

Untersuchungen zur Cytopathogenität des Fusionsproteins des respiratorischen Syncytialvirus

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation
von

Diplom-Biologin Julia Eckardt-Michel

geboren am 08.10.1979 in Marburg

Referent: PD. Dr. G. Zimmer
Koreferent: Prof. Dr. H. Y. Naim

Tag der Promotion: 01.02.2008

Für meine Familie

Zusammenfassung

Das humane respiratorische Syncytialvirus ist weltweit der wichtigste virale Erreger von Infektionen des unteren Respirationstraktes bei Kleinkindern und Säuglingen. Die Erkrankung steht im Zusammenhang mit einer Bronchokonstriktion, vermehrter Schleimsekretion, dem Ausstoßen von Epithelzellen aus dem Zellverband und einer Infiltration des Gewebes mit Lymphozyten und führt häufig zur obstruktiven Bronchitis und Pneumonien. Eine vergleichbare Erkrankung wird vom bovinen RSV (BRSV) bei jungen Kälbern ausgelöst.

Das Fusionsprotein (F) ist ein Membranglykoprotein vom Typ I und wird als Vorläufer synthetisiert. Auf dem sekretorischen Signalweg wird das F-Protein im Trans-Golgi-Netzwerk durch die zelluläre Prohormon-Convertase Furin proteolytisch in die Untereinheiten F₁ und F₂ gespalten. Durch diese Spaltung wird ein 27 Aminosäuren großes Peptid freigesetzt, das beim bovinen RSV als Tachykinin (Virokinin) sezerniert wird.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die Wirkung und Sekretion des Virokinins in polarisierten Epithelzellen (MDCK-II-Zellen), die das bovine RSV F-Protein induzierbar exprimierten untersucht. Obwohl das F-Protein an der apikalen Plasmamembran lokalisiert war, wurde das Tachykinin in diesen Zellen ungerichtet sezerniert. Die drei Tachykininrezeptorsubtypen wurden dagegen an der basolateralen Plasmamembran nachgewiesen. Die bidirektionale Sekretion des Virokinins ermöglicht somit eine autokrine bzw. parakrine Wirkung in polarisierten Epithelzellen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die cytopathogenen Eigenschaften des bovinen und humanen RSV F-Proteins mit Hilfe der hergestellten, transgenen Zelllinien untersucht. Die Expression des F-Proteins führte zur Apoptose der Epithelzellen, die daraufhin aus dem Zell-Monolayer ausgestoßen wurden. Die Apoptose wurde vor allem in F-induzierten Synzytien nachgewiesen und konnte durch die Verwendung eines monoklonalen humanisierten Antikörpers (Palivizumab) signifikant reduziert werden. Schließlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das F-Protein den Transkriptionsfaktor p53 aktiviert und dieser eine wichtige Rolle in der F-induzierten Apoptose spielt.

Die proapoptotische Wirkung des Fusionsproteins und die daraus resultierende Cytopathogenität sind wahrscheinlich an der Obstruktion der Atemwege während einer RSV-Infektion beteiligt.

Schlagnworte: Respiratorisches Syncytialvirus, Fusion, Apoptose

Abstract

Human respiratory syncytial virus (HRSV) is the most important viral agent of paediatric respiratory tract disease worldwide. The pathology is associated with bronchoconstriction, excess mucus secretion, shedding of epithelial cells and infiltration with lymphocytes all leading to obstructive bronchitis and inflammation of the airways. A similar disease can be observed in young calves infected with bovine respiratory syncytial virus (BRSV).

The fusion (F) protein of RSV is a type I membrane glycoprotein which is synthesized as a precursor protein (F₀). During transport through the secretory pathway F protein is cleaved by the cellular prohormone convertase furin which results in the generation of the F₁ and F₂ subunit and in the release of a 27 amino acid peptide. In the case of bovine RSV F protein the peptide is secreted as a tachykinin (Virokinin).

In the first part of this work secretion and function of Virokinin was studied in polarized epithelial cells (MDCK-II cells) that expressed the bovine RSV F protein in a regulated manner. Although the F protein was localized at the apical plasma membrane, Virokinin was secreted in an undirectional fashion leading to the activation of the three tachykinin receptor subtypes that were expressed at the basolateral plasma membrane of MDCK cells. This secretion profile enables Virokinin to act in an autocrine and paracrine fashion in epithelial cells.

