:	Vortex-Geni 2	Scientific Industries, USA
Bechergläser		Schott AG, Mainz
Erlenmeyerkolben		Schott AG, Mainz
Messzylinder		Schott AG, Mainz
Waage:	PK 4800	Mettler-Toledo, Albstadt
pH-Meter:	Microprocessor ph-Meter	WTW, Weilheim
Sterilfilter:	Cellulose 22 µm	Corning, Wiesbaden
Mehrkanal-Pipetten:		Eppendorf AG, Hamburg
Transferkammer		Biorad, München
3mm Filterpapier		Biorad, München
PVDF Membran		Biorad, München
Membranwippe	Speci-Mix	Bioblock-Scientific
ELISA-Washer		Tecan, Österreich
96-well ELISA Platten		Corning, Wiesbaden
Elisa Reader		Dynatech, Denkendorf

2.1.3 Fertiglösungen und selbst hergestellte Lösungen

Fetales Kälberserum (FCS)

PAA Laboratories, Cölbe

Das fetale Kälberserum (FCS) wurde bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und zur Inaktivierung des Komplementsystems und Zerstörung kreuzreagierender Immunglobuline durch 30-minütige Inkubation bei 56 °C hitzeinaktiviert und anschließend bei -20 °C portioniert auf 10 ml und 50 ml aufbewahrt.

Antibiotikum/Antimykotikum Lösung

Sigma-Aldrich, St. Louis

Diese diente dazu, das Kontaminationsrisiko der kultivierten Zellen zu reduzieren. Enthalten waren Penicillin und Streptomycin als Antibiotika sowie Amphothericin als Antimykotikum.

Accutase

PAA Laboratories, Cölbe

Accutase ist ein proteolytisches und collagenolytisches Enzym, das dazu entwickelt wurde Zellen sehr schonend von Zellkulturoberflächen abzulösen. Die Vorteile der Accutase verglichen mit Trypsin-EDTA liegen insbesondere in der Erhaltung der Oberflächenepitope und in einem schnelleren Anwachsen der gelösten Zellen im neuen Medium.

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS-)

Gibco GmbH, Eggenstein

(ohne Calcium, Mg, Natriumbicarbonat)

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS+)

Gibco GmbH, Eggenstein

RIPA (Radioimmunoprecipitation) Puffer wurde folgendermaßen unter stetigem Rühren hergestellt und in 15 ml Röhrchen bei -20°C eingefroren.

Anleitung für 100 ml Puffer:

790 mg Tris-HCl

+ 75 ml Aqua dest.

+ 900 mg NaCl

+ 10 ml 10% NP-40 → mit HCl auf pH 7,4 bringen

+ 2,5ml 10% Na-deoxycholat

+ 1ml der 100nM EDTA Lösung

Auffüllen des Puffers auf 100 ml mit Aqua dest.

Vor Gebrauch des RIPA-Puffers bei der Gesamtproteingewinnung müssen zu 1 ml Puffer folgende Proteaseinhibitoren frisch zugegeben werden:

1 μl Aprotinin (1mg/ml gelöst in H_2O)

1 μl Benzamidin (1mg/ml gelöst in H_2O)

1 μl Pepstatin (1mg/ml gelöst in Methanol)

1 μl Leupeptin (1mg/ml gelöst in H_2O)

5 μl PMSF (200nM in Isopropanol)

Puffer für Sammelgel (Lower Buffer) :

0,5 M Tris-HCl (30,3 g)

0,4 % Natriumdodecylsulfat (SDS) (2 g)

auffüllen mit 500 ml Aqua dest. und auf pH = 6,8 bringen

Puffer für Trenngel (Upper Buffer):

1,5 M Tris-HCl (90,85 g)

0,4 % Natriumdodecylsulfat (SDS) (2 g)

auffüllen mit 500 ml Aqua dest. und auf pH = 8,8 bringen

1 x Tris-Glycine/SDS-Buffer

900 ml Aqua dest

100 ml 10x Tris-Glycine/SDS-Buffer)

Transfer-Buffer

100 ml 10x Tris-Glycine Buffer

+ 200ml Methanol

+ 700 ml Aqua dest)

1x TBS

10 ml 10x TBS

+ 90 ml Aqua dest.

Detektionspuffer

Tris Base ph 9,5 1M 50ml

+ NaCl 5M 10 ml

+ Aqua bidest 440 ml

Lösungen für ELISA:

PBS:

8,0 g NaCl

0,2 g KCl in 1l Aqua bidest pH 7,2 – 7,4

1,44 g Na₂HPO₄

0,2 g KH₂PO₄

Waschpuffer: 0,05% Tween-20 in PBS

Blockpuffer: 1 % BSA + 5% Sucrose + 0,05% NaN₃ in PBS

Verdünnung: 1% BSA in PBS

Stopplösung: 2 N H₂SO₄

Substratlösung: H₂O₂ + Tetramethylbenzidine (1:1)

Alle Chemikalien und Substanzen, die nicht extra mit dem Namen der Herstellerfirma versehen sind, stammte von der Firma Merck, Darmstadt.

2.2. Zellkultur

2.2.1 Zelllinien

Für die Durchführung der Versuche wurden 3 Zelllinien der Maus kultiviert. Bei zwei der Zelllinien handelte es sich um Lungenepithelzellen der Maus, bei der dritten um alveolare Makrophagen der Maus:

MH-S Zellen (ATCC-Nr.: CRL-2019)

MH-S Zellen sind SV40 transformierte (adherent cell angereicherte) alveoläre Makrophagen der Maus. Als typische morphologische Eigenschaften der Makrophagen besitzen sie die Fähigkeit zur Adhärenz und Phagozytose. Desweiteren sind sie Esterase positiv und Peroxidase negativ

MLE-12 Zellen (Murine Lungenepithel-Zellen; ATCC-Nr.: CRL-2110)

MLE-12 Zellen wurden 1992 von K. A. Wikenheiser aus Lungentumoren transgenetischer weiblicher Mäuse gewonnen. Bei diesen Zellen handelt es sich um eine pulmonare Adenocarcinom-Zelllinie. Die SV 40 (Simian Virus 40) transformierten Zellen repräsentieren das distale Bronchial- und Alveolarepithel des Respirationstrakts bzw. Typ II Alveolarzellen.

LA-4 Zellen (Epitheliale Lungenadenomzellen, ATCC-Nr.: CCL-196)

Diese Zellen wurden 1975 von G. Stoner aus Urethan induzierten Lungenadenomen von Mäusen gewonnen (Stoner et al., 1975).

2.2.2 Zellkulturmedien

MH-S Medium :

Dulbecco's Medium RPMI 1640

Gibco GmbH, Eggenstein

MLE-12 Medium:

Dulbecco's Medium Ham's F12 50:50

Gibco GmbH, Eggenstein

LA-4 Medium :

Dulbecco's F12K Nutrient Mixture
(Kaighn's Modification)

Gibco GmbH, Eggenstein

Die verwendeten Grundmedien enthielten anorganische Salze, Aminosäuren, Vitamine, Glucose und den Farbindikator Phenolrot, der Veränderungen des pH-Wertes mittels Farbumschlag anzeigte. Bei steigendem pH-Wert kommt es zu einer rot-violett Färbung, ein Absinken des pH-Wertes in den sauren Bereich (z.B. bei hoher Stoffwechselaktivität der Zellen und somit hohem CO₂-Gehalt) wird durch einen Umschlag ins Gelbe angezeigt.

Für ein optimales Gedeihen der Zellen in vitro, mussten den Grundmedien einige Substanzen zugefügt werden:

MLE-12 Medium:

500 ml Dulbecco's Medium Ham's F12 50:50 wurde supplementiert mit:

- 2 % (10 ml) hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum
- 1 % (5ml) Antibiotikum/Antimykotikum Lösung
- 0,005 mg/ml Insulin
- 0,01 mg/ml holo-Tranferrin
- 30 nM Natriumselenit
- 10 nM Hydrocortison

- 10 nM Beta-Estradiol

LA-4 Medium

Zu 500 ml Dulbecco's F12K Nutrient Mixture wurden folgende Zusätze zugegeben:

- 20 % (100ml) hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FCS)
- 1 % (5 ml) Antibiotikum/Antimykotikum Lösung

MH-S Medium

Zu 500 ml RPMI 1640 Medium werden zugegeben:

- 2 mM L-Glutamin
- 0,75 g Natriumbicarbonat
- 2,25 g Glucose
- 10 mM HEPES
- 1,0 mM Natriumpyruvat
- 0.05 mM 2-Mercaptoethanol 90%
- 10% (50ml) hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FCS)
- 1% (5ml) Antibiotikum/Antimykotikum Lösung

Die Zellkulturmedien wurden bis zur Verwendung im Kühlschrank bei 4°C unter sterilen Bedingungen gelagert.

2.2.3 Zellkulturmethoden und -bedingungen

Allgemeines

Die 3 unterschiedlichen Zellkulturen wurden im Brutschrank bei für die Zellen optimalen 37°C, 5% CO₂ Atmosphäre und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Alle im Folgenden beschriebenen Arbeiten im Umgang mit den Zellen

wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt, um eine Kontamination der Zellen mit Mikroorganismen zu vermeiden. Alle Arbeitsschritte wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt und es wurden ausschließlich sterile bzw. sterilisierte Materialien verwendet. Desweiteren wurden alle Arbeiten mit desinfizierten Latexhandschuhen durchgeführt um den Kontakt des Laborpersonals mit kontaminierten Materialien oder Chemikalien zu vermeiden.

Auftauen der Zellen

Die bei -70°C tiefgefrorenen Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C schnell aufgetaut und ca. 1 min geschwenkt. Danach wurde die Zellsuspension in 20 ml vorgewärmtes Medium pipettiert und das Röhrchen für 10 min bei Raumtemperatur und 800 Umdrehungen / min zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in frischem Kulturmedium in eine neue Kulturflasche überführt.

Da das Einfriermedium der Zellen zusätzlich zu 95% Kulturmedium 5 % DMSO als Kryopräservativ enthielt, musste um den Zelltod durch Eiskristallbildung und Zerstörung der Zellmembran zu vermeiden relativ zeitnah nach der Aussaat der Zellen ein erneuter Mediumwechsel erfolgen.

Subkultivierung der Zellen

Bei Konfluenz der Zellen, d.h. bei vollständiger Besiedlung (Monolayer) des Kulturflaschenbodens (längeres Wachstum führt zur Kontaktinhibition der Zellen) etwa alle 2-3 Tage wurde das verbrauchte Kulturmedium vorsichtig abpipettiert und die Zellen mit 15 ml PBS(-) gewaschen. PBS(-) sorgte dabei durch das fehlende Calcium und Magnesium für ein Herabsetzen der Zelladhärenz am Flaschenboden.

Durch die Zugabe von 5 ml Accutase pro 75 cm^2 Kulturflasche und Inkubation im Brutschrank für ca. 4-5 min kam es zur enzymatischen Ablösung der Zellen vom Flaschenboden. Nicht abgelöste Zellen wurden vorsichtig mit dem Zellschaber vom Boden gelöst. Nach Zugabe von 7 ml frischem Medium zum

Accutase-Zell-Gemisch wurden die gelösten Zellen im Verhältnis $\frac{1}{4}$ auf neue Kulturflaschen mit ca. 20 ml Kulturmedium aufgeteilt und weiter kultiviert.

Mykoplasmentest

Um eine Kontamination der Zellen mit Mykoplasmen auszuschließen, die oft gegen die zum Kulturmedium zugegebenen Antibiotika resistent sind, wurden die Zellkulturen regelmäßig mittels DAPI (4',6 Diamidino-2-Phenylindole)-Fluoreszenz-Färbung untersucht. Dazu wurden die Zellen mit PBS – gewaschen, für 5 min bei Raumtemperatur mit 80 % Aceton fixiert und anschließend mit DAPI (1:20 000 in PBS (–) verdünnt) angefärbt.

DAPI bindet selektiv an Adenin/Thymin reiche Desoxyribonukleinsäure. Durch Bildung fluoreszierender DNS-DAPI-Komplexe hoher Spezifität lassen sich Mykoplasmen bei der fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung (Absorptionsmaximum 340 nm, Emissionsmaximum 488 nm) zuverlässig nachweisen. Bei Mykoplasmen negativen Zellen fluoreszieren ausschließlich die Zellkerne der kultivierten Epithelzellen in leuchtendem grünblau, Mykoplasmenbefall hingegen zeigt sich durch Anfärbung des Zytoplasmas.

Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl pro Kulturflasche wurde mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit Accutase vom Flaschenboden gelöst und gut suspendiert. 50 µl dieser Zellsuspension wurden mit 50 µl Trypanblau gemischt. Bei Trypanblau handelt es sich um einen sauren Farbstoff, dessen Anion an Zellproteine bindet. Trypanblau kann bei toten Zellen durch die Zellwand in das Zellinnere eindringen und färbt es dunkelblau an. Lebende Zellen hingegen erscheinen hell.

Die Zellsuspension / Trypanblau-Mischung wurde mittels einer Pipette am Deckgläschenrand auf die Zählkammer aufgesetzt und durch Kapillarkräfte in den Zwischenraum zwischen Deckglas und Kammer gesaugt. Im Anschluss wurden die Zellen in den 4 Eckquadraten (à 16 Quadrate) der Zählkammer ausgezählt die zusammen ein Volumen von 0,4 µl haben. Um die Zellzahl pro ml zu erhalten musste folgende Berechnung durchgeführt werden.

(Zellzahl in den 4 Eckquadraten) / 4 x 10x Verdünnungsfaktor x 10³ = Zellzahl/ml

Bsp.: Zellzahl in den 4 Eckquadraten = 120

→ $120/4 \times 10 \times 2 \times 10^3 = 6 \times 10^5$ Zellen/ml

2.3 Zellstimulation

2.3.1 Stimulation der MLE-12 und LA-4 Zellen mit mL-1 β

Stimulationszeiten

Für die Versuche mit MLE-12 und LA-4 Zellen wurden folgende Probenzeitpunkte ausgewählt:

Kontrolle (ohne IL-1 β), 15 min, 30 min, 1 Stunde, 6 Stunden

Interleuki-1 β -Konzentration:

Zur Stimulation der kultivierten Zellen wurde eine Konzentration an IL-1 β von 2ng/ml verwendet

Vorgehen

Bei etwa 90 %-iger Konfluenz der Zellen wurde das FCS haltige Kulturmedium unter sterilen Bedingungen vorsichtig abpipettiert, die Zellen mit 15 ml PBS (+) gewaschen und anschließend mit FCS freiem Kulturmedium (0% Medium) versetzt.

Nach 24 Stunden in 0% Medium wurde mit der Stimulation der Zellen begonnen. Um die gewünschte Zytokinkonzentration von 2 ng/ml zu erreichen wurde die Stock-Lösung von IL-1 β wie folgt verdünnt:

1 μ l Interleukin Stocklösung + 9 μ l H₂O

Im sich ergebenden Volumen von 10 μ l befanden sich 100 ng IL-1 β .

Da die Zellen während der Stimulation mit 10 ml Medium bedeckt wurden, mussten $10 \times 2 \text{ ng} = 20 \text{ ng}$, entsprechend also $2 \mu\text{l}$ der verdünnten Lösung zugegeben werden.

2.3.2 Infektion der MLE-12 Zellen mit Respiratory Syncytial Virus (RSV) und UV-inaktiviertem Respiratory Syncytial Virus (UV-RSV)

Benötigte Virusmenge

Ziel bei der Berechnung der Infektionsdosis war das Erreichen einer „Plaque forming unit“ (PFU) pro Zelle (entspricht MOI 1).

Unter PFU versteht man die Menge an Virus, die in der Lage ist im Zellrasen einen einzelnen Plaque zu bilden.

Die Viruskonzentration in den bei -70°C gelagerten RSV-Stocklösungen betrug in unserem Fall $1,15 \times 10^6 \text{ PFU}/\mu\text{l}$.

Zur Berechnung des benötigten Stock-Lösung Volumens musste die pro Zellkulturflasche bestimmte Anzahl an Zellen durch die Viruskonzentration geteilt werden.

Bsp.: $4,6 \times 10^6 \text{ Zellen/Flasche} \rightarrow$ ergab ein benötigtes Virusvolumen von $4 \mu\text{l}$

Infektionszeiten

1 Stunde, 6 Stunden, 12 Stunde, 24 Stunden

UV-Inaktivierung des Respiratory Syncytial Virus

Die bei -70°C tiefgefrorenen Viren wurden auf Eis für 10 min unter der sterilen Werkbank mit einer UV-Lampe im Abstand von etwa 6-8 cm bestrahlt. Diese Bestrahlung führte zu einer Inaktivierung, d.h. zu einem Verlust der Replikationsfähigkeit der RS-Viren.

Infektionsvorgang

Vor Beginn der Infektion bei etwa 90 %-iger Konfluenz der Zellen wurden 2-3 Flaschen an zusätzlich herangezogenen MLE-12 Zellen ausgezählt um eine

möglichst genau Berechnung der notwendigen Virusmenge durchführen zu können.

Alle für die Infektion benötigten Flaschen wurden 8 Stunden vor Infektionsbeginn mit 10 ml 0% Medium versetzt.

Alle Arbeitsschritte mit RSV sowie UV-RSV wurden auf Eis durchgeführt.

Das 0% Medium wurde vorsichtig abgegossen. Zu 1 ml FCS-freiem Medium (FCS haltiges Medium kann zu einer Bindung des Virus und somit zur Inaktivierung führen) wurde auf Eis die berechnete Menge an RSV (bzw. UV-RSV) zugegeben und anschließend in die Kulturflasche pipettiert.

Nach vorsichtigem Schwenken der Flasche, um ein Bedecken aller Zellen mit virushaltigem Medium zu gewährleisten wurde die Flasche für 1 Stunde im Brutschrank inkubiert und dabei alle 15-20 min erneut geschwenkt. Nach Ablauf einer Stunde wurden weitere 4 ml 0% Medium (Gesamtvolumen: 5 ml) zugegeben und die Flaschen für die verbleibende Zeit zurück in den Brutschrank gestellt.

2.3.3 Inkubation von MLE-12 Zellen mit p38 MAP Kinase Inhibitor (SB 203580) und anschließende Infektion mit RSV

Bei nahezu vollständiger Konfluenz der MLE-12 Zellen wurden diese für 8 Stunden mit FCS-freiem Medium versetzt und über die gesamte Zeit im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der 8-stündigen Inkubation wurde das Medium abgegossen und die Zellen für 1 Stunde mit p38 MAP Kinase Inhibitor (SB 203580) inkubiert.

Die Zellen wurden dabei mit unterschiedlichen Konzentrationen des Inhibitors versetzt, was eine vorherige Verdünnung der 1mM Inhibitor-Ausgangslösung nach folgendem Schema erforderlich machte:

Ausgangslösung (µl)	FCS freies Medium (µl)	Endkonzentration Inhibitor
10	990	10 µM
50	950	50 µM

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die MLE-12 Zellen äquivalent zu Versuch 2.3.2 für eine weitere Stunde mit RS-Virus infiziert und danach sowohl der Überstand als auch die Zellen gewonnen und bei -20°C eingefroren.

2.3.4 Kultivierung von MLE-12 Zellen mit den Überständen RSV infizierter MH-S Zellen mit und ohne Anti-Maus IL-1β Antikörper

Infektionsvorgang der MH-S Zellen (Makrophagen)

Vergleichbar der Infektion von MLE-12 Zellen wurden MHS-Zellen nach 8-stündiger Inkubation in FCS freiem Medium für 24 Stunden mit RS-Virus (MOI 1) infiziert und nach Ablauf der Infektionszeit der Überstand unter sterilen Bedingungen gewonnen und in 15 ml Röhrchen abgefüllt.

Um einer Veränderung der Zytokin- und Chemokinkonzentration im Überstand entgegen zu wirken wurden die gewonnenen Proben sofort bei -20°C tiefgefroren.

Befreiung der MH-S Überstände von festen Bestandteilen und replikationsfähigem Virus

Nach dem Ende der Infektion enthielten die gewonnenen Überstände noch feste Zellbestandteile (z.B. abgestorbene oder nicht adhärente Zellen) und replikationsfähigen RS-Virus. Zur Entfernung von Zellmaterial wurden die

Überstände bei 0°C für 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert und im Anschluss der zellfreie Überstand unter sterilen Bedingungen abpipettiert und in neue Probenröhrchen transferiert.

Zur Inaktivierung der noch replikationsfähigen RS-Viren im Überstand wurden die Proben nach Zentrifugation in sterile Petrischalen pipettiert und für 10 min mit UV-Licht bestrahlt. Auch hier erfolgten entsprechend den vorherigen Versuchen mit RSV alle Schritte auf Eis.

Inkubation der MLE-12 Zellen (Epithelzellen) mit behandeltem Überstand

Vor Beginn der Inkubation wurden mittels ELISA die Konzentration an mL-1 β im Überstand der RSV infizierten MH-S Zellen bestimmt um die benötigte Menge an Anti-mouse IL1 β -Antikörper zur Neutralisation berechnen zu können.

Die durchschnittliche Konzentration an mL-1 β im Überstand lag bei 81 pg/ml (Mittelwert aus 3 unabhängigen Versuchen). Die Maximalkonzentration von IL-1 β lag bei 100 pg/ml.

Berechnung der benötigten Antikörpermenge:

Die Konzentration der Antikörper-Stocklösung betrug 100 ng/ μ l.

0,015 μ g/ml Antikörper neutralisieren 50 pg mL-1 β

Da jede Zellkulturflasche mit 3 ml Überstand inkubiert wurde, gingen wir von einer maximalen Konzentration an mL-1 β von 300 pg in diesem Volumen aus, die durch 0,09 μ g Anti-mouse IL-1 β Antikörper (gerundet 0,1 μ g) neutralisiert werden können. Daraus ergab sich, dass pro 3 ml Überstand 1 μ l Antikörper zugesetzt werden musste. Die Überstände wurden für 1 Stunde im Kühlraum bei 4°C gedreht um die bestmögliche Neutralisierung von mL1 β zu gewährleisten.

Die MLE-12 Zellen wurden im Anschluss für 15 min mit den Überständen im Brutschrank inkubiert.

Neben den Überständen von RSV infizierten MH-S Zellen mit Anti-mouse IL-1 β Antikörper wurden zusätzlich Überstände ohne Antikörper sowie Kontrollüberstände (24 –stündige Inkubation von MH-S Zellen ohne RSV Infektion) verwendet.

2.4 Gesamtproteingewinnung und Gewinnung der Zellüberstände für die ELISAS

Anleitung

Nach Beendigung der Stimulation wurden die Zellkulturflaschen aus dem Brutschrank entnommen und sofort aus Eis gestellt um ein Voranschreiten der Stimulation bzw. Infektion zu vermeiden. Die Überstände der Flaschen (für die ELISA Versuche) wurden in auf Eis vorbereitete 15 ml Falcon Röhrchen abgekippt, anschließend auf 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt und bei -20 °C tiefgefroren. In die vom Überstand befreiten Kulturflaschen wurde je 1 ml RIPA-Puffer (inklusive Proteaseinhibitoren) pipettiert. Mittels Zellschaber wurden die adhärenen Zellen vollständig abgelöst und das RIPA-Puffer/Zell-Gemisch in auf Eis vorbereitete 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt.

Die alliquotierten Proben wurden für 20 min bei 4°C im Kühlraum gedreht und anschließend für 15 min bei 4°C und 13 000 Umdrehungen/min zentrifugiert, um ein Absetzen der festen Zellbestandteile zu ermöglichen. Nach Abschluss der Zentrifugation wurden die Überstände in 500 μ l Reaktionsgefäße pipettiert und bei -20°C tiefgefroren.

Bestimmung der Proteinkonzentration mittels photometrischer Messung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen der einzelnen Versuchsproben wurde zunächst eine Standardmesskurve mit bovinem Serumalbumin (BSA) hergestellt. Dabei wurden 6 Küvetten mit jeweils 800 µl Aqua dest und 200 µl Protein Assay befüllt. Nach Zugabe von 0 – 5 µl BSA der Konzentration 1µg/µl wurde die Standardkurve mittels photometrischer Bestimmung bei 540 nm nach der Bradford-Methode ausgemessen.

Pro Probe wurden anschließend 2 Küvetten mit 800 µl Aqua dest. und 200 µl Protein Assay vorbereitet und je 1 µl der zu messenden Proben zugegeben. Durch die Doppelbestimmung der Proben konnten Messfehler reduziert werden.

2.5 Western Blot

2.5.1 Elektrophorese

Herstellung der Elektrophorese-Gele

Trenngel 10 % (Menge für 2 Gele):

6,65 ml Acrylamid

5,4 ml Puffer für Trenngel

7,95 ml Aqua dest.

100 µl Ammoniumpersulfat (0,1g/ml)

40 µl TEMED

Nach Zugabe von APS und TEMED kommt es zur Polymerisation des Gels. Die Lösung wurde bis ca. 1,5 cm unterhalb der Oberkante in die Gelkassette eingefüllt und vorsichtig mit Wasser überdeckt um ein Austrocknen des Gels zu

verhindern. Die Polymerisationszeit betrug ca. eine Stunde bei Raumtemperatur.

Sammelgel 5 % (Menge für 2 Gele):

1,0 ml Acrylamid

1,52 ml Puffer für Sammelgel

3,48 ml Aqua dest.

24 μ l Ammoniumpersulfat (0,1g/ml)

8 μ l TEMED

Nach Beendigung der Polymerisation des Trenngels wurde das übergeschichtete Wasser vorsichtig abgekippt und das Sammelgel in die Kammer hinein pipettiert. Im Anschluss daran wurde der Gelkamm in das noch flüssige Sammelgel eingefügt, wodurch die zum Befüllen notwendigen Geltaschen entstanden. Die Polymerisationszeit betrug auch hier etwa 1 Stunde.

Prinzip der Proteinauftrennung

SDS (Natriumdodecylsulfat) ist ein Detergens, das sich an Proteine anlagert und diese denaturiert. Die resultierenden Komplexe erhalten durch die Sulfatgruppen eine gleichmäßig verteilte negative Ladung. Die Laufgeschwindigkeit der Proteine im Gel ist nun nur noch von der relativen Molekülmasse abhängig.

Um eine schärfere Bandentrennung zu erreichen wird über das Trenngel ein Sammelgel gegossen. Die Matrix im Sammelgel besitzt größere Poren und einen anderen pH-Wert als das Trenngel. Darin wandern die Proteine schnell und ohne eine Auftrennung als scharfe Bande in einem Gebiet hoher Feldstärke. Mit Erreichen der Grenzfläche zum Trenngel wird ihre Geschwindigkeit drastisch, und nun abhängig von der Größe, verringert. Große Proteine wandern wenig, kleine dagegen weit im Trenngel nach unten.

Vorbereitung der Proben für Elektrophorese

Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

Von allen Proben, bei denen p38 und phosphoryliertes p38 bestimmt werden sollte, wurde das Volumen für 20 µg Protein berechnet und in 0,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und die verschiedenen Volumina mit eiskaltem RIPA-Puffer auf das gleiche End-Volumen gebracht.

Zu jeder Probe wurde zusätzlich die Hälfte des Probenvolumens (incl. RIPA-Puffer) an 3x Proben Puffer + DTT (Verhältnis 6:1) zugegeben, die Proben gut gemischt und bei 100°C für 3 min im Wasserbad gekocht. Im Anschluss daran erfolgte die vorsichtige Beladung des Elektrophoresegels mit den äquimolaren Probenmengen sowie dem Proteinstandard RPN 800. Die Auftrennung der Proteine erfolgte für 80 min bei einer konstanten Spannung von 150 V in - mit vorher auf etwa 4°C gekühlten - Running-Buffer (100ml 10x Tris Glycine/SDS Puffer + 900 ml Aqua dest.)

Die Vorbereitung der Proben für die Bestimmung der p38 MAP Kinase Aktivität erfolgte streng nach beigefügter Anleitung des Komplett-Kits

2.5.2 Transfer der Proteine vom Gel auf PVDF Membran

Nach vollständiger Elektrophorese wurde das Gel vorsichtig aus den Gelkassetten entnommen und auf die bereits für 3 min in Methanol getränkte und anschließend in Transfer-Buffer getauchte Membran gelegt.

Dieser Schritt erfolgte besonders vorsichtig um ein Knicken der PVDF Membran (Membran auf Teflonbasis) zu verhindern. Knicke würden bei der Immundetektion eventuell zu Farbeinschlüssen führen und ein Auswerten der Proteinbanden sehr erschweren.

Das Gel und die PVDF Membran wurden nach folgendem Schema in die Transfer-Kammer eingebracht:

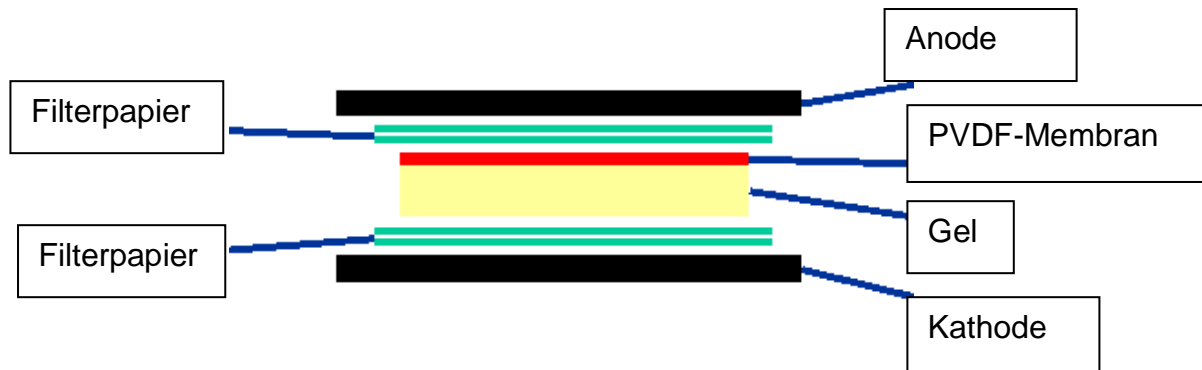


Abbildung 7: Schema zur Befüllung der Transfer-Kammer

Die Befüllung der Transferkammer erfolgte mit ca. 2 Litern eiskaltem Transfer-Buffer. Darüber hinaus wurde die Transferkammer zusätzlich in eine Wanne mit Eis gestellt um ein starkes Erhitzen während des Transfers zu verhindern. Die Übertragung der Proteine erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V für 85 min

2.5.3 Immundetektion

Nach erfolgreichem Transfer der Proteine vom Elektrophoresegel auf die PVDF-Membran wurde diese für 30 min unter stetigem schwenken in 1x TBS / 0,1% Tween-20 / 5% Trockenmilchpulver (TBST) geblockt. Die unspezifischen Milchproteine binden an die PVDF-Membran und verhindern so ein unspezifisches Binden des zur Detektion verwendeten Antikörpers. Nach diesem Blockschritt wurden die Membranen 3 malig für 5 min in 1x TBS / 0,1% Tween-20 gewaschen.

Bestimmung von p-p38 und p38

Die Verdünnung der benötigten Erstantikörper erfolgte (bis auf die Versuche zur Bestimmung der p38 MAP Kinase Aktivität; hier Durchführung laut Herstellerangaben) mit TBST in folgendem Verhältnis:

p-p38 (Tyr 182) polyclonal rabbit IgG Antikörper	1: 500 in TBST
p-38 monoclonal mouse IgG Antikörper	1: 1000 in TBST
Goat F(ab) ₂ Anti-Mouse Antikörper	1: 20000 in TBST
Goat F(ab) ₂ Anti-Rabbit Antikörper	1: 15000 in TBST

Die Inkubation der Membranen im Erstantikörper erfolgte in Plastiktüten eingeschweißt (um ein Austrocknen durch Verdunstung zu vermeiden) über Nacht bei 4°C auf der Wippe im Kühlraum.

Im Anschluss an diesen Schritt wurden die Membranen 3 x für 5 min TBST gewaschen um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Die Inkubation im mit alkalischer Phosphatase markierten Zweitantikörper fand für 1 Stunde bei Raumtemperatur statt.

Auch nach der Inkubation im 2. Antikörper erfolgten 3 Waschschrte in TBST. Zur Vorbereitung auf den letzten Schritt – die Detektion – wurden die Membranen nach den Waschschrten für 10 min in Detektionspuffer eingelegt.

Bestimmung der p38 MAP Kinase Aktivität

Hier wurde ein Komplett-Kit der Firma CellSignaling verwendet und alle Versuchsschritte genau nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Dabei wurde von jeder Probe 200 µg mit Immobilized Phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182) Monoclonal Antikörper versetzt und über Nacht bei 4°C unter stetigem Drehen inkubiert. Am darauf folgenden Tag erfolgte die Zugabe von ATF-2 Fusion Protein, ATP sowie Kinase Buffer zu den immunpräzipitierten Pellets. Durch die aktivierte p38 MAP Kinase kommt es zur Phosphorylierung des ATF-2 Fusion Proteins am Thr71- Ende.

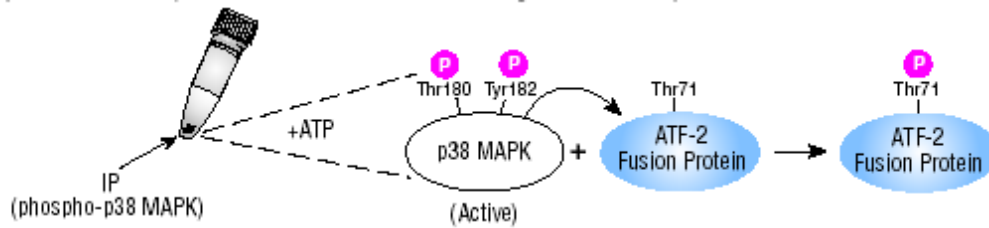


Abbildung 8: Phosphorylierung von ATF-2 Fusion Protein durch die p38 MAP Kinase (Schaubild aus Datenblatt p38 MAP Kinase Assay Kit, CellSignaling)

Zum Nachweis der p38 Kinase Aktivität dient in unseren Versuchen die Phosphorylierung von ATF-2.

Nachweis der gebundenen Antikörper

Der Nachweis der mit alkalischer Phosphatase konjugierten Antikörper - und somit der Nachweis der vorhandenen Proteinbanden – erfolgte mittels enzymatischer Farbumsetzung. Dazu wurde zu 10 ml Detektionspuffer 50 µl NBT sowie 38 µl BCIP zugegeben und die Lösung vorsichtig gemischt.

Die Membranen wurden in Plastikbeutel eingeschweißt und mit ca. 10 ml Detektionspuffer versetzt. Als nächster Schritt folgte eine lichtgeschützte Inkubation auf der Wippe für 15-120 min (abhängig vom verwendeten Erstantikörper).

Nach Abschluss der Färbung wurden die Membranen 3x für 5 min in Aqua dest. gewaschen und nachfolgend zwischen Filterpapier getrocknet.

Die Auswertung der Proteinmembranen erfolgte mittels AIDA Image Analyzer. Neben der Bestimmung der Bandendichte zum direkten Rückschluss auf die Menge an vorhandenem Protein wurden zusätzlich die Molekülmassen der einzelnen Proteine bestimmt

2.6. Bestimmung der Chemokin- und Zytokinkonzentrationen im Überstand mittels ELISA (Enzym linked immunosorbent assay)

Die Zytokin- und Chemokinkonzentrationen (mTNF-alpha, mL-1 β , mMIP-1alpha, mMCP 5, mMIP-1 β , mInterleukin 6, mKC, mMIP-2, mL-10) im Überstand der infizierten bzw. stimulierten Zellen wurde mittels Sandwich-Elisa bestimmt.

Hierbei wird ein für das zu bestimmende Antigen (Chemokin / Zytokin) spezifischer Antikörper an eine feste Phase adsorbiert. Wird die Probe zugegeben, so bindet das Antigen an den Antikörper. Als nächster Schritt erfolgt die Zugabe eines ebenfalls Antigen-spezifische, biotinylierten Zweitantikörpers, der an eine andere antigene Determinante bindet. Nach Zugabe von HRP-konjugiertem Streptavidin sowie Substratlösung bestehend aus äquivalenten Volumina von H₂O₂ und Tetramethylbenzidin kommt es zum Farbumschlag der Proben nach blau.

Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Proben mit Stopplösung versetzt und danach die Antigenmenge photometrisch bei 450 nm quantifiziert.

2.6. Statistik

Die statistische Auswertung aller Daten erfolgte mittels SIGMA PLOT 2000.

Bei den graphisch dargestellten Werten handelt es sich – soweit nicht ausdrücklich angegeben – um Mittelwerte (MEAN) und die zugehörigen Standardfehler (Standard Error of the Mean = SEM) aus 3 voneinander unabhängigen Versuchen.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student-t-Test. Als Signifikanz (Irrtums-) Niveau wurde 0,05 bzw. 0,01 gewählt.

Ergebnisse mit p-Werten < 0,05 (<0,01) gelten somit statistisch als signifikant.

3. Ergebnisse

3.1 Infektion von MLE-12 Zellen mit RSV und UV-inaktiviertem RSV

Neben der im Anschluss dargestellten indirekten Wirkung von RSV durch Freisetzung unterschiedlichster Mediatoren durch Alveolarmakrophagen und deren Einwirken auf Epithelzellen sind RS-Viren natürlich auch in der Lage, Epithelzellen direkt zu infizieren. Dabei sind sowohl vitale als auch nicht replikationsfähige Viren fähig, an die Oberflächenrezeptoren der Epithelzellen zu binden und intrazelluläre Signalkaskaden in Gang zu setzen. Da sich in den Überständen der RSV-infizierten Alveolarmakrophagen neben Mediatoren wie IL-1 β auch UV-inaktivierte Viren vorhanden waren wurde im folgende sowohl die Wirkung einer direkten Infektion mit RSV als auch mit inaktiviertem, d.h. nicht mehr replikationsfähigem Virus auf die Aktivierung der p38 MAP Kinase untersucht

3.1.1 Expression von pp38 sowie Aktivierung der p38 MAP Kinase nach RSV-Infektion

Die Infektion von MLE-12 Zellen führte zu keinem der untersuchten Zeitpunkte zu einer signifikanten Erhöhung der pp38 Expression.

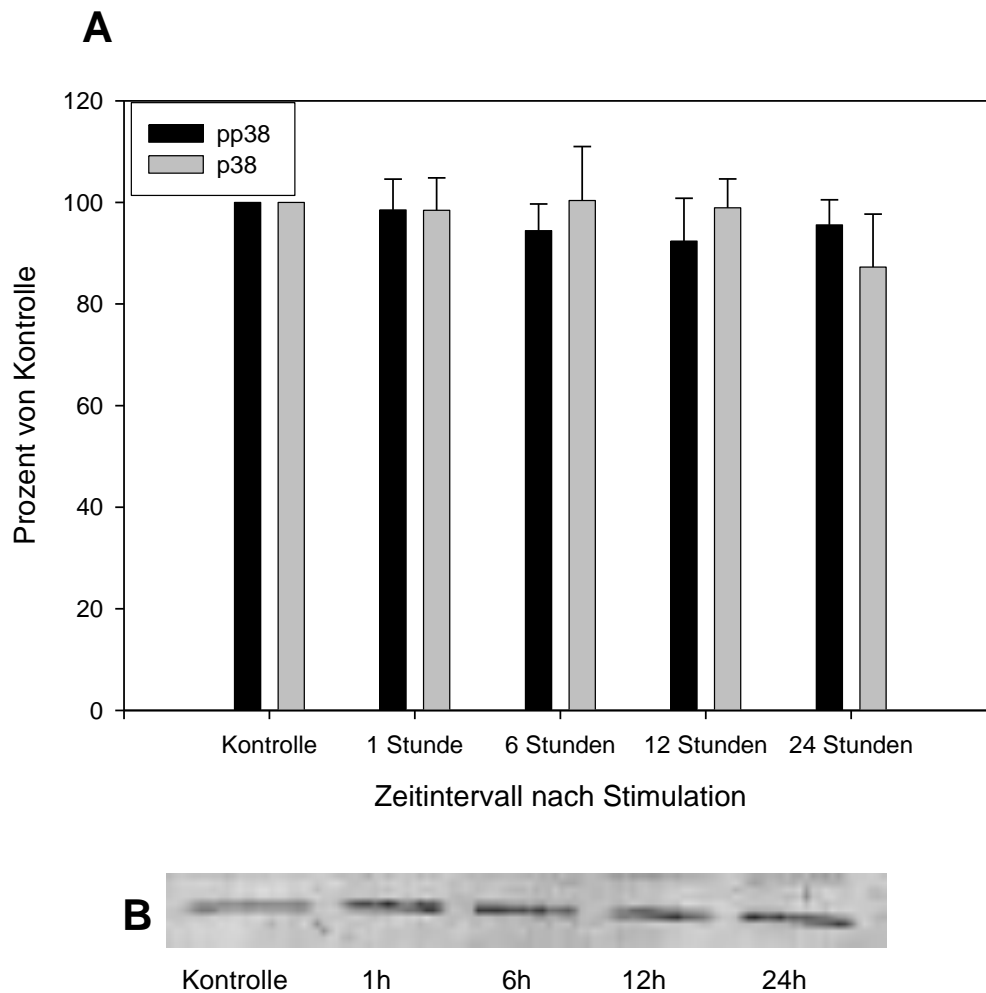


Abbildung 9: p38 und pp38 Expression nach RSV Infektion

Murine Lungenepithelzellen (MLE-12) wurden mit RSV (MOI1) infiziert oder entsprechend behandelt (Kontrolle). Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion wurde die Expression von pp38 mittels Western Blot erfasst.

A: *Optische Dichte (Mittelwert und SEM) der spezifischen Banden mit entsprechendem Molekulargewicht aus $n=3$ voneinander unabhängigen Versuchen für pp38 sowie p38*

B: Exemplarisches Beispiel eines Western Blot für pp38 zu den gegebenen Zeitpunkten

* $p < 0,05$ ** $p < 0.01$

Durch die Infektion von MLE-12 Zellen mit RSV kam es nach einer Stunde und nach 24 Stunden zu einem nicht signifikanten, zweigipfligen Anstieg der p38 MAP Kinase. Zu den weiterhin untersuchten Zeitpunkten nach 6 und 12 Stunden konnte keine Aktivierung nachgewiesen werden.

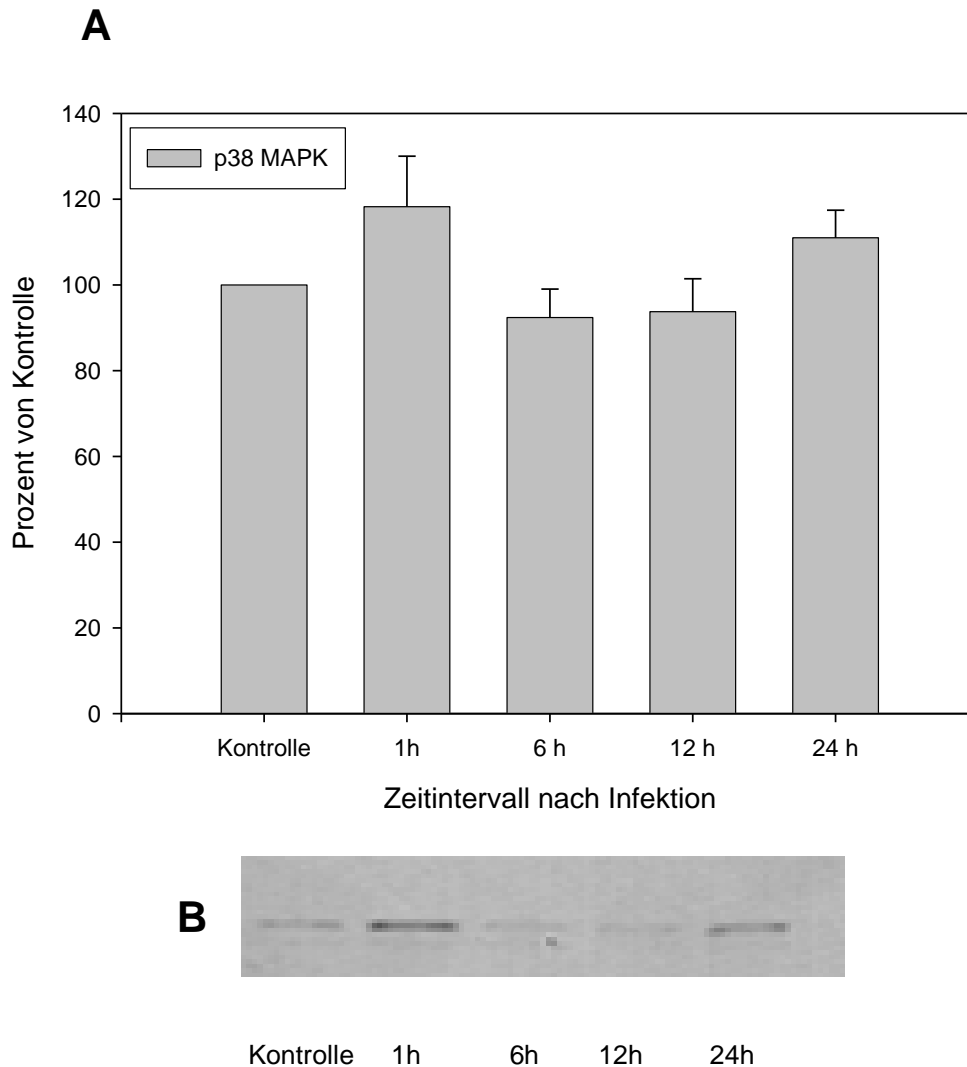


Abbildung 10: p38 MAP Kinase Aktivierung nach RSV-Infektion

Murine Lungenepithelzellen wurden mit RSV (MOI1) infiziert. Zur Bestimmung der p38 MAP Kinase Aktivität wurde das Gesamtprotein der Zellen herangezogen und dem immunpräzipitierten p38 als Substrat ATF-2 Fusion Protein hinzugefügt. Der Nachweis des (Thr-71) phosphorylierten ATF-2 erfolgte durch einen spezifischen anti-phospho ATF-2 (Thr-71) Antikörper mittels Western Blot.

A: Optische Dichte (Mittelwert und SEM) der spezifischen Banden mit entsprechendem Molekulargewicht aus $n=3$ voneinander unabhängigen Versuchen

B: Exemplarischer Western Blot für p-ATF-2 (THR-71) zu den gegebenen Zeitpunkten

3.1.2 Aktivierung der p38 MAP Kinase und pp38 Expression in MLE-12 Zellen nach Infektion mit UV-inaktiviertem RSV

Vergleichbar mit den Ergebnissen nach Infektion mit RSV führte auch die Infektion mit UV-inaktivierten Viren zu keinem Zeitpunkt zu einem Anstieg der pp38 Expression.