In the second part of this work the cytopathogenic properties of the bovine and the human RSV F protein were analyzed using the established transgenic cell lines. Expression of either F protein led to apoptosis of the cells which were rapidly extruded from the cell monolayer. The cytopathogenicity was mainly detected in F-induced syncytia and was significantly reduced after application of a monoclonal humanised antibody (Palivizumab) directed against the F protein. Moreover F protein expression led to increased transcriptional activity of the transcription factor p53, which was found to play a major role in fusion-induced apoptosis.

The proapoptotic properties of the RSV F protein is likely to be involved in airway obstruction following RSV infection.

Key words: Respiratory syncytial virus, fusion, apoptosis

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
1.1 Das Respiratorische Syncytialvirus	1
1.2 Taxonomie.....	1
1.3 Verbreitung und Epidemiologie	2
1.4 Klinik.....	3
1.5 Immunität.....	3
1.6 Prophylaxe und Therapie	4
1.7 Pathologie	4
1.8 Aufbau der Viruspartikel	5
1.9 Replikationszyklus des Respiratorischen Syncytial Virus	9
1.10 Das Fusionsprotein	10
1.11 Tachykinine und Tachykininrezeptoren.....	12
2. Zielsetzung.....	14
3. Material.....	15
3.1 Zelllinien	15
3.2 Zellkulturmaterial	15
3.3 Viren.....	16
3.4 Bakterien	16
3.5 Plasmide.....	16
3.6 Synthetische Gene	18
3.7 Enzyme	18
3.8 Restriktionsenzyme	18
3.9 Kits	18
3.10 Primer.....	19
3.11 Peroxidase-Substrate.....	20
3.12 Antikörper	20
3.13 Peptidhormone	21
3.14 Inhibitoren.....	21
3.15 Marker SDS-PAGE.....	21
3.16 Chemikalien.....	21
3.17 Medien, Puffer und Lösungen	23

3.18	Geräte	28
3.19	Zellkulturmaterial	28
4	Methoden	29
4.1	Molekularbiologische Methoden	29
4.1.1	Polymerasenkettenreaktion (PCR)	29
4.1.2	Agarosegelelektrophorese	30
4.1.3	Restriktion von DNA	30
4.1.4	Dephosphorylierung linearer DNA	30
4.1.5	Ligation von DNA	31
4.1.6	Hitzeschocktransformation von E.coli	31
4.1.7	Kolonie PCR	31
4.1.8	Klonierung	33
4.2	Cytologische Methoden	34
4.2.1	Zellkultur von Zellen	34
4.2.2	Transfektion von eukaryotischen Zellen	34
4.2.3	Reportergenversuche	36
4.2.4	Kultivierung von MDCK-Switch-Zelllinien auf Transwell-Filtersystemen	37
4.3	Biochemische Methoden	37
4.3.1	Immunfluoreszenz und Durchflusscytometrie	37
4.3.2	Translokationsassay von Tachykininrezeptoren in polaren Epithelzellen	38
4.3.3	Oberflächenbiotinylierung und Immunpräzipitation der RSV F-Proteine	39
4.3.4	Western-Blot	40
4.3.5	Nachweis von Apoptose	40
4.4	Virologische Techniken	42
4.4.1	Anzucht von HRSV	42
4.4.2	Bestimmung des HRSV-Titers im Immunoplaquetest	42
5	Ergebnisse	44
5.1	Lokalisationsstudien der Tachykininrezeptoren 1-3 (TACR1-3)	44
5.2	Aktivierung der Tachykininrezeptoren durch basolaterale Zugabe der Tachykinine	46
5.3	Expression des bovinen F-Proteins in polarisierten Epithelzellen	47
5.4	Sekretion von Virokinin in polarisierten MDCK-Zellen	48
5.5	Transkriptionelle Aktivierung durch Virokinin	51
5.6	Polare Verteilung des RSV F-Proteins in MDCK-Zellen	53
5.7	Verlust des transepithelialen Widerstandes nach anhaltender F-Protein Expression	56