A

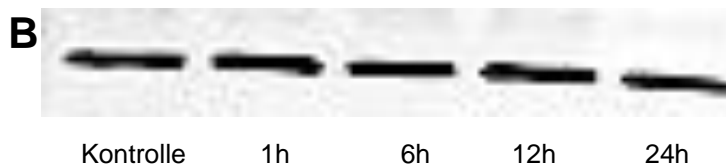
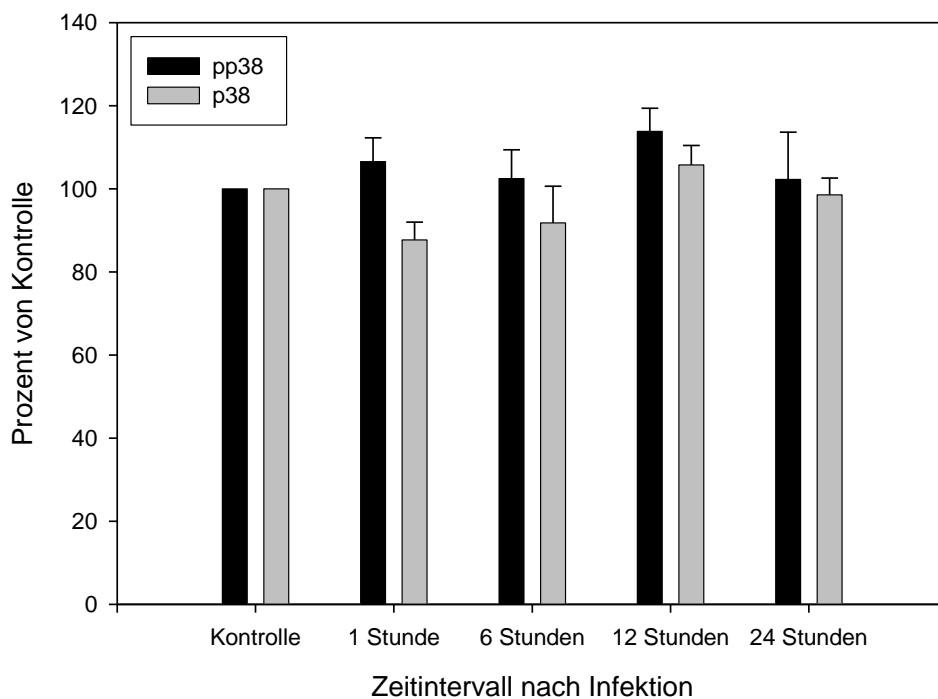


Abbildung 11: p38 und pp38 Expression Infektion mit UV-inaktiviertem RSV

Murine Lungenepithelzellen (MLE-12) wurden unter gleichen Bedingungen wie bei der Infektion mit RSV mit UV-inaktiviertem RSV (MOI1) infiziert oder entsprechend behandelt (Kontrolle). Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion wurde die Expression von pp38 mittels Western Blot erfasst.

A: *Optische Dichte (Mittelwert und SEM) der spezifischen Banden mit entsprechendem Molekulargewicht aus n=3 voneinander unabhängigen Versuchen für pp38 sowie p38*

B: *Exemplarisches Beispiel eines Western Blot für pp38 zu den gegebenen Zeitpunkten*

* $p < 0,05$ ** $p < 0.01$

Die Infektion mit nicht replikationsfähigen RS-Viren führte nach einer Stunde ebenfalls zu einer deutlichen, jedoch nicht signifikanten Aktivierung der p38 MAP Kinase.

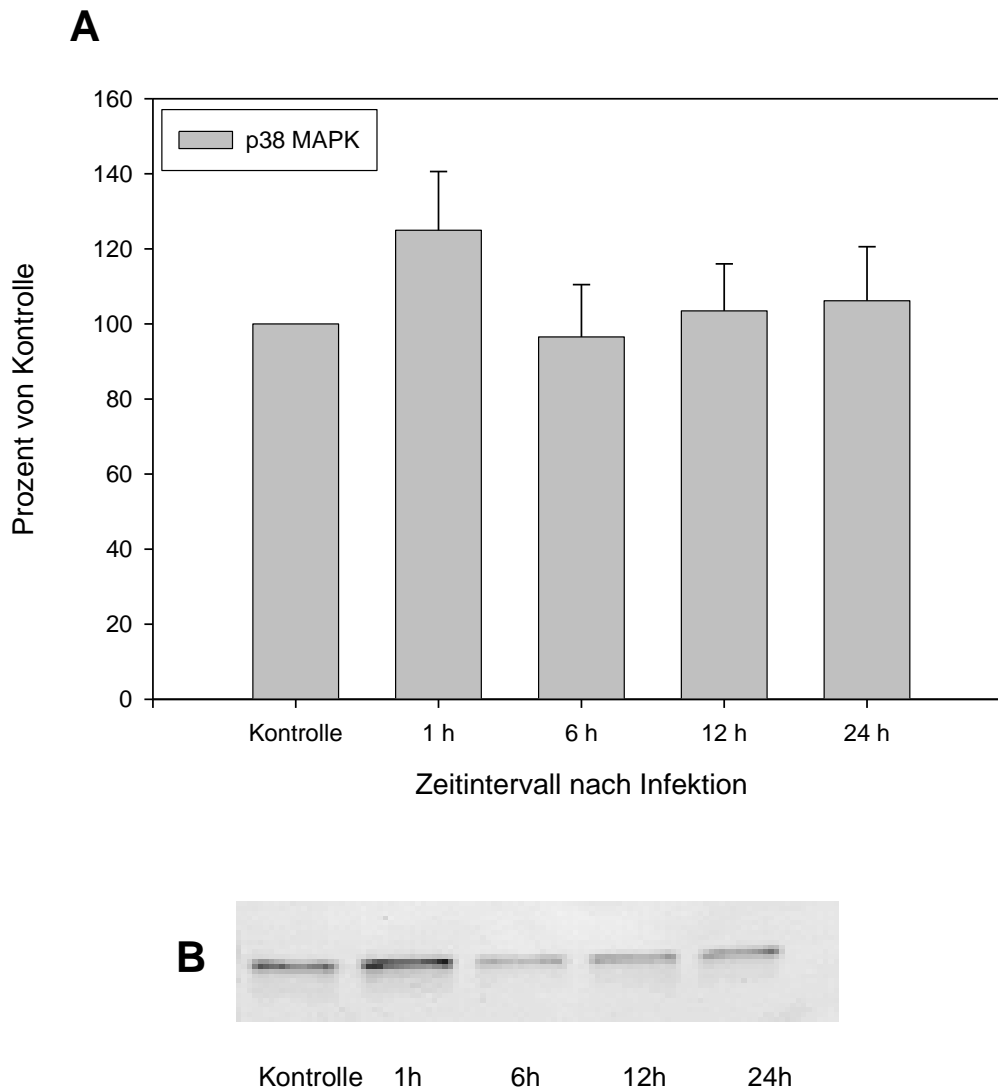


Abbildung 12: p38 MAP Kinase Aktivierung nach Infektion mit UV-inaktiviertem RSV

Murine Lungenepithelzellen wurden mit UV-inaktiviertem RSV (MOI1) infiziert. Zur Bestimmung der p38 MAP Kinase Aktivität wurde äquivalent zu Versuch 3.1.1 das Gesamtprotein der Zellen herangezogen und dem immunpräzipitierten p38 als Substrat ATF-2 Fusion Protein hinzugefügt. Der

Nachweis des (Thr-71) phosphorylierten ATF-2 erfolgte durch einen spezifischen anti-phospho ATF-2 (Thr-71) Antikörper mittels Western Blot.

A: *Optische Dichte (Mittelwert und SEM) der spezifischen Banden mit entsprechendem Molekulargewicht aus n=3 voneinander unabhängigen Versuchen*

B: *Exemplarisches Beispiel eines Western Blot für p-ATF-2 (THR-71) zu den gegebenen Zeitpunkten*

Sowohl die Infektion mit replikationsfähigen als auch nicht replikationsfähigen Viren führt nicht zu einer signifikanten Veränderung der pp38 Expression. Bereits die Arbeitsgruppe um Konrad Pazdrak konnte in humanen Lungenepithelzellen (A549) nach RSV Infektion, trotz einer Aktivierung der p38 MAP Kinase, keine signifikanten Veränderungen der pp38 Expression nachweisen⁸⁷.

Die Aktivierung der p38 MAP Kinase unterscheidet sich in Abhängigkeit der Replikationsfähigkeit der RS-Viren. Während die Infektion mit nicht replikationsfähigen Viren nur nach einer Stunde zu einer Aktivierung der p38 MAP Kinase führte, konnten wir nach Infektion mit replikationsfähigen Viren neben einer Aktivierung nach einer Stunde eine geringere Aktivierung nach 24 Stunden nachweisen.

Um zu untersuchen, ob die Aktivierung der p38 MAP Kinase in der Produktion von Entzündungsmediatoren resultiert, wurden im Anschluss die Zellüberstände auf bestimmte Chemokine und Zytokine untersucht.

3.1.3 Freisetzung unterschiedlicher Mediatoren durch MLE-12 Zellen nach RSV und UV-RSV Infektion

MLE-12 Zellen bilden sowohl nach Infektion mit RSV als auch mit nicht-replikationsfähigen RS-Viren unterschiedliche Mediatoren

Mediatoren	Infektion mit RSV	Infektion mit UV-RSV
mTNF-alpha	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>
mKC	<i>positiv</i>	<i>positiv</i>
mMIP-2	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>
mIL-1 β	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>
mIL-6	<i>positiv</i>	<i>positiv</i>
mMIP-1alpha	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>
mMIP-1 β	<i>positiv</i>	<i>positiv</i>
MCP-5	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>
IL-10	<i>negativ</i>	<i>negativ</i>

Abbildung 13: Mediatoren in den Überständen RSV und UV-RSV infizierter MLE-12 Zellen

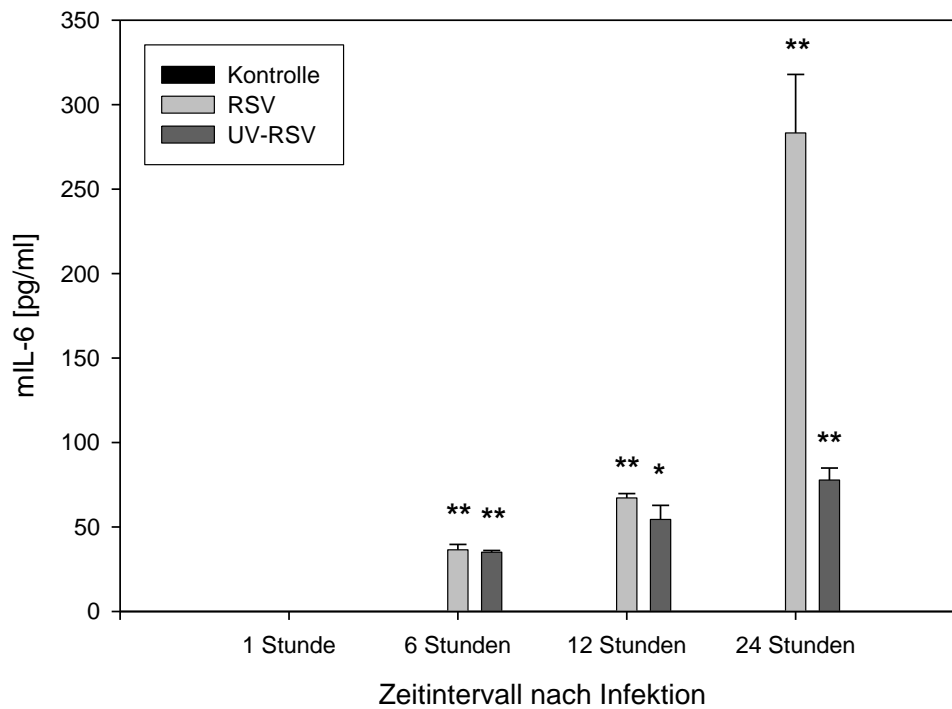


Abbildung 14: Konzentration von mIL-6 nach Infektion mit RSV bzw. UV-RSV

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

Sowohl nach Infektion mit RS-Virus als auch mit UV-inaktiviertem RS-Virus konnte ein zeitabhängiger und kontinuierlicher Anstieg der mIL-6 Konzentration nachgewiesen werden.

Die Infektion mit UV- inaktiviertem RSV führt nach 6 ($p=0,0008$), 12 ($p=0,023$) und nach 24 Stunden ($p=0,008$) zu einer signifikanten Erhöhung der mIL-6 Konzentration im Zellüberstand.

Die Infektion mit RSV führt vergleichbar mit der UV-RSV Infektion ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der mIL-6 Konzentration nach 6 ($p=0,0004$), 12 ($p=0,00001$) und 24 Stunden ($p=0,0012$).

Die Konzentration von mIL-6 24 Stunden nach RSV Infektion war dabei signifikant höher als die Konzentration nach UV-RSV Infektion ($p=0,0196$), wohingegen nach 6 und 12 Stunden nach Infektion mit RSV bzw. UV-RSV nahezu identische mIL-6 Konzentrationen detektiert werden konnten. Vergleichen mit der Aktivierung der p38 MAP Kinase zeigt sich ein Anstieg der IL-6 Konzentrationen erst nach Aktivierung der p38 MAP Kinase nach 1 Stunde.

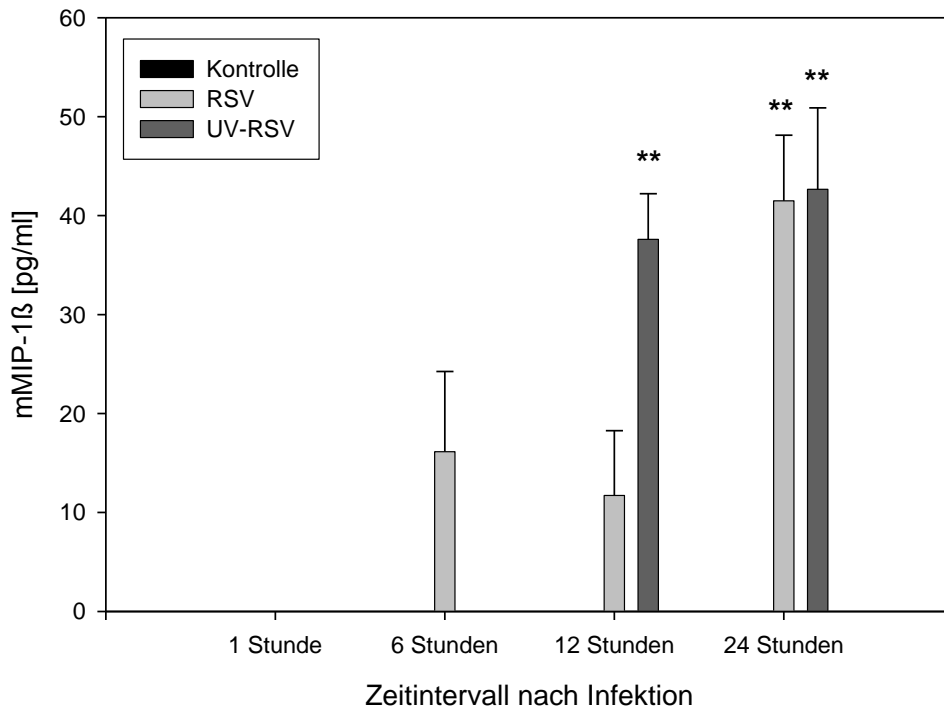


Abbildung 15: Konzentration von mMIP-1 β nach RSV bzw. UV-RSV Infektion

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

Die Infektion von MLE-12 Zellen mit replizierenden RS-Viren (MO11) führte nach 24 Stunden zu einer signifikanten Erhöhung ($p=0,0035$) der mMIP-1 β Konzentration im Überstand. Desweiteren waren auch nach 6 und 12 Stunden geringe, nicht signifikante mMIP-1 β Konzentrationen nachzuweisen.

Vergleichbar den Ergebnissen nach RSV Infektion führte auch die Infektion der Lungenepithelzellen mit UV-inaktiviertem RS-Virus zu einer Produktion von mMIP-1 β . Dabei war sowohl nach 12 Stunden ($p=0,0012$) als auch nach 24 Stunden ($p=0,0066$) eine im Vergleich zu den Kontrollproben signifikant erhöhte mMIP-1 β Konzentration nachzuweisen. Die Konzentrationen 24 Stunden nach RSV und UV-RSV Infektion waren dabei nahezu identisch. Auch hier zeigen sich verglichen mit der p38 Aktivierung, Konzentrationsanstiege von mMIP-1 β erst nach Aktivierungspeak von p38 nach 1 Stunde.

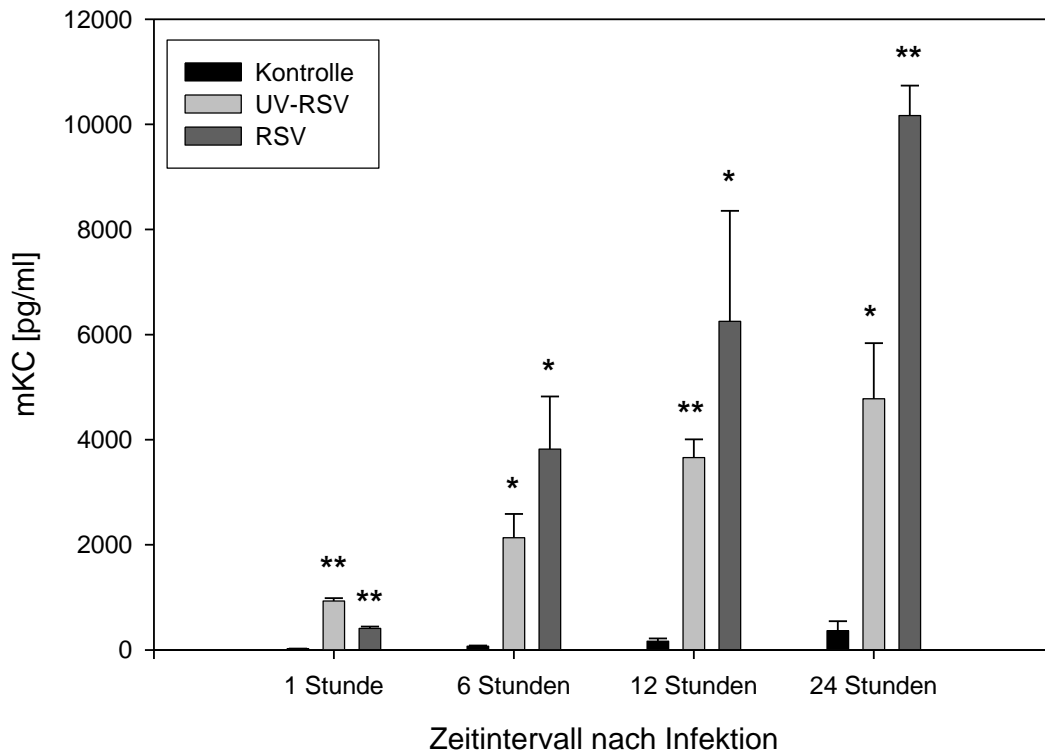


Abbildung 16: Konzentration von mKC nach RSV bzw. UV-RSV Infektion

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

Zu allen untersuchten Zeitpunkten nach Infektion der MLE-12 Zellen mit RSV sowie UV-RSV ließ sich eine signifikante Erhöhung des Chemokins mKC nachweisen. In unseren Versuchen war dabei eine kontinuierliche und zeitabhängige Konzentrationserhöhung erkennbar.

Eine Infektion mit RSV führte dabei nach 1 Stunde ($p=0,0007$), 6 Stunden ($p=0,02$), 12 Stunden ($p=0,045$) sowie 24 Stunden ($p=0,00026$) zu signifikant höheren mKC Konzentrationen im Überstand als bei den jeweiligen Kontrollproben. Die Konzentration von mKC im Überstand nach Infektion der Zellen mit UV-RSV zeigte ebenfalls eine signifikante Erhöhung zu den untersuchten Zeitpunkten (1 Stunde ($p=0,00006$), 6 Stunden ($p=0,0102$), 12 Stunden ($p=0,0006$), 24 Stunden ($p=0,015$)). Im Vergleich zu den RSV-infizierten Zellen waren die Konzentrationen nach 6, 12 und 24 Stunden deutlich niedriger nach Infektion mit UV-inaktiviertem Virus.

3.2 Infektion von MLE-12 Zellen mit RS-Virus nach Vorbehandlung mit p38 MAP Kinase Inhibitor

Unsere bisherigen Ergebnisse zeigen nach RSV-Infektion sowohl eine Aktivierung der p38 MAP Kinase nach 1 Stunde als auch ein Anstieg unterschiedlicher Entzündungsmediatoren wie z.B. mKC mit einer Maximalkonzentration 24 Stunden nach Infektion. Unser Ziel war es, die Bedeutung der Aktivierung der p38 MAP Kinase bei der Produktion von Entzündungsmediatoren zu beleuchten. Deshalb wurden die MLE-12 Zellen vor Infektion mit RS-Viren mit SB 203580, einem spezifischen p38 MAP Kinase Inhibitor in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Nach der anschließenden Infektion mit RSV für eine Stunde erfolgte die Detektion der p38 MAP Kinase Aktivität mittels Bestimmung der Phosphorylierung von ATF-2.

3.2.1 Aktivierung der p38 MAP Kinase nach Vorbehandlung mit SB 203580

Die Inkubation von MLE-12 Zellen mit p38 MAP Kinase Inhibitor (SB 203580) für 1 Stunde vor Infektion mit RS-Virus führte zu keiner signifikanten Veränderung der p38 MAP Kinase Aktivität (gemessen wurde (*Thr-71 phosphoryliertes ATF-2*)).

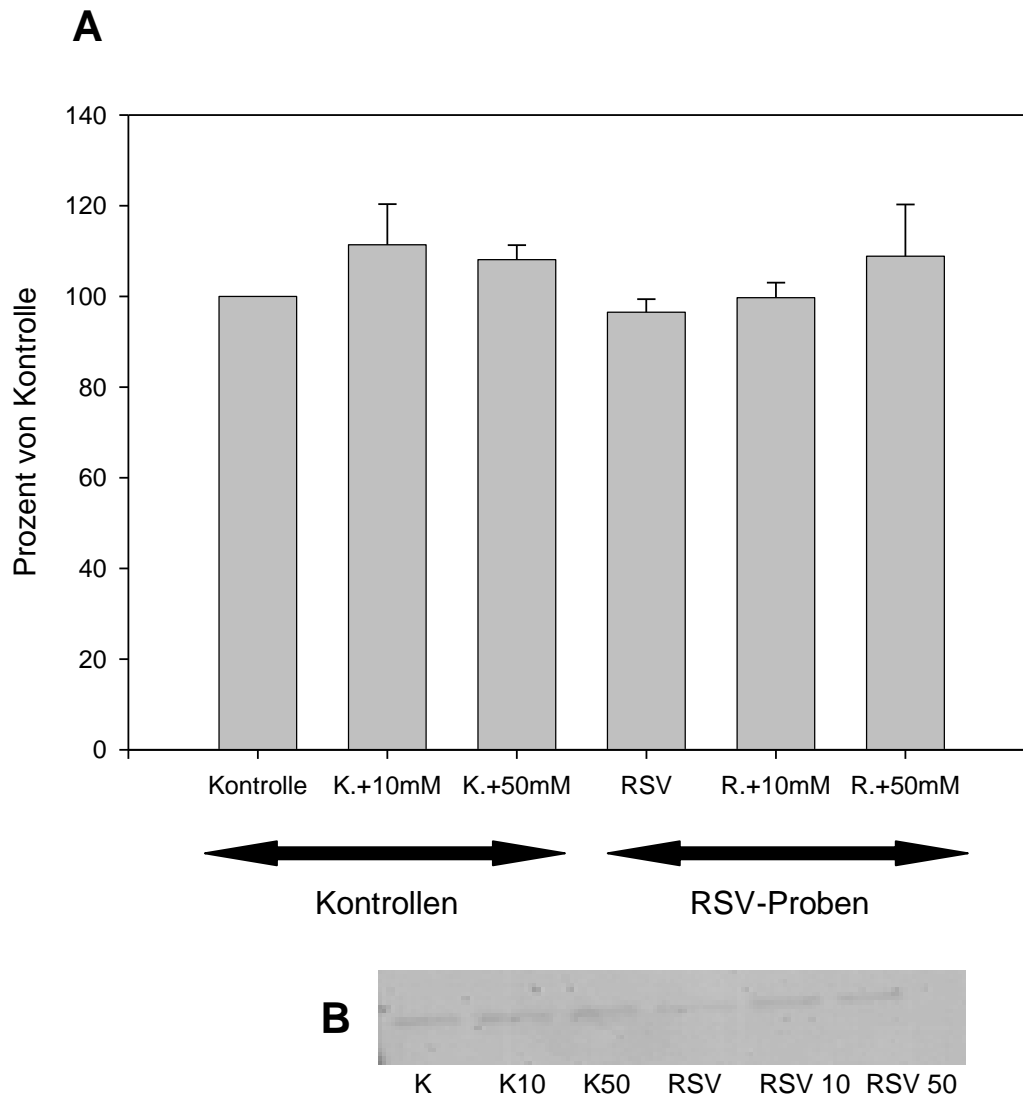


Abbildung 17: Aktivierung der p38 MAP Kinase nach Inkubation mit SB 203580 Inhibitor

MLE-12 Zellen wurden für 1 Stunde mit unterschiedlichen Konzentrationen von P38 MAP Kinase Inhibitor (10mM, 50mM) inkubiert und daraufhin mit RS-Virus (1 MOI) für 1 Stunde infiziert. Zur Bestimmung der p38 MAP Kinase Aktivität wurde äquivalent zu den vorangegangenen Versuchen das Gesamtprotein der Zellen herangezogen und dem immunpräzipitierten p38 als Substrat ATF-2 Fusion Protein hinzugefügt. Der Nachweis des (Thr-71) phosphorylierten ATF-2 erfolgte durch einen spezifischen anti-phospho ATF-2 (Thr-71) Antikörper mittels Western Blot.

A: Optische Dichte (Mittelwert und SEM) der spezifischen Banden mit entsprechendem Molekulargewicht aus $n=3$ voneinander unabhängigen Versuchen

B: Exemplarisches Beispiel eines Western Blot für p-ATF-2 (THR-71) zu den gegebenen Zeitpunkten

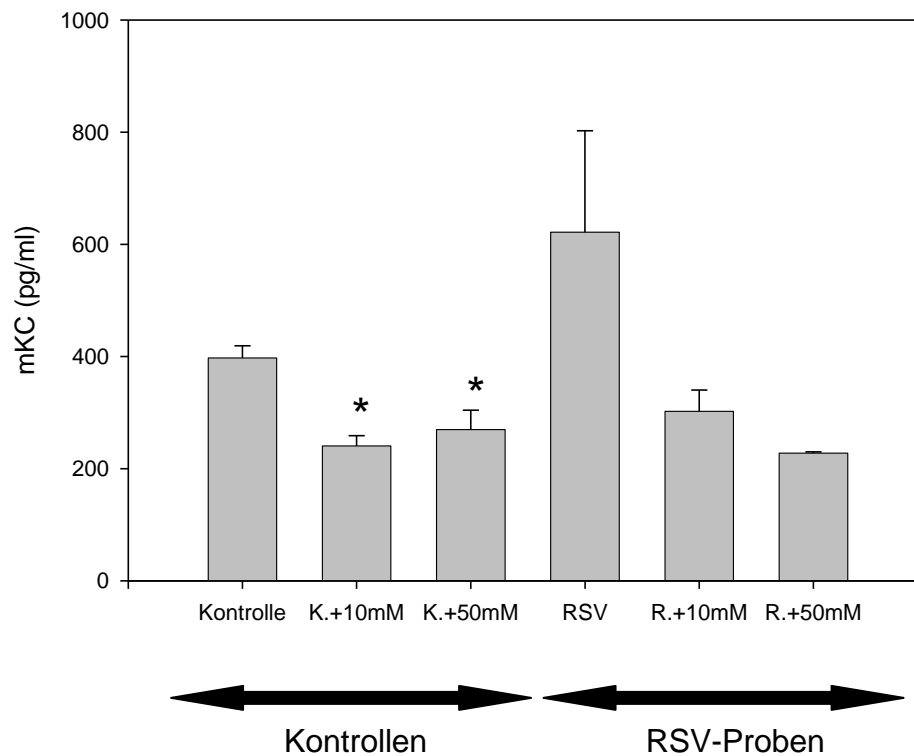
3.2.2 Mediatorfreisetzung durch MLE-12 Zellen nach Inkubation mit SB 203580 und anschließender RSV-Infektion

Folgende Chemokine und Zytokine mittels Sandwich-ELISA bestimmt:

Mediatoren	SB 203580 + RSV-Infektion
mTNF-alpha	negativ
mKC	positiv
mMIP-2	negativ
mIL-1 β	negativ
mIL-6	negativ
mMIP-1 β	negativ

Abbildung 18: Mediatoren im Überstand von MLE-12 Zellen nach SB 203580 Vorbehandlung

Von den oben aufgeführten Mediatoren konnte nach einstündiger RSV Infektion und vorheriger Inkubation mit SB 203580 nur mKC nachgewiesen werden.



* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

Abbildung 19: Konzentration von mKC im Zellüberstand RSV-infizierter MLE-12 Zellen nach vorheriger Inkubation mit p38 MAP Kinase Inhibitor SB 203580

MLE-12 Zellen zeigen nach Inkubation mit P38 MAP Kinase Inhibitor (SB 203580) und anschließender Infektion mit RS-Virus eine deutlich verminderte Produktion von mKC als bei einer Infektion mit RSV ohne vorherige Behandlung mit Inhibitor. Es konnte gezeigt werden, dass bereits eine Inhibitor-Konzentration von 10mM und eine Inkubation für 1 Stunde zu einem deutlichen Abfall der mKC Konzentration auf nahezu die Werte der Kontrollproben führt. Dies ließ den Rückschluss zu, dass die p38 MAP Kinase bei der Mediatorproduktion nach RSV-Infektion eine wichtige und entscheidende Rolle spielt. Auch die Kontrollproben ohne RSV-Infektion zeigen unter Inhibitor-Inkubation deutlich geringere Konzentrationen (signifikant) von mKC im Überstand als die jeweilige Kontrollprobe.

Wie bereits mehrfach beschrieben kommt es im Rahmen der RSV Infektion es zu einem komplexen Zusammenspiel unterschiedlichster Zelllinien. Dabei spielen neben Epithelzellen als Hauptangriffsort von RSV auch Makrophagen eine entscheidende Rolle. Bisher konnten bereits einige Arbeitsgruppen die Produktion von IL-1 β durch Makrophagen nach RSV Infektion nachweisen^{177, 178}. Konform zu diesen Ergebnissen war es auch uns möglich eine IL-1 β Freisetzung durch Makrophagen nach RSV-Infektion zu detektieren. Unser Ziel war es nun herauszufinden, ob IL-1 β in Abhängigkeit von einer Aktivierung der p38 MAP Kinase zur Freisetzung weiterer Mediatoren führt.

Die primäre Voraussetzung, nämlich das Vorhandensein von IL-1 Rezeptoren, war sowohl bei LA-4 als auch MLE-12 Zellen gegeben. Wir konnten zu allen untersuchten Zeitpunkten IL-1 Rezeptoren nachweisen (Ergebnisse nicht graphisch dargestellt). Signifikante Unterschiede bezüglich der Expression waren nicht nachweisbar.

Unser Ziel war es herauszufinden, ob IL-1 β , wie bereits in unterschiedlichen Zelllinien nachgewiesen, nach Bindung an die Oberflächenrezeptoren von LA-4 und MLE-12 Zellen zu einer Induktion der p38 MAP Kinase im Zellinneren führt. Hierfür erfolgte im ersten Schritt der Nachweis der Expression von pp38 nach Stimulation mit IL-1 β .

3.3 Expression von pp38 in den Zelllinien LA-4 und MLE-12

3.3.1 Expression von pp38 in LA-4 Zellen nach IL-1 β Stimulation

Die Stimulation von LA-4 Zellen mit 2ng/ml mL-1 β führt zu einer vermehrten Expression von pp38. Nach 15 min ($p= 0,023$) und 6 Stunden ($p= 0,019$) zeigten sich signifikante erhöhte pp38 Expressionen. Nach 30 min sowie nach einer Stunde ließ sich keine signifikant erhöhte pp38 Expression nachweisen.

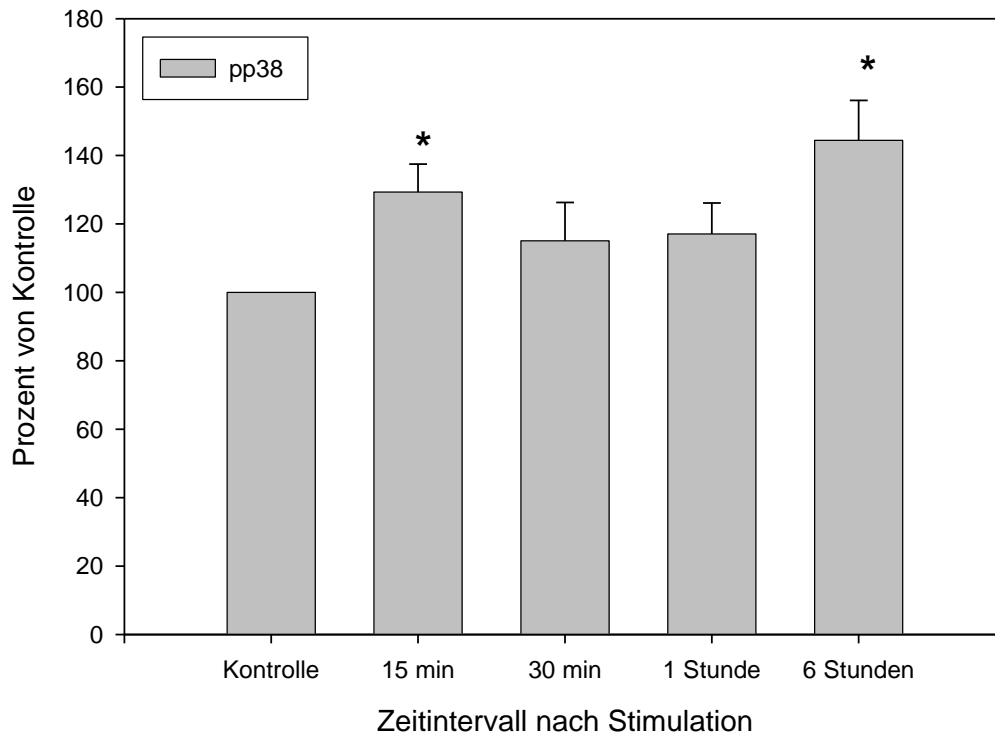
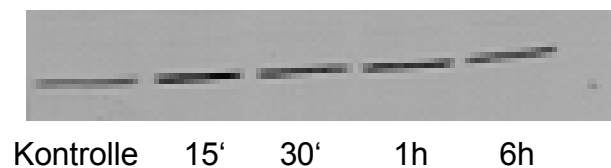
A**B**

Abbildung 20: Expression von pp38 in LA-4 Zellen nach Stimulation mit mL-1 β

Murine Lungenepithelzellen (LA-4) wurden mit 2 ng/ml mL-1 β stimuliert oder entsprechend behandelt (Kontrolle). Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulation wurde die Expression von pp38 mittels Western Blot erfasst. **A:** Optische Dichte (Mittelwert und SEM) der spezifischen Banden mit entsprechendem Molekulargewicht aus $n=3$ voneinander unabhängigen Versuchen

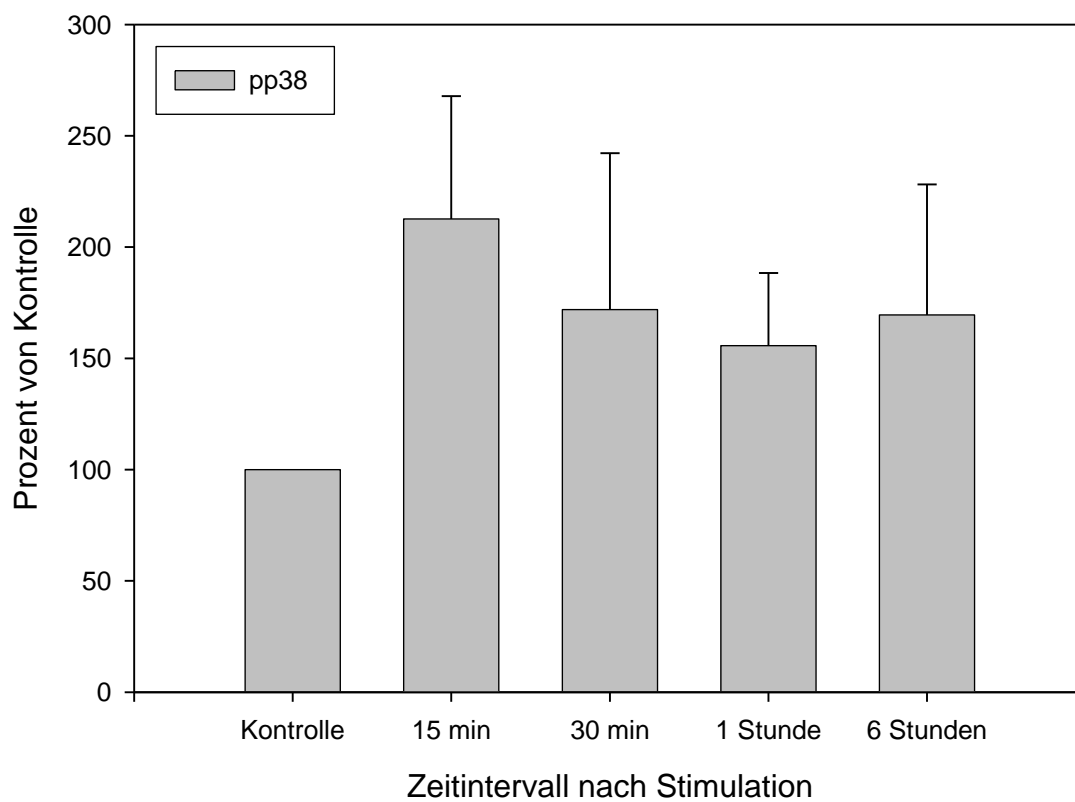
B: Exemplarisches Beispiel eines Western Blot für pp38 zu den gegebenen Zeitpunkten

* $p < 0,05$ ** $p < 0.01$

3.3.2 Expression von pp38 MLE-12 Zellen

Nach Stimulation von MLE-12 Zellen erkennt man eine tendenzielle, jedoch nicht signifikante Erhöhung der pp38 Expression zu allen untersuchten Zeitpunkten.

A



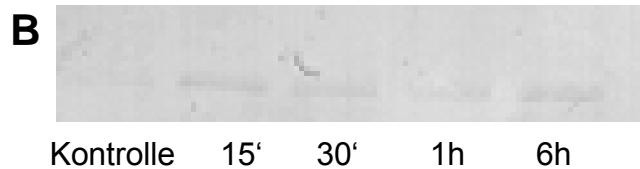


Abbildung 21: Expression von pp38 in MLE-12 Zellen nach Stimulation mit mL-1 β

Murine Lungenepithelzellen (MLE-12) wurden mit 2 ng/ml mL-1 β stimuliert oder entsprechend behandelt (Kontrolle). Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulation wurde die Expression von pp38 mittels Western Blot erfasst.

A: *Optische Dichte (Mittelwert und SEM) der spezifischen Banden mit entsprechendem Molekulargewicht aus n=3 voneinander unabhängigen Versuchen*

B: *Exemplarisches Beispiel eines Western Blot für pp38 zu den gegebenen Zeitpunkten*

* $p < 0,05$ ** $p < 0.01$

Vergleicht man die beiden untersuchten Zelllinien bezüglich ihrer pp38 Expression nach Stimulation mit mL-1 β erkennt man bei beiden, dass es durch IL-1 β zu einer Erhöhung der intrazellulären pp38 Expression kommt.

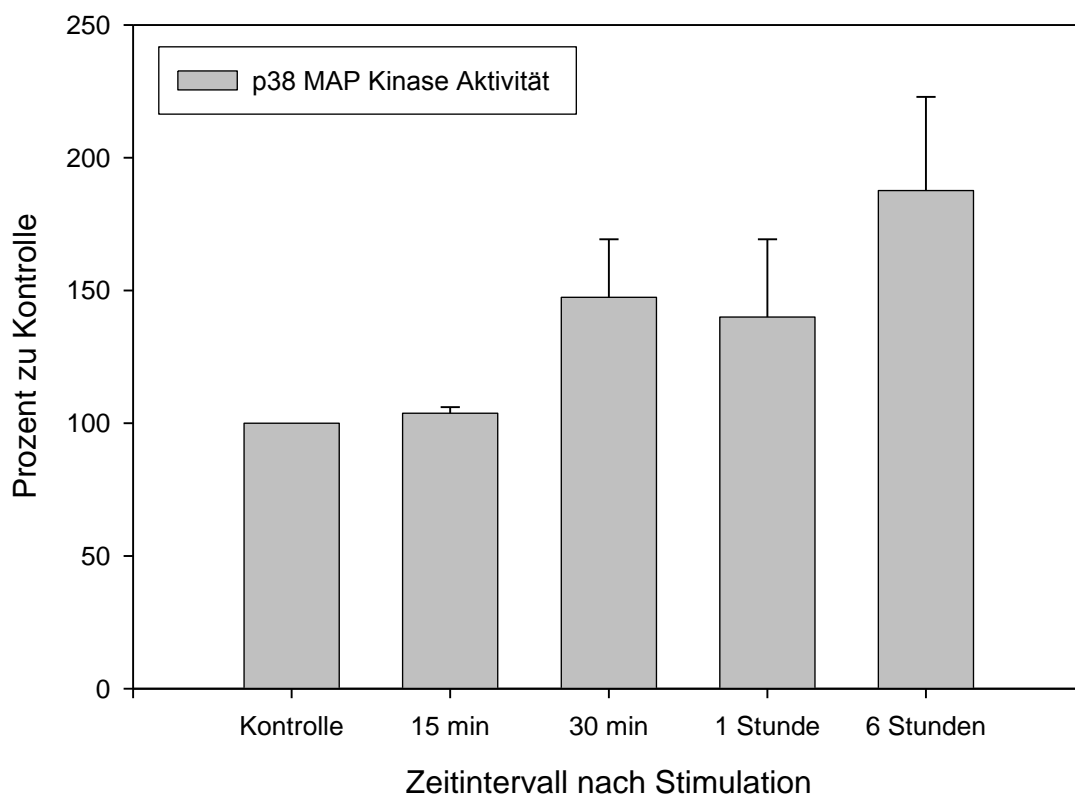
3.4 Aktivierung der p38 MAP Kinase in den Zelllinien LA-4 und MLE-12

Da mit dem alleinigen Nachweis von pp38 keine direkte Aussage über die Aktivierung der p38 MAP Kinase möglich ist, bestimmten wir auch hier, vergleichbar mit der Versuchsreihe nach RSV-Infektion die katalytische Aktivität der p38 MAP Kinase über Detektion der Phosphorylierung von ATF-2

3.4.1 Aktivierung der p38 MAP Kinase Aktivität in LA-4 Zellen

Die Stimulation von LA-4 Zellen mit mL-1 β führte nach 6 Stunden zu einer deutlichen aber nicht signifikanten ($p = 0,068$) Erhöhung der p38 MAP Kinase Aktivität.

A



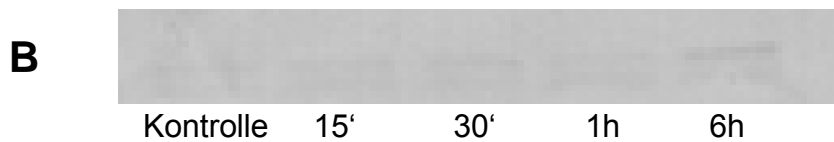


Abbildung 22: Aktivierung der p38 MAP Kinase in LA-4 Zellen nach IL-1 β Stimulation

LA-4 Zellen wurden mit 2 ng/ml mL-1 β stimuliert. Zur Bestimmung der p38 MAP Kinase Aktivität wurde das Gesamtprotein der Zellen herangezogen und dem immunpräzipitierten p38 als Substrat ATF-2 Fusion Protein hinzugefügt. Der Nachweis des (Thr-71) phosphorylierten ATF-2 erfolgte durch einen spezifischen anti-phospho ATF-2 (Thr-71) Antikörper mittels Western Blot.

A: Optische Dichte (Mittelwert und SEM) der spezifischen Banden mit entsprechendem Molekulargewicht aus $n=3$ voneinander unabhängigen Versuchen

B: Exemplarisches Beispiel eines Western Blot für p-ATF-2 (THR-71) zu den gegebenen Zeitpunkten

3.4.2 Aktivierung der p38 MAP Kinase Aktivität in MLE-12 Zellen

Die Stimulation von MLE-12 Zellen mit mL-1 β führte nach 15 min zu einer deutlichen (nicht signifikanten) Erhöhung der p38 MAP Kinase Aktivität. Zu den weiteren untersuchten Zeitpunkten war eine p38 MAP Kinase Aktivierung nicht nachweisbar.

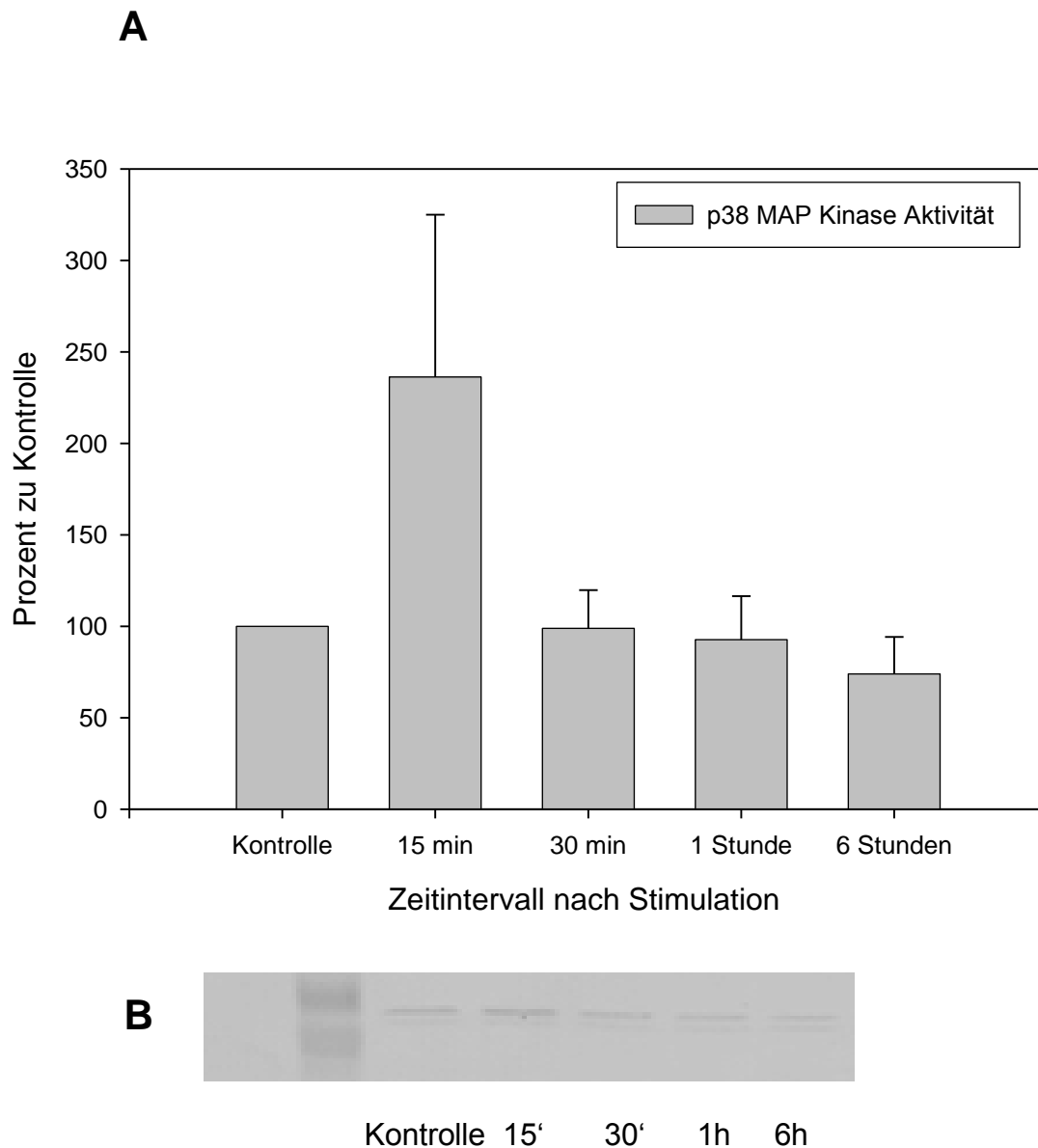


Abbildung 23: Aktivierung der p38 MAP Kinase in MLE-12 Zellen nach IL-1 β Stimulation

MLE-12 Zellen wurden mit 2 ng/ml mL-1 β stimuliert. Entsprechend der Bestimmung der p38 MAP Kinase Aktivität in LA-4 Zellen, wurde das Gesamtprotein der Zellen herangezogen und dem immunpräzipitierten p38 als Substrat ATF-2 Fusion Protein hinzugefügt. Der Nachweis des (Thr-71) phosphorylierten ATF-2 erfolgte durch einen spezifischen anti-phospho ATF-2 (Thr-71) Antikörper mittels Western Blot.

A: Optische Dichte (Mittelwert und SEM) der spezifischen Banden mit entsprechendem Molekulargewicht aus n=3 voneinander unabhängigen Versuchen

B: Exemplarisches Beispiel eines Western Blot für p-ATF-2 (THR-71) zu den gegebenen Zeitpunkten

Im Vergleich der LA-4 und MLE-12 Zellen erkennt man bezüglich der p38 MAP Kinase Aktivierung einen deutlichen Unterschied im Aktivierungsmuster. Während eine IL-1 β Stimulation in LA-4 Zellen erst nach 6 Stunden zu einer Aktivierung der p38 MAP Kinase führte, zeigte sich in MLE-12 Zellen bereits nach 15 min eine deutliche Aktivierung der p38 MAP Kinase.

3.5 Produktion von Mediatoren durch LA-4 und MLE-12 Zellen nach Stimulation mit IL-1 β

Neben dem Einfluss einer Stimulation mit IL-1 β auf die p38 MAP Kinase kommt es in den untersuchten Zelllinien LA-4 und MLE-12 Zellen zur Induktion unterschiedlicher Mediatoren. Diese zeigen zellspezifische Verteilungsmuster. Die Zytokin- und Chemokinkonzentrationen wurden mittels Sandwich-ELISA bestimmt und die Ergebnisse nachfolgend dargestellt.

Mediatoren	MLE-12 Zellen	LA-4 Zellen
mKC	positiv	positiv
mMIP-1 β (CCL4)	positiv	negativ
mMIP-1alpha (CCL3)	negativ	negativ
mMIP-2	negativ	negativ
mIL-6	negativ	negativ
mIL-10	negativ	negativ
mMCP-5 (CCL12)	negativ	negativ
mTNF-alpha	negativ	negativ

Abbildung 24: Untersuchte Mediatoren im Überstand mL-1 β stimulierter LA-4 und MLE-12 Zellen

3.5.1 mKC Konzentration im Überstand mL-1 β stimulierter LA-4 und MLE-12 Zellen

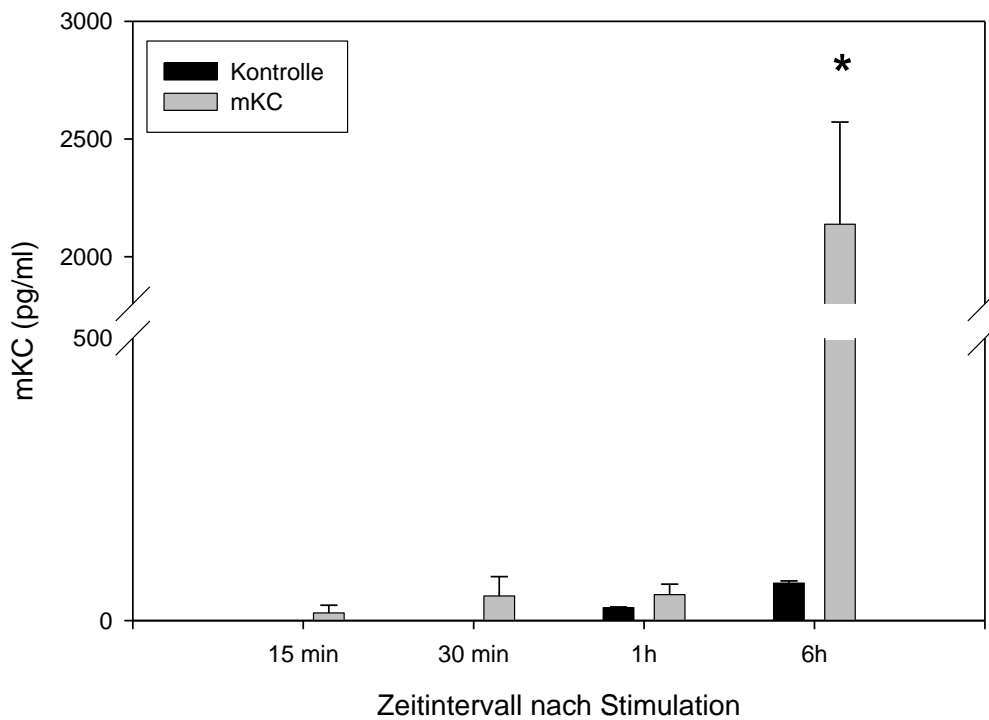


Abbildung 25: Konzentration von mKC im Überstand mL-1 β stimulierter LA-4 Zellen

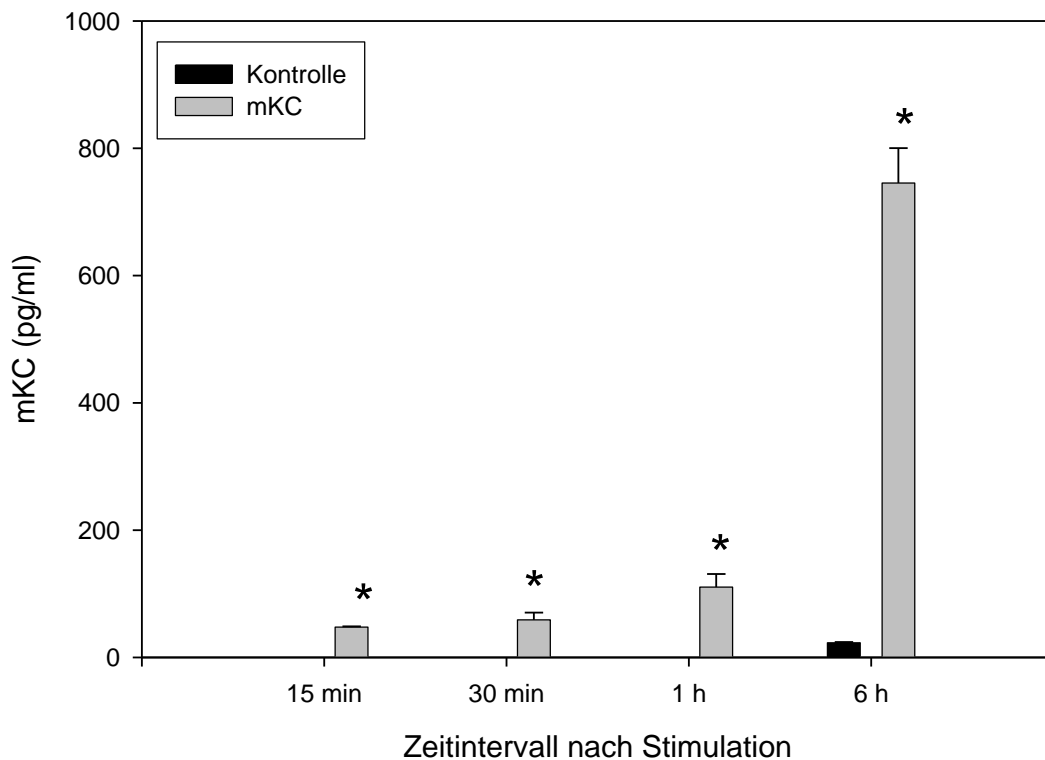


Abbildung 26: Konzentration von mKC im Überstand mL-1 β stimulierter MLE-12 Zellen

Nach Stimulation von LA-4 und MLE-12 Zellen mit mL-1 β zeigt sich im Überstand beider Zelllinien ein zeitabhängiger Anstieg der Konzentration von mKC. Bei den LA-4 Zellen ist ein signifikanter Anstieg der mKC Konzentration – bezogen auf die jeweilige Kontrollprobe – erst nach 6 Stunden nachzuweisen ($p=0,0088$) wohingegen im Überstand der MLE-12 Zellen nach 15 min ($p=0,0000025344$), 30 min ($p=0,0071381834$), 1 Stunde ($p=0,0057475231$) und 6 Stunden ($p=0,0001931807$) signifikant erhöhte mKC Konzentrationen nachweisbar waren. Desweiteren zeigten sich im Vergleich der beiden 6 Stunden Proben von MLE-12 und LA-4 Zellen höhere Absolutwerte von mKC im Überstand der LA-4 Zellen.

3.5.2 CCL-4 Konzentration im Überstand mL-1 β stimulierter MLE-12 Zellen

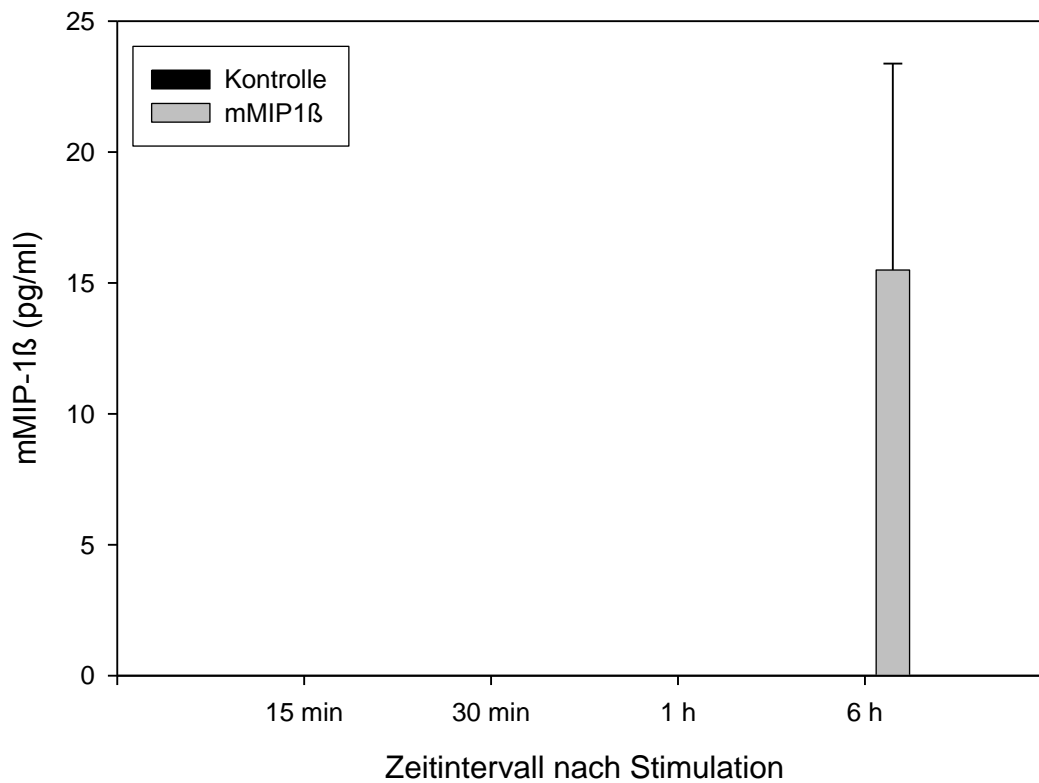


Abbildung 27: Konzentration von mMIP-1 β im Überstand mL-1 β stimulierter MLE-12 Zellen

Die Stimulation von MLE-12 Zellen mit mL-1 β führte nach 6 Stunden zu einer Freisetzung von mMIP-1 β in sehr geringer und im Vergleich zur Kontrollprobe nicht signifikanter Konzentration ($p=0,12$). Ein Nachweis von CCL4 im Überstand stimulierter LA-4 Zellen konnte nicht erbracht werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Stimulation von LA-4 und MLE-12 Zellen mit mL-1 β zur Freisetzung unterschiedlicher Mediatoren führt.

Von beiden Zelllinien wurde mKC, eines der wichtigsten proinflammatorisch wirkenden Chemokine der Maus, produziert. Darüber hinaus gelang im Überstand von MLE-12 Zellen der Nachweis von CCL4 nach 6 Stunden.

Ein Nachweis von CCL3, mMIP-2, mL-6, mL-10, CCL12 und mTNF-alpha gelang weder bei LA4 noch bei MLE-12 Zellen.

3.6 Einfluss von Überständen RSV-infizierter Alveolarmakrophagen auf MLE-12 Zellen

Wie bereits erwähnt sind Alveolarmakrophagen nach Infektion mit RSV unter anderem in der Lage IL-1 β zu produzieren. Bezüglich seines konkreten Einflusses nach RSV Infektion ist in der Literatur kaum etwas beschrieben. Um den Einfluss von Makrophagen im Rahmen der RSV Infektion zu zeigen wurden MH-S Zellen (Alveolarmakrophagen) für 24 Stunden mit Respiratory Syncytial Virus (1 viraler Partikel/Zelle = MOI 1) infiziert und die gewonnenen Überstände zentrifugiert, um Sie von festen Zellbestandteilen zu befreien. Im Anschluss erfolgte die Behandlung der Überstände mit UV-Licht, um noch vorhandene vitale Viren zu inaktivieren, d.h. ihnen die Möglichkeit zur Replikation zu nehmen.

Mittels Sandwich-Elisa erfolgte anschließend die Bestimmung der Konzentration von mL-1 β in den vorhandenen Proben und die Neutralisierung mittels Anti-IL-1 β Antikörper. Danach erfolgte eine 15 minütige Inkubation von MLE-12 Zellen mit diesen Überständen, mit Überständen ohne Anti-IL-1 β Antikörper sowie mit den Überständen von nicht mit RSV infizierten MH-S Zellen.

Nach Beendigung der Inkubation erfolgte die Detektion der pp38 Expression mittels Western Blot und die Darstellung der optischen Dichte der Proteinbanden als Mittelwert von 3 voneinander unabhängigen Versuchen sowie die Bestimmung der vorhandenen Mediatoren im Überstand mittels

Sandwich-ELISA. Unser Ziel war es hier, den Einfluss von IL-1 β im Zellüberstand der infizierten Alveolarmakrophagen auf eine Aktivierung der p38 MAP Kinase sowie die Freisetzung inflammatorischer Mediatoren zu verdeutlichen.

3.6.1 Expression von pp38 durch MLE-12 Zellen im Rahmen der Inkubation mit Alveolarmakrophagen-Überständen

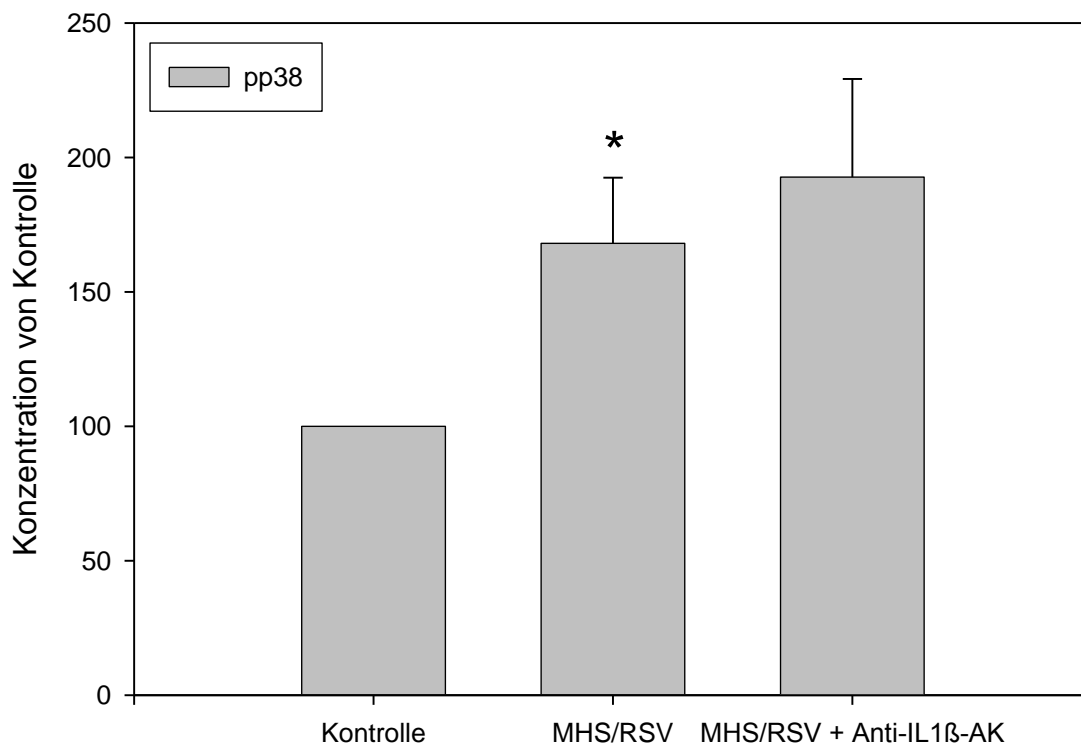


Abbildung 28: Expression von pp38 in MLE-12 Zellen nach Inkubation mit MH-S Überständen

Durch Inkubation von MLE-12 Zellen mit den Überständen RSV infizierter MH-S Zellen kommt es nach 15-minütiger Inkubation zu einer signifikanten Erhöhung der pp38 Expression ($p=0,0493$). Die Zugabe des Anti-IL-1 β -Antikörpers führt nicht zu einem Abfallen der pp38 Expression.

3.6.2 Freisetzung von Mediatoren durch MLE-12 Zellen nach Inkubation mit Überständen RSV-infizierter MH-S Zellen

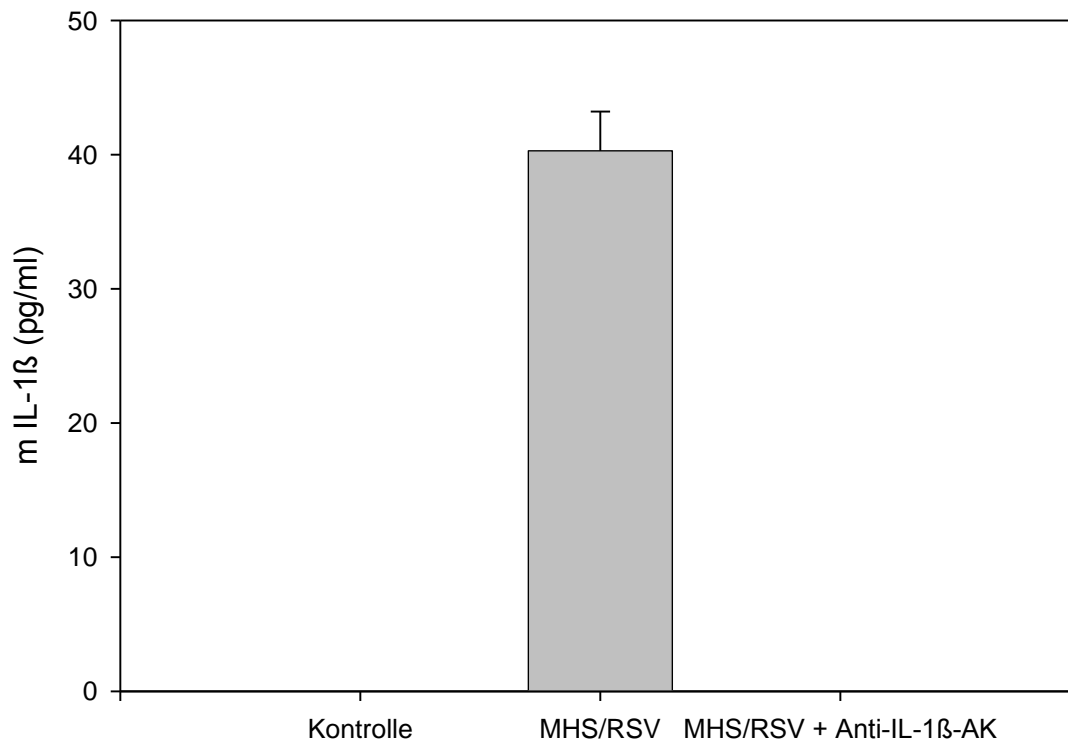


Abbildung 29: mIL-1 β Konzentration nach Inkubation mit Überständen RSV-infizierter Makrophagen (MH-S Zellen)

Nach Inkubation von MLE-12 Zellen mit den Überständen RSV-infizierter Alveolarmakrophagen konnte gezeigt werden, dass es zu keiner Neubildung von IL-1 β nach Inkubation mit den IL-1 β freien Überständen durch MLE-12 Zellen kommt, d.h. weder die inaktivierten RSV-Viren, noch die darüber hinaus im Überstand der MH-S Zellen vorhandenen Mediatoren sind in der Lage, eine IL-1 β Produktion zu induzieren.

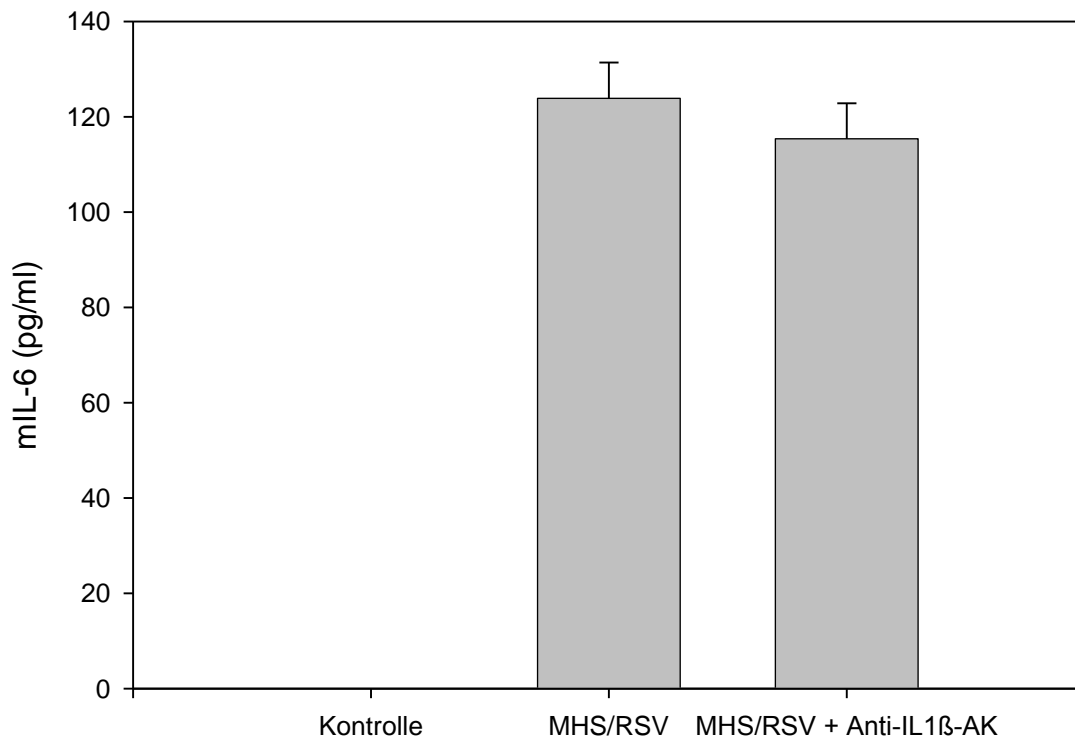


Abbildung 30: mIL-6 Konzentration nach Inkubation mit Überständen RSV-infizierter Makrophagen (MH-S Zellen)

Durch Zugabe von Anti-IL1 β Antikörper zum MHS Überstand kommt es zu keinem signifikanten Abfall bzw. Anstieg der Konzentration von IL-6. Es lässt sich jedoch sowohl in der Probe mit als auch ohne vorherige Neutralisierung von mIL-1 β eine signifikant erhöhte mIL-6 Konzentration verglichen mit der Kontrollprobe nachweisen (MHS/RSV $p=0,0000807$; MHS/RSV + AK $p=0,000103$).

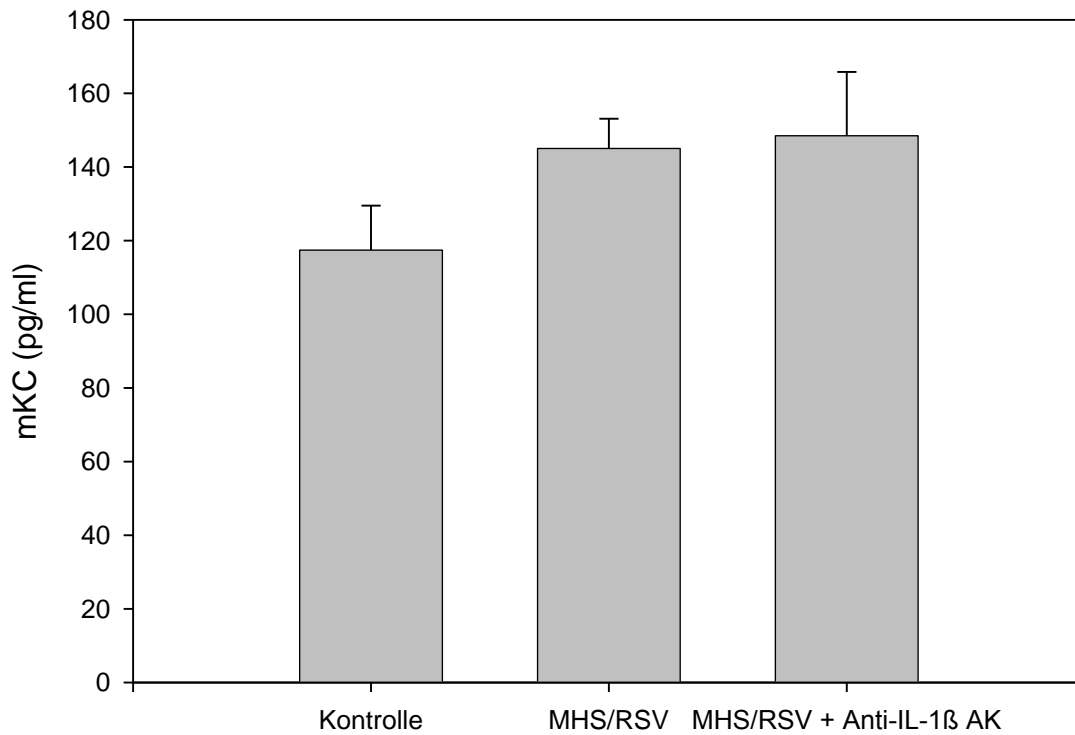


Abbildung 31: mKC Konzentration nach Inkubation mit Überständen RSV-infizierter Makrophagen (MH-S Zellen)

Vergleichbar mit den Ergebnissen für IL-6 führte die Neutralisierung von IL-1 β nicht zu einer signifikanten Veränderung der Konzentration von mKC im Zellüberstand. Die Konzentrationen von mKC beider Proben waren im Vergleich zur Kontrolle – im Gegensatz zur Konzentration von IL-6 - jedoch nicht signifikant erhöht.

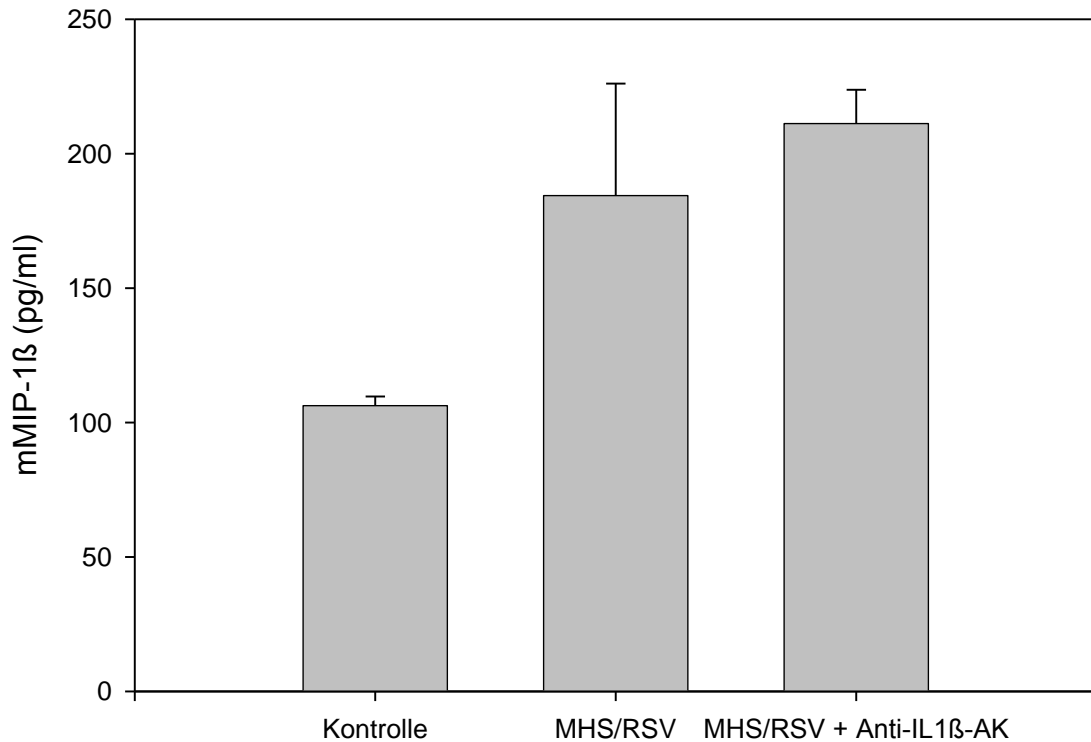


Abbildung 32: CCL4 Konzentration nach Inkubation mit Überständen RSV-infizierter Makrophagen (MH-S Zellen)

Nach Inkubation von MLE-12 Zellen mit den Überständen RSV-infizierter Makrophagen kommt es zu einem nicht signifikanten Anstieg der mMIP-1β Konzentration. Auch hier führte die Neutralisierung von IL-1β im Überstand vor Inkubation nicht zu einer signifikanten Veränderung der mMIP-1β Produktion.

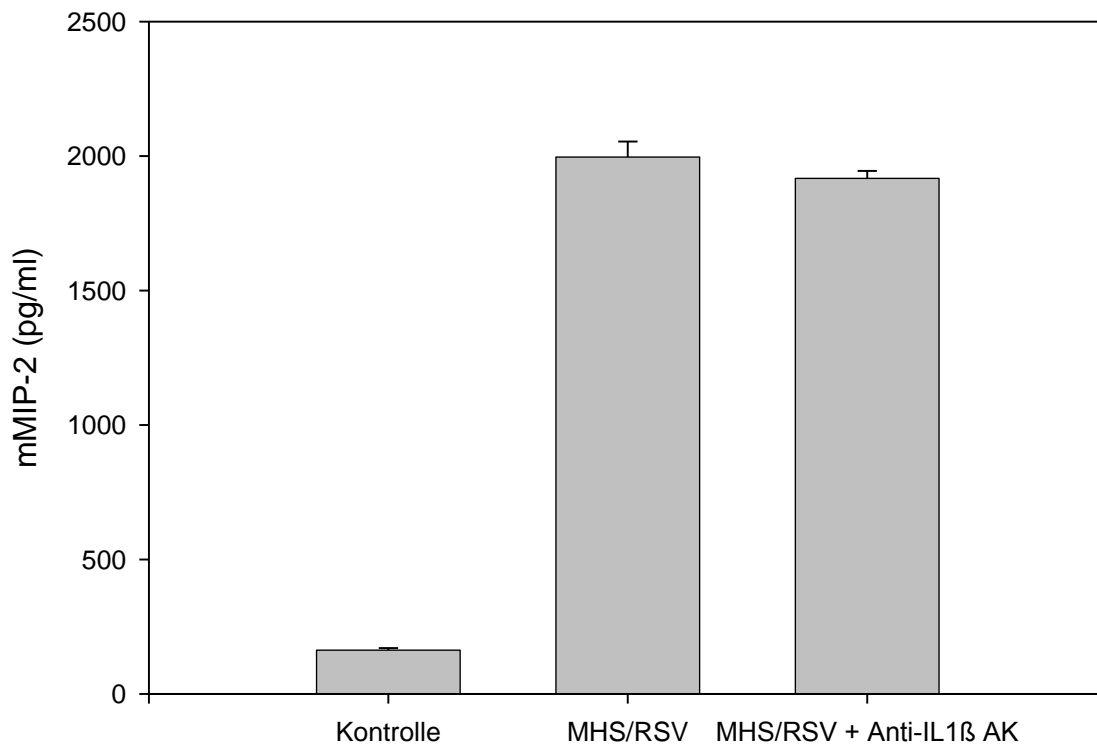


Abbildung 33: mMIP-2 Konzentration nach Inkubation mit Überständen RSV-infizierter Makrophagen (MH-S Zellen)

MIP-2 konnte im Überstand der MLE-12 Zellen signifikant erhöht nachgewiesen werden ($p=0,0000061728$). Eine Neutralisierung von IL-1 β hatte auch hier keinen Einfluss auf die Sekretion von mMIP-2.

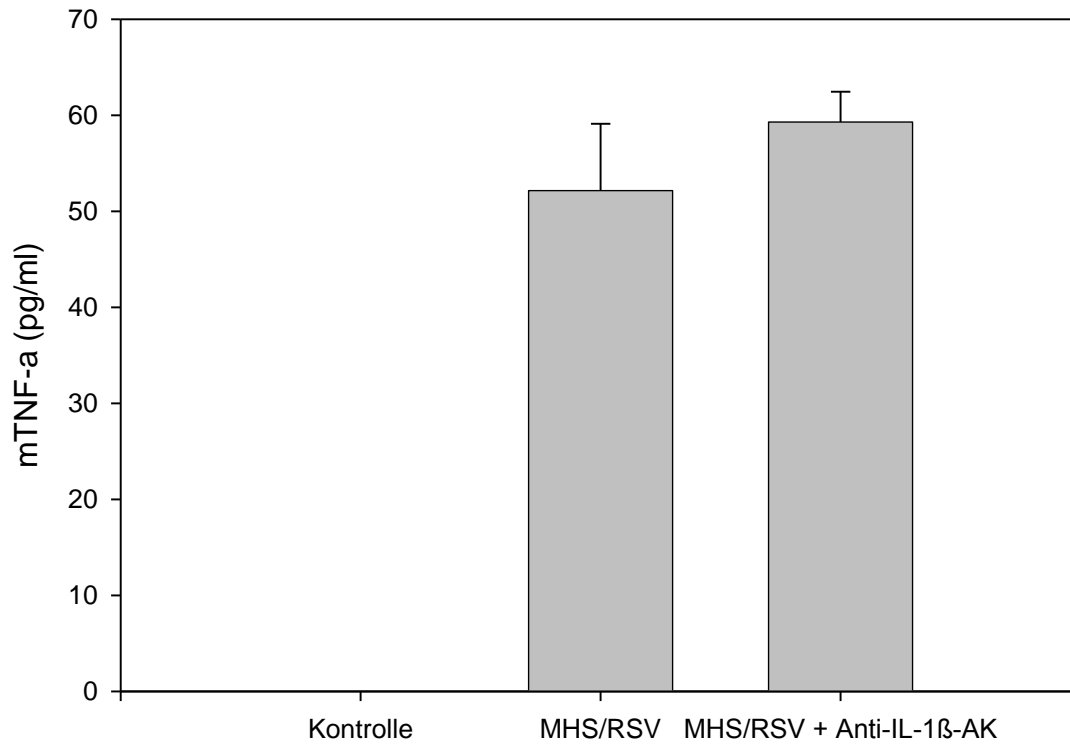


Abbildung 34: mTNF-alpha Konzentration nach Inkubation mit Überständen RSV-infizierter Makrophagen (MH-S Zellen)

TNF-alpha konnte signifikant erhöht ($p=0,0016978$) nachgewiesen werden. Die Zugabe des Anti-IL-1 β Antikörper führte auch hier zu keiner Veränderung der mTNF-alpha Produktion.

4. Diskussion

RSV stellt die häufigste Ursache von Infektionen des unteren Respirationstraktes bei Kindern bis zum Ende des ersten Lebensjahres dar. Die primären Zielzellen für das Respiratory Syncytial Virus sind die Epithelzellen der Atemwege, genauer gesagt, die Epithelzellen des unteren Respirationstraktes. Diese stellen die erste Barriere im Kampf gegen den Virus dar. So ist es auch nicht verwunderlich, dass genau sie am meisten von der RSV assoziierten Entzündungsreaktion betroffen sind. Neben den Epithelzellen des Respirationstraktes können auch die im Bronchialsystem ansässigen Alveolarmakrophagen direkt von RSV infiziert werden. Beide Zellarten sind aufgrund der RSV-Infektion in der Lage, eine Reihe unterschiedlicher Entzündungsmediatoren freizusetzen. Unter diesen nimmt IL-1 β als proinflammatorisches Zytokin eine wichtige Rolle ein. Bisher konnte im Tiermodell und in humanen Zellen eine Produktion von IL-1 β nach RSV-Infektion nachgewiesen werden^{104, 172-175}. Dabei waren es neben Lungenepithelzellen v.a. alveoläre Makrophagen, die nach Infektion mit RSV in der Lage sind IL-1 β freizusetzen. Durch die Sekretion von IL-1 β sowie anderer Entzündungsmediatoren wird die interzelluläre Kommunikation der bei der RSV-Infektion beteiligten Zellarten erst ermöglicht.

Für die intrazelluläre Reizweiterleitung nach RSV Infektion spielen eine Reihe unterschiedlicher Stoffwechselwege eine wichtige Rolle. Bezüglich der p38 MAP Kinase war es die Arbeitsgruppe um Pazdrak, die in humanen Epithelzellen bereits einen direkten Zusammenhang zwischen ihrer Aktivierung und der Produktion bestimmter Entzündungsmediatoren wie z.B. RANTES⁸⁷ nachweisen konnte

4.1 Die Rolle von IL-1 β im Rahmen der RSV Infektion

Bei der Infektion eines Organismus mit Respiratory Syncytial Virus wird alveolaren Makrophagen eine wichtige Rolle in der Abwehr der RSV Infektion zugeschrieben. Dabei sind RS- Viren in der Lage, direkt auf alveolare Makrophagen einzuwirken und eine Sekretion unterschiedlichster Mediatoren wie z.B. IL-1 β , CCL3, IL-10, TNF-alpha, IL-6, IL-8 u.a hervorzurufen⁷⁴⁻⁷⁶. Auch weisen einige Publikationen bereits darauf hin, dass RSV darüber hinaus in der Lage ist, auch in Makrophagen zu replizieren^{169, 179, 180}. Die freigesetzten Mediatoren können nun wiederum direkt auf Makrophagen sowie auf Epithelzellen des Respirationstraktes einwirken und zu einer Verstärkung der inflammatorischen Antwort führen. In Epithelzellen führt diese Stimulation zu einer zusätzlichen Freisetzung verschiedenster Mediatoren, die in der Pathologie der RSV-Infektion eine entscheidende Rolle spielen indem sie beispielsweise chemotaktische Wirkung zeigen. Alles in allem kommt es durch die beschriebenen und in dieser Arbeit untersuchten Interaktionen zur Ausprägung fulminanter inflammatorischer Prozesse. Wir konnten in dieser Arbeit nachweisen, dass durch eine Infektion mit RSV in murinen Alveolarmakrophagen die Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β induziert wurde. Daraus ergab sich die Frage, ob dieses Zytokin nach Freisetzung durch Alveolarmakrophagen einen Effekt auf die Epithelzellen des Respirationstraktes hat. Um diesen Einfluss näher zu verifizieren, stimulierten wir sowohl murine Lungenepithelzellen des distalen Bronchial- bzw. Alveolartraktes (MLE-12) als auch eine aus Lungenadenomen gewonnene Epithelzelllinie (LA-4) von Mäusen.

Diese Stimulation mit IL-1 β führte in LA-4 Zellen zu einem zeitanhängigen Anstieg der Konzentrationen des proinflammatorischen Chemokins KC mit signifikant erhöhten Werten nach 24 Stunden. Ein Nachweis der zusätzlich gemessenen Mediatoren (TNF-alpha, CCL4, CCL3, MIP-2, MCP-5, IL-10) war zu keinem der untersuchten Zeitpunkte (1Stunde, 6 Stunden, 12 Stunden, 24 Stunden) möglich.

Vergleichbar mit den Ergebnissen in LA-4 Zellen führte die IL-1 β Stimulation von MLE-12 Zellen mit IL-1 β ebenfalls zu einem zeitabhängigen Anstieg der KC-Konzentration im Zellüberstand. Hier waren signifikant erhöhte Konzentrationen zu allen untersuchten Zeitpunkten detektierbar. Verglichen mit den Konzentrationen im Überstand der LA-4 Zellen waren die Absolutwerte nach 24-Stunde bei MLE-12 Zellen etwa um die Hälfte niedriger. Desweiteren konnte im Überstand von MLE-12 Zellen neben KC noch eine geringe (nicht signifikante) Konzentration von CCL-4 in der 24-Stunden Probe detektiert werden.

Alveolarmakrophagen sezernieren im Rahmen einer RSV-Infektion neben IL-1 β eine Reihe weiterer Mediatoren. Dies konnte bereits von einigen Arbeitsgruppen nachgewiesen werden¹⁸¹. Da diese, wie auch IL-1 β , nach Sekretion durch Alveolarmakrophagen auf Epithelzellen einwirken können, wurden MLE-12 Zellen (Epithelzellen) mit den gewonnenen Überstände der RSV-infizierten MH-S Zellen (Makrophagenzelllinie) für 1 Stunde versetzt.

Wir konnten zeigen, dass die Neutralisierung von IL-1 β zu keinen signifikanten Veränderungen der Konzentrationen der von uns bestimmtem Mediatoren führte. Dies legte den Verdacht nahe, dass IL-1 β im Rahmen der RSV verglichen mit dem Virus selbst eine nur untergeordnete Rolle spielt. Unbeantwortet bleibt aber die Frage, ob gegebenenfalls die Produktion weiterer, von uns nicht bestimmten Mediatoren, durch Neutralisierung von IL-1 β beeinflusst werden können.

4.2. Einfluss einer Infektion mit RSV und UV-RSV auf die Mediatorproduktion

Neben dem oben beschriebenen indirekten Einwirken von RSV auf Epithelzellen mit Hilfe der von Alveolarmakrophagen gebildeten Zytokine und Chemokine sind RS-Viren natürlich auch in der Lage, Lungenepithelzellen

direkt zu infizieren. Um die Mediatorproduktion nach Infektion mit RSV untersuchen zu können, wurden MLE-12 Zellen mit RS-Viren (MOI 1) infiziert. Wir konnten zeigen, dass dadurch die Produktion von MIP-1 β , IL-6 sowie KC induziert wird. Allen detektierten Mediatoren war dabei ein zeitabhängiger signifikanter Anstieg der Konzentrationen mit einem Maximum nach 24 Stunden gemeinsam. Ein Nachweis von TNF-alpha, IL-1 β , MIP-2, MCP-5 und IL-10 gelang zu keinem der untersuchten Zeitpunkte. Einige Arbeitsgruppen waren bisher in der Lage in humanen Zellen in vitro ähnliche Resultate zu erzielen. Bei näherer Betrachtung fällt die zellspezifische Produktion von Chemokinen und Zytokinen nach RSV Infektion auf. Es konnte beispielsweise bereits gezeigt werden, dass humane Lungenepithelzellen (BEAS-2B) nach einer Infektion mit RSV die Produktion von RANTES, IL-6 sowie IL-8 induzieren¹⁸². Auch in LA-4 Zellen sowie in vivo gelang bereits der Nachweis von KC, RANTES sowie MCP-1 nach einer Infektion mit RSV durch die Arbeitsgruppe von Miller¹⁶⁹. Desweiteren gibt es eine Reihe an Publikationen die in humanen Zellen als auch in vivo beim Menschen die Produktion verschiedener Chemokine bzw. Zytokine wie RANTES, MCP, Eotaxin, IL-9, TNF- α , IL-6, IL-1 und Fractalkine nach RSV Infektion nachweisen konnten^{62, 159, 183-187}. Damit war unser Modell mit anderen vergleichbar.

Um die Frage zu beantworten, ob die Produktion der Mediatoren von der Replikationsfähigkeit des Virus abhängig ist, wurden MLE-12 Zellen mit UV-inaktivierten RS-Viren infiziert. Dabei konnten wir in den Überständen der Zellen dieselben Mediatoren wie nach Infektion mit nicht UV-behandelten Viren nachweisen. Für Interleukin-6 und KC zeigten sich deutlich erniedrigte Konzentrationen bei vergleichbarem zeitabhängigem Anstieg der Konzentrationen, die Konzentrationen von CCL-4 wiesen vergleichbare Werte wie nach Infektion mit replikationsfähigem Virus auf. Die Oberflächenproteine von RSV (S- und G-Protein) sind noch wie in einer Studie von Oshansky gezeigt werden konnte vor einer Infektion der Zielzelle in der Lage, die frühe Immunantwort und die Produktion proinflammatorischer Mediatoren zu induzieren. Dieser konnte die Produktion von IL-8, MCP-1, RANTES und IP-10

nach Stimulation mit G- und F-Protein nachweisen¹⁸⁸. Betrachtet man unsere Ergebnisse, so kann man erkennen, dass nicht replizierende RS-Viren die gleichen Mediatoren wie RSV nur in geringeren Konzentrationen induzieren.

4.3 Stellenwert der p38 MAP Kinase bei RSV Infektion

Die p38 MAP Kinase spielt eine wichtige Rolle bei einer großen Anzahl an Erkrankungen. Dabei ist bekannt, dass die Regulation der Zytokin- und Chemokin-Biosynthese in unterschiedlichen Zellarten eng mit einer Aktivierung der p38 MAP Kinase verbunden ist⁸⁷. Als Aktivatoren der MAP-Signalkaskade in humanen Zellen dienen dabei unterschiedlichste Reize. Dazu gehören unter anderem unterschiedliche Zytokine (z.B. IL-1 β), Lipopolysaccharide (LPS), Röntgen-Strahlen, UV-Strahlen oder auch virale Infektionen (z.B. mit RSV)⁸⁷. Dabei ist v.a. die Produktion proinflammatorischer Mediatoren wie TNF-alpha, IL-1 β , RANTES oder IL-8, die bei der Entstehung und Aufrechterhaltung inflammatorischer Prozesse eine entscheidende Rolle spielen, sehr oft eng mit einer Aktivierung der p38 MAP Kinase verbunden⁸⁷.

Unser Ziel war es die Rolle der p38 MAP Kinase im Zusammenspiel von Alveolarmakrophagen und Epithelzellen während der RSV Infektion zu untersuchen. Die Stimulation von LA-4 und MLE-12 Zellen mit IL-1 β führte in beiden Zelllinien zu einer Aktivierung der katalytischen Aktivität der p38 MAP Kinase.

In LA-4 Zellen ist diese signifikante Aktivierung durch Phosphorylierung von ATF-2 erst nach 6-stündiger Inkubation mit IL-1 β nachzuweisen wohingegen die Expression von pp38 bereits nach 15 min und nochmalig nach 6 Stunden signifikant erhöht ist. Im Gegensatz dazu erkennt man in MLE-12 Zellen einen signifikanten Anstieg der katalytischen Aktivität der p38 MAP Kinase bereits nach 15 min bei gleichzeitigem Anstieg der Expression von pp38 nach 15 min.

Uns gelang es zudem nachzuweisen, dass auch die Infektion mit RSV bzw. UV-RSV zu einem Anstieg der katalytischen Aktivität von p38 in MLE-12 Zellen nach einer Stunde führt. Diese Ergebnisse decken sich mit denen von Pazdrak et. al., der in humanen Lungenepithelzellen (A549) ebenfalls einen Anstieg der p38 MAP Kinase Aktivität mit einem Maximum 6 Stunden nach Infektion mit RSV nachweisen konnte.

Nach RSV Infektion waren Aktivitätsspeaks nach einer und 24 Stunden erkennbar. Dies deutet darauf hin, dass zum einen wie oben beschrieben bereits der Kontakt der viralen Oberflächenproteine mit den Zielzellen die intrazelluläre Signalkaskade induziert und es – vermutlich durch letztendliche Infektion des Virus und intrazellulärer Replikation – zu einer weiteren Aktivierung der p38 MAP Kinase nach 24 Stunden kommt.

Passend zu dieser Hypothese war nach Infektion mit UV-inaktiviertem RSV nur der Aktivierungsspeak für die p38 MAPK nach einer Stunde zu detektieren.

Die Expression von pp38 zeigte sowohl nach RSV als auch UV-RSV Infektion keine signifikanten Veränderungen. Diese Beobachtungen decken sich mit denen von Pazdrak et. al., der in murinen Lungenepithelzellen nach RSV Infektion und einem Anstieg der katalytischen Aktivität der p38 MAP Kinase, keine signifikanten Veränderungen für pp38 nachweisen konnte⁸⁷.

Um den Einfluss von IL-1 β auch im Zusammenhang mit einer RSV-Infektion zu verifizieren, inkubierten wir MLE-12 Zellen mit den Überständen RSV-infizierter alveolärer Makrophagen. Wir konnten nach 15-minütiger Inkubation einen signifikanten Anstieg der pp38 Expression nachweisen. Gleichzeitig führte die Neutralisierung von IL-1 β in diesem Überstand nicht zu einer signifikanten Veränderung der pp38 Expression. Dies ließ den Schluss nahe, dass einer der im Überstand neben IL-1 β vorhandenen Mediatoren bzw. noch im Überstand befindliche inaktivierte RS-Viren oder aber die die Kombination aus beidem, für die verstärkte pp38 Expression verantwortlich waren.

Aufgrund der herausragenden Stellung von p38 im Rahmen vieler entzündlicher Prozesse wurden bis heute mehr als 100 verschiedene MAP Kinase Inhibitoren entwickelt um einen positiven Einfluss auf den Ablauf der Entzündungsreaktion nehmen zu können. Allen entwickelten Inhibitoren gemeinsam ist dabei die Hemmung der kompetitiven Bindung von ATP an die p38 MAP Kinase. SB203580 inhibiert dabei sowohl die p38 α als auch die p38 β Isoform der p38 Kinase. Es gibt bereits einige Publikationen, die zeigen konnten, dass SB 203580 sowohl die Aktivierung der p38 MAP Kinase deutlich reduziert, als auch die Sekretion von Chemokinen wie IL-8 vermindert. Darüber hinaus war es der Arbeitsgruppe um Tamura gelungen bereits 1999 nachzuweisen ⁶, dass bereits die frühen Schritte der Inflammation wie Leukozytenadhärenz und Diapedese durch SB 203580 aufgrund einer geringeren Expression von ICAM-1 in mikrovaskulären Endothelzellen gehemmt werden kann.

Durch die Inhibition der p38 MAP Kinase mit SB 203580 war ein Anstieg der katalytischen Aktivität der p38 MAPK nach RSV Infektion nicht mehr nachzuweisen. Bezüglich der unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen konnten wir keine signifikanten Unterschiede detektieren. Wie bei den bereits zuvor durchgeführten Versuchen ohne SB 203580 Inhibitor, konnte nach einer Stunde RSV Infektion nur KC im Überstand der Zellen nachgewiesen werden. Auch hier zeigte sich ein positiver Einfluss der Vorbehandlung mit SB 203580 durch eine deutliche Reduktion der KC Konzentration im Überstand der infizierten MLE-12 Zellen.

Auch wir konnten somit letztendlich zeigen, dass die p38 MAP Kinase bei einer Infektion mit RSV eine entscheidende Schlüsselposition unter anderem durch die Reduktion der proinflammatorischen Mediatorproduktion wie z.B. KC einnimmt.

5. Zusammenfassung

RSV stellt bis heute den wichtigsten Erreger von Infektionen des unteren Respirationstraktes bei Kleinkindern dar. Bis zum 3. Lebensjahr haben nahezu alle Kinder eine Infektion mit RSV durchgemacht^{189, 190}. Die Symptome reichen von milden grippalen Symptomen bis hin zu schweren Bronchiolitiden und Pneumonien.

Im Rahmen der RSV Infektion kommt es zu einem Zusammenspiel unterschiedlicher Zellarten und Mediatoren. Dabei spielen Lungenepithelzellen sowie Alveolarmakrophagen eine entscheidende Rolle. Wir konnten in-vitro nachweisen, dass eine Infektion sowohl in Epithelzellen als auch Alveolarmakrophagen die Produktion proinflammatorischer Mediatoren induziert. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede bezüglich der gemessenen Konzentrationen von KC und IL-6 nach Infektion mit replikationsfähigen Viren und mit UV-inaktiviertem RS-Virus. Gemeinsam war beiden Versuchsreihen der zeitabhängige Anstieg der Mediatorkonzentrationen. Desweiteren gelang es uns nach RSV Infektion den direkten Zusammenhang zwischen einer Aktivierung der katalytischen Aktivität von p38 und Chemokin/Zytokinsekretion in MLE-12 Zellen nachzuweisen. Sowohl RSV als auch der Kontakt mit UV-inaktivierten RS-Viren führte zur Aktivierung der intrazellulären MAP-Kinase. Durch Inhibierung der p38 MAP Kinase mittels SB 203850 konnten wir einerseits einen deutlichen Rückgang der p38 Aktivierung als auch weit geringere Konzentrationen von KC im Zellüberstand nachweisen. Dies bestätigte unsere Vermutung, dass die p38 MAP Signalkaskade und deren Aktivierung einen wichtigen Teilschritt für die Sekretion von Mediatoren nach RSV-Kontakt darstellt. Die entstehenden Mediatoren sind wiederum in der Lage auf unterschiedliche Zellarten einzuwirken. Dieses Zusammenwirken ist für die Aufrechterhaltung der Infektion mit RSV von entscheidender Bedeutung. Als eines der wichtigsten proinflammatorischen Zytokine legten wir besonderes Augenmerk auf IL-1 β .

IL-1 β wird unter anderem von Alveolarmakrophagen nach RSV Infektion gebildet und ist in der u.a. auf Lungenepithelzellen einzuwirken. Dabei zeigen sich zellspezifische Reaktionsmuster. Während wir sowohl in LA-4 als auch MLE-12 Zellen die Produktion von KC mit zeitabhängigem Konzentrationsanstieg nachweisen konnten, erkennt man bezüglich der p38 MAP Kinase Aktivierung deutliche Unterschiede. In LA4-Zellen war diese erst nach 6 Stunden, in MLE-12 Zellen bereits nach 15 min zu detektieren. Letztendlich konnten wir den Einfluss von IL-1 β im Rahmen der RSV Infektion aber eher als gering einstufen, da die Neutralisierung von IL-1 β im Überstand von RSV-infizierten Alveolarmakrophagen keinerlei Einfluss auf die Mediatorproduktion von MLE-12 Zellen nach Inkubation mit diesen Überständen erkennen ließ.

Eine Infektion mit RSV lässt sich letztendlich nur dann verstehen, wenn alle involvierten Zellarten und Mediatoren und deren Wirkungen aufeinander berücksichtigt werden. Dies ist bis heute nicht abschließend gelungen und so wird RSV und die dadurch hervorgerufene Inflammation auch in Zukunft Gegenstand vieler weiterer Untersuchungen bleiben.

6. Anhang

6.1. Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
CSIF	Zytokinsynthese inhibierender Faktor
DAPI	4',6Diamidino-2-Phenylidol
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamidtetraacetat
ELISA	Enzym-linked immunosorbend Assay
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
IL-1RA	Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
KC	Keratinozyten Zytokin
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
LAK	Lymphokinaktivierte Killerzelle
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MIP	Makrophageninflammatorisches Zytokin
MKK	Mitogenaktivierte Proteinkinase-Kinase
MKKK	Mitogenaktivierte Proteinkinase Kinase
Kinase	
MOI	Multiplicity of infection
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
NaHPO ₄	Natriumhydrogenphosphat

NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NF-kappaB	Nukleärer Faktor Kappa B
NK-Zelle	Natürliche Killer Zelle
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PFU	Plaque formierende Einheit
RNA	Ribonukleinsäure
RSV (RS-Virus)	Respiratorisches Synzytial Virus
SAPK	Stress aktivierte Proteinkinase
SEM	Standardmessfehler der Mittelwerte
SV-40	Simian-Virus 40
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
u.v.m.	und viele mehr
z.B.	zum Beispiel

6.2. Literaturverzeichnis

1. CHANOCK R, ROIZMAN B, MYERS R. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization
2. Am J Hyg 1957;66(3):281-290.
2. Nohynek H, Eskola J, Laine E et al. The causes of hospital-treated acute lower respiratory tract infection in children
1504. Am J Dis Child 1991;145(6):618-622.
3. Ruuskanen O, Nohynek H, Ziegler T et al. Pneumonia in childhood: etiology and response to antimicrobial therapy
1374. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1992;11(3):217-223.
4. McIntosh K. Pathogenesis of severe acute respiratory infections in the developing world: respiratory syncytial virus and parainfluenza viruses
54. Rev Infect Dis 1991;13 Suppl 6:S492-S500.
5. Denny FW, Clyde WA, Jr. Acute lower respiratory tract infections in nonhospitalized children
1. J Pediatr 1986;108(5 Pt 1):635-646.
6. Collins PL, Dickens LE, Buckler-White A et al. Nucleotide sequences for the gene junctions of human respiratory syncytial virus reveal distinctive features of intergenic structure and gene order
2216. Proc Natl Acad Sci U S A 1986;83(13):4594-4598.
7. Collins PL, Huang YT, Wertz GW. Identification of a tenth mRNA of respiratory syncytial virus and assignment of polypeptides to the 10 viral genes
2466. J Virol 1984;49(2):572-578.
8. Levine S, Klaiber-Franco R, Paradiso PR. Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus
2053. J Gen Virol 1987;68 (Pt 9):2521-2524.
9. Zhao X, Singh M, Malashkevich VN, Kim PS. Structural characterization of the human respiratory syncytial virus fusion protein core
1202. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97(26):14172-14177.
10. Respiratory syncytial virus activity--United States, 1999-2000 season. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2000;49(48):1091-1093.
11. Glezen WP, Taber LH, Frank AL, Kasel JA. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus
2224. Am J Dis Child 1986;140(6):543-546.

12. Parrott RH, Kim HW, Brandt CD, Chanock RM. Respiratory syncytial virus in infants and children
3071. *Prev Med* 1974;3(4):473-480.
13. Ruuskanen O, Ogra PL. Respiratory syncytial virus
1245. *Curr Probl Pediatr* 1993;23(2):50-79.
14. Shay DK, Holman RC, Newman RD, Liu LL, Stout JW, Anderson LJ. Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996
1512. *JAMA* 1999;282(15):1440-1446.
15. Shay DK, Holman RC, Roosevelt GE, Clarke MJ, Anderson LJ. Bronchiolitis-associated mortality and estimates of respiratory syncytial virus-associated deaths among US children, 1979-1997
1212. *J Infect Dis* 2001;183(1):16-22.
16. Simoes EA, Carbonell-Estrany X. Impact of severe disease caused by respiratory syncytial virus in children living in developed countries
567. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22(2 Suppl):S13-S18.
17. Henrickson KJ, Hoover S, Kehl KS, Hua W. National disease burden of respiratory viruses detected in children by polymerase chain reaction
5. *Pediatr Infect Dis J* 2004;23(1 Suppl):S11-S18.
18. Murphy TF, Henderson FW, Clyde WA, Jr., Collier AM, Denny FW. Pneumonia: an eleven-year study in a pediatric practice
2724. *Am J Epidemiol* 1981;113(1):12-21.
19. Goldman DA. Nosocomial viral infections: recent developments and new strategies
1889. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989;8(1):75-81.
20. La Via WV, Marks MI, Stutman HR. Respiratory syncytial virus puzzle: clinical features, pathophysiology, treatment, and prevention
1298. *J Pediatr* 1992;121(4):503-510.
21. Boyce TG, Mellen BG, Mitchel EF, Jr., Wright PF, Griffin MR. Rates of hospitalization for respiratory syncytial virus infection among children in medicaid
1201. *J Pediatr* 2000;137(6):865-870.
22. Wang EE, Law BJ, Boucher FD et al. Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada (PICNIC) study of admission and management variation in patients hospitalized with respiratory syncytial viral lower respiratory tract infection
2227. *J Pediatr* 1996;129(3):390-395.
23. Navas L, Wang E, de C, V, Robinson J. Improved outcome of respiratory syncytial virus infection in a high-risk hospitalized population of Canadian

- children. Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada
1307. *J Pediatr* 1992;121(3):348-354.
24. Hall CB. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *N Engl J Med* 2001;344(25):1917-1928.
25. Walsh EE, Falsey AR, Hennessey PA. Respiratory syncytial and other virus infections in persons with chronic cardiopulmonary disease 1558. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160(3):791-795.
26. Hassan IA, Chopra R, Swindell R, Mutton KJ. Respiratory viral infections after bone marrow/peripheral stem-cell transplantation: the Christie hospital experience
478. *Bone Marrow Transplant* 2003;32(1):73-77.
27. Raboni SM, Nogueira MB, Tsuchiya LR et al. Respiratory tract viral infections in bone marrow transplant patients
463. *Transplantation* 2003;76(1):142-146.
28. Falsey AR, Walsh EE. Respiratory syncytial virus infection in adults
1319. *Clin Microbiol Rev* 2000;13(3):371-384.
29. McIntosh K. Pathogenesis of severe acute respiratory infections in the developing world: respiratory syncytial virus and parainfluenza viruses
1516. *Rev Infect Dis* 1991;13 Suppl 6:S492-S500.
30. Wang EE, Law BJ, Stephens D. Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada (PICNIC) prospective study of risk factors and outcomes in patients hospitalized with respiratory syncytial viral lower respiratory tract infection
2497. *J Pediatr* 1995;126(2):212-219.
31. Whimbey E, Couch RB, Englund JA et al. Respiratory syncytial virus pneumonia in hospitalized adult patients with leukemia
2435. *Clin Infect Dis* 1995;21(2):376-379.
32. Hall CB, Douglas RG, Jr., Geiman JM. Quantitative shedding patterns of respiratory syncytial virus in infants
88. *J Infect Dis* 1975;132(2):151-156.
33. Hall CB, Douglas RG, Jr. Modes of transmission of respiratory syncytial virus
65. *J Pediatr* 1981;99(1):100-103.
34. Hall CB, Douglas RG, Jr., Schnabel KC, Geiman JM. Infectivity of respiratory syncytial virus by various routes of inoculation
64. *Infect Immun* 1981;33(3):779-783.

35. Hall CB, Walsh EE, Schnabel KC et al. Occurrence of groups A and B of respiratory syncytial virus over 15 years: associated epidemiologic and clinical characteristics in hospitalized and ambulatory children
33. *J Infect Dis* 1990;162(6):1283-1290.
36. Hoffman SJ, Laham FR, Polack FP. Mechanisms of illness during respiratory syncytial virus infection: the lungs, the virus and the immune response
176. *Microbes Infect* 2004;6(8):767-772.
37. Legg JP, Hussain IR, Warner JA, Johnston SL, Warner JO. Type 1 and type 2 cytokine imbalance in acute respiratory syncytial virus bronchiolitis
505. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168(6):633-639.
38. Garofalo RP, Patti J, Hintz KA, Hill V, Ogra PL, Welliver RC. Macrophage inflammatory protein-1alpha (not T helper type 2 cytokines) is associated with severe forms of respiratory syncytial virus bronchiolitis
1050. *J Infect Dis* 2001;184(4):393-399.
39. Tripp RA, Moore D, Barskey A et al. Peripheral blood mononuclear cells from infants hospitalized because of respiratory syncytial virus infection express T helper-1 and T helper-2 cytokines and CC chemokine messenger RNA
826. *J Infect Dis* 2002;185(10):1388-1394.
40. van Benten IJ, van Drunen CM, Koopman LP et al. RSV-induced bronchiolitis but not upper respiratory tract infection is accompanied by an increased nasal IL-18 response
436. *J Med Virol* 2003;71(2):290-297.
41. Hall CB. Respiratory syncytial virus: A continuing culprit and conundrum
13. *J Pediatr* 1999;135(2 Pt 2):2-7.
42. Openshaw PJ. Antiviral immune responses and lung inflammation after respiratory syncytial virus infection. *Proc Am Thorac Soc* 2005;2(2):121-125.
43. Anas N, Boettrich C, Hall CB, Brooks JG. The association of apnea and respiratory syncytial virus infection in infants
61. *J Pediatr* 1982;101(1):65-68.
44. Bruhn FW, Mokrohisky ST, McIntosh K. Apnea associated with respiratory syncytial virus infection in young infants
2938. *J Pediatr* 1977;90(3):382-386.
45. Church NR, Anas NG, Hall CB, Brooks JG. Respiratory syncytial virus-related apnea in infants. Demographics and outcome
53. *Am J Dis Child* 1984;138(3):247-250.

46. Hall CB, Hall WJ, Speers DM. Clinical and physiological manifestations of bronchiolitis and pneumonia. Outcome of respiratory syncytial virus 76. *Am J Dis Child* 1979;133(8):798-802.
47. Leader S, Kohlhase K. Respiratory syncytial virus-coded pediatric hospitalizations, 1997 to 1999 703. *Pediatr Infect Dis J* 2002;21(7):629-632.
48. Stretton M, Ajizian SJ, Mitchell I, Newth CJ. Intensive care course and outcome of patients infected with respiratory syncytial virus 1333. *Pediatr Pulmonol* 1992;13(3):143-150.
49. Law BJ, de C, V. Respiratory syncytial virus infections in hospitalized Canadian children: regional differences in patient populations and management practices. The Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada 2756. *Pediatr Infect Dis J* 1993;12(8):659-663.
50. Moler FW, Khan AS, Meliones JN, Custer JR, Palmisano J, Shope TC. Respiratory syncytial virus morbidity and mortality estimates in congenital heart disease patients: a recent experience 1299. *Crit Care Med* 1992;20(10):1406-1413.
51. Nicholson KG. Impact of influenza and respiratory syncytial virus on mortality in England and Wales from January 1975 to December 1990 2346. *Epidemiol Infect* 1996;116(1):51-63.
52. Thompson WW, Shay DK, Weintraub E et al. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States 633. *JAMA* 2003;289(2):179-186.
53. Levine AM, Whitsett JA. Pulmonary collectins and innate host defense of the lung 1. *Microbes Infect* 2001;3(2):161-166.
54. Crouch E, Wright JR. Surfactant proteins a and d and pulmonary host defense 69. *Annu Rev Physiol* 2001;63:521-554.
55. Wright JR. Immunomodulatory functions of surfactant 6. *Physiol Rev* 1997;77(4):931-962.
56. Kerr MH, Paton JY. Surfactant protein levels in severe respiratory syncytial virus infection 1665. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159(4 Pt 1):1115-1118.
57. Griese M. Respiratory syncytial virus and pulmonary surfactant 776. *Viral Immunol* 2002;15(2):357-363.

58. Barr FE, Pedigo H, Johnson TR, Shepherd VL. Surfactant protein-A enhances uptake of respiratory syncytial virus by monocytes and U937 macrophages
22. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;23(5):586-592.
59. Hickling TP, Bright H, Wing K et al. A recombinant trimeric surfactant protein D carbohydrate recognition domain inhibits respiratory syncytial virus infection in vitro and in vivo
1504. *Eur J Immunol* 1999;29(11):3478-3484.
60. Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L et al. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus
1131. *Nat Immunol* 2000;1(5):398-401.
61. Tripp RA, Jones LP, Haynes LM, Zheng H, Murphy PM, Anderson LJ. CX3C chemokine mimicry by respiratory syncytial virus G glycoprotein
1046. *Nat Immunol* 2001;2(8):732-738.
62. Haeberle HA, Takizawa R, Casola A et al. Respiratory syncytial virus-induced activation of nuclear factor-kappaB in the lung involves alveolar macrophages and toll-like receptor 4-dependent pathways. *J Infect Dis* 2002;186(9):1199-1206.
63. Monick MM, Yarovinsky TO, Powers LS et al. Respiratory syncytial virus up-regulates TLR4 and sensitizes airway epithelial cells to endotoxin
394. *J Biol Chem* 2003;278(52):53035-53044.
64. Pastey MK, Crowe JE, Jr., Graham BS. RhoA interacts with the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus and facilitates virus-induced syncytium formation
1573. *J Virol* 1999;73(9):7262-7270.
65. Singh R, Wang B, Shirvaikar A et al. The IL-1 receptor and Rho directly associate to drive cell activation in inflammation. *J Clin Invest* 1999;103(11):1561-1570.
66. Chen LY, Zuraw BL, Liu FT, Huang S, Pan ZK. IL-1 receptor-associated kinase and low molecular weight GTPase RhoA signal molecules are required for bacterial lipopolysaccharide-induced cytokine gene transcription. *J Immunol* 2002;169(7):3934-3939.
67. Chen W, Monick MM, Carter AB, Hunninghake GW. Activation of ERK2 by respiratory syncytial virus in A549 cells is linked to the production of interleukin 8
680. *Exp Lung Res* 2000;26(1):13-26.
68. Monick M, Staber J, Thomas K, Hunninghake G. Respiratory syncytial virus infection results in activation of multiple protein kinase C isoforms leading to activation of mitogen-activated protein kinase

1174. J Immunol 2001;166(4):2681-2687.
69. Pazdrak K, Olszewska-Pazdrak B, Liu T et al. MAPK activation is involved in posttranscriptional regulation of RSV-induced RANTES gene expression
1. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2002;283(2):L364-L372.
70. Garofalo R, Sabry M, Jamaluddin M et al. Transcriptional activation of the interleukin-8 gene by respiratory syncytial virus infection in alveolar epithelial cells: nuclear translocation of the RelA transcription factor as a mechanism producing airway mucosal inflammation
2185. J Virol 1996;70(12):8773-8781.
71. Mastrorarde JG, He B, Monick MM, Mukaida N, Matsushima K, Hunninghake GW. Induction of interleukin (IL)-8 gene expression by respiratory syncytial virus involves activation of nuclear factor (NF)-kappa B and NF-IL-6
2250. J Infect Dis 1996;174(2):262-267.
72. Bitko V, Velazquez A, Yang L, Yang YC, Barik S. Transcriptional induction of multiple cytokines by human respiratory syncytial virus requires activation of NF-kappa B and is inhibited by sodium salicylate and aspirin
13. Virology 1997;232(2):369-378.
73. Haeberle HA, Takizawa R, Casola A et al. Respiratory syncytial virus-induced activation of nuclear factor-kappaB in the lung involves alveolar macrophages and toll-like receptor 4-dependent pathways. J Infect Dis 2002;186(9):1199-1206.
74. Matsuda K, Tsutsumi H, Sone S et al. Characteristics of IL-6 and TNF-alpha production by respiratory syncytial virus-infected macrophages in the neonate
47. J Med Virol 1996;48(2):199-203.
75. Franke G, Freihorst J, Steinmuller C, Verhagen W, Hockertz S, Lohmann-Matthes ML. Interaction of alveolar macrophages and respiratory syncytial virus
54. J Immunol Methods 1994;174(1-2):173-184.
76. Becker S, Quay J, Soukup J. Cytokine (tumor necrosis factor, IL-6, and IL-8) production by respiratory syncytial virus-infected human alveolar macrophages
62. J Immunol 1991;147(12):4307-4312.
77. Haeberle HA, Kuziel WA, Dieterich HJ, Casola A, Gatalica Z, Garofalo RP. Inducible expression of inflammatory chemokines in respiratory syncytial virus-infected mice: role of MIP-1alpha in lung pathology. J Virol 2001;75(2):878-890.

78. Han J, Il YY. Specific gene transfer mediated by galactosylated poly-L-lysine into hepatoma cells
1312. *Int J Pharm* 2000;202(1-2):151-160.
79. Kumar S, McDonnell PC, Gum RJ, Hand AT, Lee JC, Young PR. Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;235(3):533-538.
80. Jiang Y, Gram H, Zhao M et al. Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta. *J Biol Chem* 1997;272(48):30122-30128.
81. Doza YN, Cuenda A, Thomas GM, Cohen P, Nebreda AR. Activation of the MAP kinase homologue RK requires the phosphorylation of Thr-180 and Tyr-182 and both residues are phosphorylated in chemically stressed KB cells. *FEBS Lett* 1995;364(2):223-228.
82. Rouse J, Cohen P, Trigon S et al. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* 1994;78(6):1027-1037.
83. Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS et al. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* 1995;270(13):7420-7426.
84. Zervos AS, Faccio L, Gatto JP, Kyriakis JM, Brent R. Mxi2, a mitogen-activated protein kinase that recognizes and phosphorylates Max protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(23):10531-10534.
85. Zhao M, New L, Kravchenko VV et al. Regulation of the MEF2 family of transcription factors by p38. *Mol Cell Biol* 1999;19(1):21-30.
86. Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS et al. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* 1995;270(13):7420-7426.
87. Pazdrak K, Olszewska-Pazdrak B, Liu T et al. MAPK activation is involved in posttranscriptional regulation of RSV-induced RANTES gene expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;283(2):L364-L372.
88. Oppenheim JJ. Cytokines: past, present, and future. *Int J Hematol* 2001;74(1):3-8.
89. Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 1988;53(1):45-53.

90. Bonewald LF, Wakefield L, Oreffo RO, Escobedo A, Twardzik DR, Mundy GR. Latent forms of transforming growth factor-beta (TGF beta) derived from bone cultures: identification of a naturally occurring 100-kDa complex with similarity to recombinant latent TGF beta. *Mol Endocrinol* 1991;5(6):741-751.
91. Thomassen MJ, Divis LT, Fisher CJ. Regulation of human alveolar macrophage inflammatory cytokine production by interleukin-10. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;80(3 Pt 1):321-324.
92. Yanagawa H, Sone S, Haku T et al. Contrasting effect of interleukin-13 on interleukin-1 receptor antagonist and proinflammatory cytokine production by human alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;12(1):71-76.
93. Mulligan MS, Warner RL, Foreback JL, Shanley TP, Ward PA. Protective effects of IL-4, IL-10, IL-12, and IL-13 in IgG immune complex-induced lung injury: role of endogenous IL-12. *J Immunol* 1997;159(7):3483-3489.
94. Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 2000;18:217-242.
95. Tran PB, Miller RJ. Chemokine receptors: signposts to brain development and disease. *Nat Rev Neurosci* 2003;4(6):444-455.
96. Rot A, von Andrian UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol* 2004;22:891-928.
97. Sabroe I, Lloyd CM, Whyte MK, Dower SK, Williams TJ, Pease JE. Chemokines, innate and adaptive immunity, and respiratory disease. *Eur Respir J* 2002;19(2):350-355.
98. Becker S, Soukup JM. Airway epithelial cell-induced activation of monocytes and eosinophils in respiratory syncytial viral infection. *Immunobiology* 1999;201(1):88-106.
99. Olszewska-Pazdrak B, Casola A, Saito T et al. Cell-specific expression of RANTES, MCP-1, and MIP-1alpha by lower airway epithelial cells and eosinophils infected with respiratory syncytial virus. *J Virol* 1998;72(6):4756-4764.
100. Bonville CA, Rosenberg HF, Domachowske JB. Macrophage inflammatory protein-1alpha and RANTES are present in nasal secretions during ongoing upper respiratory tract infection. *Pediatr Allergy Immunol* 1999;10(1):39-44.
101. Jaovisidha P, Peebles ME, Brees AA, Carpenter LR, Moy JN. Respiratory syncytial virus stimulates neutrophil degranulation and chemokine release. *J Immunol* 1999;163(5):2816-2820.

102. Garofalo RP, Patti J, Hintz KA, Hill V, Ogra PL, Welliver RC. Macrophage inflammatory protein-1alpha (not T helper type 2 cytokines) is associated with severe forms of respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Infect Dis* 2001;184(4):393-399.
103. Power UF, Huss T, Michaud V, Plotnicky-Gilquin H, Bonnefoy JY, Nguyen TN. Differential histopathology and chemokine gene expression in lung tissues following respiratory syncytial virus (RSV) challenge of formalin-inactivated RSV- or BBG2Na-immunized mice. *J Virol* 2001;75(24):12421-12430.
104. Blanco JC, Richardson JY, Darnell ME et al. Cytokine and chemokine gene expression after primary and secondary respiratory syncytial virus infection in cotton rats. *J Infect Dis* 2002;185(12):1780-1785.
105. Jafri HS. Role of chemokines in respiratory syncytial virus disease. *Pediatr Infect Dis J* 2002;21(5):454-456.
106. Tekkanat KK, Maassab H, Miller A, Berlin AA, Kunkel SL, Lukacs NW. RANTES (CCL5) production during primary respiratory syncytial virus infection exacerbates airway disease. *Eur J Immunol* 2002;32(11):3276-3284.
107. Werling D, Koss M, Howard CJ, Taylor G, Langhans W, Hope JC. Role of bovine chemokines produced by dendritic cells in respiratory syncytial virus-induced T cell proliferation. *Vet Immunol Immunopathol* 2002;87(3-4):225-233.
108. Olszewska-Pazdrak B, Casola A, Saito T et al. Cell-specific expression of RANTES, MCP-1, and MIP-1alpha by lower airway epithelial cells and eosinophils infected with respiratory syncytial virus. *J Virol* 1998;72(6):4756-4764.
109. Becker S, Soukup JM. Airway epithelial cell-induced activation of monocytes and eosinophils in respiratory syncytial viral infection. *Immunobiology* 1999;201(1):88-106.
110. Garofalo RP, Patti J, Hintz KA, Hill V, Ogra PL, Welliver RC. Macrophage inflammatory protein-1alpha (not T helper type 2 cytokines) is associated with severe forms of respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Infect Dis* 2001;184(4):393-399.
111. Becker S, Quay J, Soukup J. Cytokine (tumor necrosis factor, IL-6, and IL-8) production by respiratory syncytial virus-infected human alveolar macrophages. *J Immunol* 1991;147(12):4307-4312.
112. Bartz H, Buning-Pfaue F, Turkel O, Schauer U. Respiratory syncytial virus induces prostaglandin E2, IL-10 and IL-11 generation in antigen presenting cells. *Clin Exp Immunol* 2002;129(3):438-445.

113. König B, Streckert HJ, Krusat T, König W. Respiratory syncytial virus G-protein modulates cytokine release from human peripheral blood mononuclear cells. *J Leukoc Biol* 1996;59(3):403-406.
114. Gentile DA, Skoner DP. Effect of respiratory syncytial virus infection during early infancy on the ontogeny of cytokine immune responses. *Allergy Asthma Proc* 2002;23(6):399-405.
115. Tsutsumi H, Matsuda K, Sone S, Takeuchi R, Chiba S. Respiratory syncytial virus-induced cytokine production by neonatal macrophages. *Clin Exp Immunol* 1996;106(3):442-446.
116. Hussell T, Openshaw PJ. IL-12-activated NK cells reduce lung eosinophilia to the attachment protein of respiratory syncytial virus but do not enhance the severity of illness in CD8 T cell-immunodeficient conditions. *J Immunol* 2000;165(12):7109-7115.
117. Sarmiento RE, Tirado R, Gomez B. Characteristics of a respiratory syncytial virus persistently infected macrophage-like culture. *Virus Res* 2002;84(1-2):45-58.
118. Hegele RG, Hayashi S, Bramley AM, Hogg JC. Persistence of respiratory syncytial virus genome and protein after acute bronchiolitis in guinea pigs. *Chest* 1994;105(6):1848-1854.
119. Zlotnik A. Chemokines and chemokine receptors--Keystone Symposium highlights 7-12 January 2003, Breckenridge, CO, USA. *IDrugs* 2003;6(3):195-196.
120. Wewers MD, Dare HA, Winnard AV, Parker JM, Miller DK. IL-1 beta-converting enzyme (ICE) is present and functional in human alveolar macrophages: macrophage IL-1 beta release limitation is ICE independent. *J Immunol* 1997;159(12):5964-5972.
121. Warner SJ, Auger KR, Libby P. Interleukin 1 induces interleukin 1. II. Recombinant human interleukin 1 induces interleukin 1 production by adult human vascular endothelial cells. *J Immunol* 1987;139(6):1911-1917.
122. Jiang S, Levine JD, Fu Y et al. Cytokine production by primary bone marrow megakaryocytes. *Blood* 1994;84(12):4151-4156.
123. Loppnow H, Bil R, Hirt S et al. Platelet-derived interleukin-1 induces cytokine production, but not proliferation of human vascular smooth muscle cells. *Blood* 1998;91(1):134-141.
124. Jokhi PP, King A, Loke YW. Cytokine production and cytokine receptor expression by cells of the human first trimester placental-uterine interface. *Cytokine* 1997;9(2):126-137.

125. Malyak M, Smith MF, Jr., Abel AA, Arend WP. Peripheral blood neutrophil production of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta. *J Clin Immunol* 1994;14(1):20-30.
126. Nockher WA, Scherberich JE. Expression and release of the monocyte lipopolysaccharide receptor antigen CD14 are suppressed by glucocorticoids in vivo and in vitro. *J Immunol* 1997;158(3):1345-1352.
127. van de Winkel JG, Capel PJ. Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunol Today* 1993;14(5):215-221.
128. Kupper TS, Groves RW. The interleukin-1 axis and cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol* 1995;105(1 Suppl):62S-66S.
129. McMahan CJ, Slack JL, Mosley B et al. A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types. *EMBO J* 1991;10(10):2821-2832.
130. Huang J, Gao X, Li S, Cao Z. Recruitment of IRAK to the interleukin 1 receptor complex requires interleukin 1 receptor accessory protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(24):12829-12832.
131. Greenfeder SA, Nunes P, Kwee L, Labow M, Chizzonite RA, Ju G. Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. *J Biol Chem* 1995;270(23):13757-13765.
132. Dower SK, Sims JE, Cerretti DP, Bird TA. The interleukin-1 system: receptors, ligands and signals. *Chem Immunol* 1992;51:33-64.
133. Symons JA, Eastgate JA, Duff GW. Purification and characterization of a novel soluble receptor for interleukin 1. *J Exp Med* 1991;174(5):1251-1254.
134. Hehlgans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 2005;115(1):1-20.
135. Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 1992;10:411-452.
136. Matthews N. Production of an anti-tumour cytotoxin by human monocytes. *Immunology* 1981;44(1):135-142.
137. Espevik T, Brockhaus M, Loetscher H, Nonstad U, Shalaby R. Characterization of binding and biological effects of monoclonal antibodies against a human tumor necrosis factor receptor. *J Exp Med* 1990;171(2):415-426.

138. Thoma B, Grell M, Pfizenmaier K, Scheurich P. Identification of a 60-kD tumor necrosis factor (TNF) receptor as the major signal transducing component in TNF responses. *J Exp Med* 1990;172(4):1019-1023.
139. Barbara JA, Smith WB, Gamble JR et al. Dissociation of TNF-alpha cytotoxic and proinflammatory activities by p55 receptor- and p75 receptor-selective TNF-alpha mutants. *EMBO J* 1994;13(4):843-850.
140. Seckinger P, Isaaz S, Dayer JM. Purification and biologic characterization of a specific tumor necrosis factor alpha inhibitor. *J Biol Chem* 1989;264(20):11966-11973.
141. Engelmann H, Novick D, Wallach D. Two tumor necrosis factor-binding proteins purified from human urine. Evidence for immunological cross-reactivity with cell surface tumor necrosis factor receptors. *J Biol Chem* 1990;265(3):1531-1536.
142. Van Zee KJ, Kohno T, Fischer E, Rock CS, Moldawer LL, Lowry SF. Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(11):4845-4849.
143. Aderka D, Englemann H, Hornik V et al. Increased serum levels of soluble receptors for tumor necrosis factor in cancer patients. *Cancer Res* 1991;51(20):5602-5607.
144. Zlotnik A, Moore KW. Interleukin 10. *Cytokine* 1991;3(5):366-371.
145. Moore KW, Rousset F, Banchereau J. Evolving principles in immunopathology: interleukin 10 and its relationship to Epstein-Barr virus protein BCRF1. *Springer Semin Immunopathol* 1991;13(2):157-166.
146. Howard M, O'Garra A. Biological properties of interleukin 10. *Immunol Today* 1992;13(6):198-200.
147. Chen MR, Hsu TY, Chen JY, Yang CS. Molecular characterization of a cDNA clone encoding the Epstein-Barr virus (EBV) DNase. *J Virol Methods* 1990;29(2):127-141.
148. Rode HJ, Bugert JJ, Handermann M et al. Molecular characterization and determination of the coding capacity of the genome of equine herpesvirus type 2 between the genome coordinates 0.235 and 0.258 (the EcoRI DNA fragment N; 4.2 kbp). *Virus Genes* 1994;9(1):61-75.
149. Kottenko SV, Saccani S, Izotova LS, Mirochnitchenko OV, Pestka S. Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(4):1695-1700.

150. Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 1995;86(4):1243-1254.
151. Sehgal PB, Helfgott DC, Santhanam U et al. Regulation of the acute phase and immune responses in viral disease. Enhanced expression of the beta 2-interferon/hepatocyte-stimulating factor/interleukin 6 gene in virus-infected human fibroblasts. *J Exp Med* 1988;167(6):1951-1956.
152. Mattoli S, Mattoso VL, Soloperto M, Allegra L, Fasoli A. Cellular and biochemical characteristics of bronchoalveolar lavage fluid in symptomatic nonallergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1991;87(4):794-802.
153. Oh JW, Lee HB, Park IK, Kang JO. Interleukin-6, interleukin-8, interleukin-11, and interferon-gamma levels in nasopharyngeal aspirates from wheezing children with respiratory syncytial virus or influenza A virus infection. *Pediatr Allergy Immunol* 2002;13(5):350-356.
154. Morrison PT, Thomas LH, Sharland M, Friedland JS. RSV-infected airway epithelial cells cause biphasic up-regulation of CCR1 expression on human monocytes. *J Leukoc Biol* 2007;81(6):1487-1495.
155. Sherry B, Tekamp-Olson P, Gallegos C et al. Resolution of the two components of macrophage inflammatory protein 1, and cloning and characterization of one of those components, macrophage inflammatory protein 1 beta. *J Exp Med* 1988;168(6):2251-2259.
156. Davatelis G, Tekamp-Olson P, Wolpe SD et al. Cloning and characterization of a cDNA for murine macrophage inflammatory protein (MIP), a novel monokine with inflammatory and chemokinetic properties. *J Exp Med* 1988;167(6):1939-1944.
157. Kasama T, Strieter RM, Lukacs NW, Burdick MD, Kunkel SL. Regulation of neutrophil-derived chemokine expression by IL-10. *J Immunol* 1994;152(7):3559-3569.
158. Smith RE, Strieter RM, Phan SH et al. Production and function of murine macrophage inflammatory protein-1 alpha in bleomycin-induced lung injury. *J Immunol* 1994;153(10):4704-4712.
159. Haeberle HA, Casola A, Gatalica Z et al. IkappaB kinase is a critical regulator of chemokine expression and lung inflammation in respiratory syncytial virus infection. *J Virol* 2004;78(5):2232-2241.
160. Sheeran P, Jafri H, Carubelli C et al. Elevated cytokine concentrations in the nasopharyngeal and tracheal secretions of children with respiratory syncytial virus disease. *Pediatr Infect Dis J* 1999;18(2):115-122.

161. Lee J, Cacalano G, Camerato T, Toy K, Moore MW, Wood WI. Chemokine binding and activities mediated by the mouse IL-8 receptor. *J Immunol* 1995;155(4):2158-2164.
162. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000;12(2):121-127.
163. Cochran BH, Reffel AC, Stiles CD. Molecular cloning of gene sequences regulated by platelet-derived growth factor. *Cell* 1983;33(3):939-947.
164. Oquendo P, Alberta J, Wen DZ, Graycar JL, Derynck R, Stiles CD. The platelet-derived growth factor-inducible KC gene encodes a secretory protein related to platelet alpha-granule proteins. *J Biol Chem* 1989;264(7):4133-4137.
165. Ryseck RP, Macdonald-Bravo H, Mattei MG, Bravo R. Cloning and sequence of a secretory protein induced by growth factors in mouse fibroblasts. *Exp Cell Res* 1989;180(1):266-275.
166. Rijneveld AW, van den Dobbelsteen GP, Florquin S et al. Roles of interleukin-6 and macrophage inflammatory protein-2 in pneumolysin-induced lung inflammation in mice. *J Infect Dis* 2002;185(1):123-126.
167. Davis IC, Lazarowski ER, Hickman-Davis JM et al. Leflunomide prevents alveolar fluid clearance inhibition by respiratory syncytial virus. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173(6):673-682.
168. Jafri HS, Chavez-Bueno S, Mejias A et al. Respiratory syncytial virus induces pneumonia, cytokine response, airway obstruction, and chronic inflammatory infiltrates associated with long-term airway hyperresponsiveness in mice. *J Infect Dis* 2004;189(10):1856-1865.
169. Miller AL, Bowlin TL, Lukacs NW. Respiratory syncytial virus-induced chemokine production: linking viral replication to chemokine production in vitro and in vivo. *J Infect Dis* 2004;189(8):1419-1430.
170. Smyth RL, Openshaw PJ. Bronchiolitis. *Lancet* 2006;368(9532):312-322.
171. Haeberle HA, Casola A, Gatalica Z et al. IkappaB kinase is a critical regulator of chemokine expression and lung inflammation in respiratory syncytial virus infection. *J Virol* 2004;78(5):2232-2241.
172. Becker S, Quay J, Soukup J. Cytokine (tumor necrosis factor, IL-6, and IL-8) production by respiratory syncytial virus-infected human alveolar macrophages. *J Immunol* 1991;147(12):4307-4312.
173. Panuska JR, Hertz MI, Taraf H, Villani A, Cirino NM. Respiratory syncytial virus infection of alveolar macrophages in adult transplant patients. *Am Rev Respir Dis* 1992;145(4 Pt 1):934-939.

174. Midulla F, Villani A, Panuska JR et al. Respiratory syncytial virus lung infection in infants: immunoregulatory role of infected alveolar macrophages. *J Infect Dis* 1993;168(6):1515-1519.
175. Takeuchi R, Tsutsumi H, Osaki M, Sone S, Imai S, Chiba S. Respiratory syncytial virus infection of neonatal monocytes stimulates synthesis of interferon regulatory factor 1 and interleukin-1beta (IL-1beta)-converting enzyme and secretion of IL-1beta. *J Virol* 1998;72(1):837-840.
176. Garofalo RP, Haeberle H. Epithelial regulation of innate immunity to respiratory syncytial virus. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;23(5):581-585.
177. Sakai S, Ochiai H, Kawamata H et al. Contribution of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 alpha on the production of macrophage inflammatory protein-2 in response to respiratory syncytial virus infection in a murine macrophage cell line, RAW264.7. *J Med Virol* 1997;53(2):145-149.
178. Panuska JR, Merolla R, Rebert NA et al. Respiratory syncytial virus induces interleukin-10 by human alveolar macrophages. Suppression of early cytokine production and implications for incomplete immunity. *J Clin Invest* 1995;96(5):2445-2453.
179. Dakhama A, Kaan PM, Hegele RG. Permissiveness of guinea pig alveolar macrophage subpopulations to acute respiratory syncytial virus infection in vitro. *Chest* 1998;114(6):1681-1688.
180. Panuska JR, Cirino NM, Midulla F, Despot JE, McFadden ER, Jr., Huang YT. Productive infection of isolated human alveolar macrophages by respiratory syncytial virus. *J Clin Invest* 1990;86(1):113-119.
181. Becker S, Soukup JM. Exposure to urban air particulates alters the macrophage-mediated inflammatory response to respiratory viral infection. *J Toxicol Environ Health A* 1999;57(7):445-457.
182. Yoon JS, Kim HH, Lee Y, Lee JS. Cytokine induction by respiratory syncytial virus and adenovirus in bronchial epithelial cells. *Pediatr Pulmonol* 2007;42(3):277-282.
183. Bitko V, Velazquez A, Yang L, Yang YC, Barik S. Transcriptional induction of multiple cytokines by human respiratory syncytial virus requires activation of NF-kappa B and is inhibited by sodium salicylate and aspirin. *Virology* 1997;232(2):369-378.
184. Harrison AM, Bonville CA, Rosenberg HF, Domachowske JB. Respiratory syncytial virus-induced chemokine expression in the lower airways: eosinophil recruitment and degranulation. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159(6):1918-1924.

185. Noah TL, Becker S. Chemokines in nasal secretions of normal adults experimentally infected with respiratory syncytial virus. *Clin Immunol* 2000;97(1):43-49.
186. Zhang Y, Luxon BA, Casola A, Garofalo RP, Jamaluddin M, Brasier AR. Expression of respiratory syncytial virus-induced chemokine gene networks in lower airway epithelial cells revealed by cDNA microarrays. *J Virol* 2001;75(19):9044-9058.
187. McNamara PS, Flanagan BF, Baldwin LM, Newland P, Hart CA, Smyth RL. Interleukin 9 production in the lungs of infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Lancet* 2004;363(9414):1031-1037.
188. Oshansky CM, Barber JP, Crabtree J, Tripp RA. Respiratory syncytial virus F and G proteins induce interleukin 1alpha, CC, and CXC chemokine responses by normal human bronchoepithelial cells. *J Infect Dis* 2010;201(8):1201-1207.
189. Smyth RL. Innate immunity in respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Exp Lung Res* 2007;33(10):543-547.
190. Glezen WP, Taber LH, Frank AL, Kasel JA. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. *Am J Dis Child* 1986;140(6):543-546.

Danksagung

Am Ende dieser Arbeit möchte ich mich noch gerne bei einigen Menschen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau PD Dr. Helene Häberle, die mir zu jeder Tag- und Nachtzeit mit Rat und Tat bei der Erstellung dieser Arbeit zur Seite stand und die es in unnachahmlicher Weise geschafft hat, mein Interesse für die Arbeit immer wieder von neuem zu wecken.

Darüber hinaus bedanke ich mich ganz herzlich bei unseren beiden MTAs Michaela Hoch-Gutbrodt und Alice Mager, die mich in das Einmaleins der Laborarbeit eingeführt haben.

Den größten Dank verdient jedoch meine Ehefrau Sandra Reinhardt. Sie hat mir immer den Rücken frei gehalten und hat den größten Anteil daran, dass ich meine Arbeit in dem vorliegenden Umfang fertigstellen konnte. Dafür bin ich ihr sehr dankbar.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern dafür danken, dass Sie mich in meinem bisherigen Leben immer unterstützt und in meinem Tun bestärkt haben und immer ein offenes Ohr für mich hatten und haben.