5.8	Die Expression des F-Proteins führt zu einem Verlust von Epithelzellen.....	58
5.9	Ein Fusionsinhibitor und ein monoklonaler Antikörper hemmen den F-Protein-induzierten Zellverlust	60
5.10	Das F-Protein induziert Caspase-abhängige Apoptose	62
5.11	Beteiligung von RhoA-Kinase, MAP-Kinase p38 und der Caspasen-2, -8, -9 an der F-vermittelten Apoptose	68
5.12	Die Expression des F-Proteins führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53	69
5.13	Sekundäre Nekrose nach anhaltender RSV F-Proteinexpression	72
5.14	Die F-Protein-vermittelte Apoptose ist unabhängig von dem Fas-Rezeptor und dem FADD-Adapterprotein.....	73
5.15	Synagis hemmt die Apoptose nach Infektion mit RSV	74
5.16	Steigerung der transkriptionellen Aktivität des Transkriptionsfaktors p53 nach Infektion von A549-Zellen.....	78
6.	Diskussion	82
6.1	Verteilung von Virokinin und seiner Rezeptoren in polarisierten Epithelzellen	82
6.2	Virokinin führt zur transkriptionellen Aktivität.....	84
6.3	Das F-Protein induziert Apoptose	86
6.4	Regulation der Apoptose.....	89
6.5	Bedeutung für die Pathologie	90
6.6	Therapie	91
	Literaturverzeichnis	93
	Lebenslauf	111
	Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge	112
	Danksagung.....	113

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pathologische Veränderungen der Atemwege aufgrund einer HRSV-Infektion.....	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines RSV-Partikels.....	6
Abbildung 3: Schematische Darstellung des BRSV F-Vorläuferproteins und dessen darauf folgende proteolytische Spaltung.....	11
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Tachykininrezeptors 1.....	13
Abbildung 5: Übersicht der verwendeten Konstrukte.....	33
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Membranfiltriervorrichtung für die Kultivierung von MDCK-Zellen.....	37
Abbildung 7: Verteilung der Tachykininrezeptoren in polaren MDCK-II-Zellen.....	45
Abbildung 8: Verteilung der Tachykininrezeptorsubtypen zwischen der apikalen und basolateralen Plasmamembran polarisierter MDCK-Zellen.....	45
Abbildung 9: Basolaterale Aktivierung der Tachykininrezeptoren.....	47
Abbildung 10: Induzierbare Expression des bovinen RSV F-Proteins in polarisierten MDCK-Zellen.....	48
Abbildung 11: Ungerichtete Sekretion des Virokinins in MDCK-Zellen.....	49
Abbildung 12: Nachweis von aktivem Virokinin im apikalen und basolateralen Medium polarisierter MDCK-(bF-GFP)-Zellen.....	50
Abbildung 13: CRE-Reportergenaktivität nach Aktivierung des TACR-1 durch synthetisches Virokinin.....	51
Abbildung 14: Transkriptionelle Aktivierung des „cAMP-response element“ durch konditionierten Überstand von MDCK-(bF-GFP)-Zellen.....	52
Abbildung 15: Verlust der Polarität nach anhaltender Expression des F-Proteins in polarisierten MDCK-Zellen.....	54
Abbildung 16: Oberflächenbiotinylierung und anschließende Immunpräzipitation der RSV F-Proteine.....	55
Abbildung 17: Veränderung des transepithelialen elektrischen Widerstandes nach Expression des F-Proteins.....	57
Abbildung 18: Abnahme von MDCK-(hF-GFP)-Zellen nach anhaltender Proteinexpression.....	58
Abbildung 19: Verlust adhärenter GFP-positiver Zellen nach Induktion der F-GFP Expression.....	59
Abbildung 20: Nachweis flotierender Zellen im Überstand.....	60
Abbildung 21: Inhibition der F-vermittelten Fusion vermindert Zellverlust.....	61

Abbildung 22: Inhibition der Fusionsaktivität durch den monoklonalen Antikörper reduziert den Zellverlust.....	62
Abbildung 23: Der Pan-Caspase-Inhibitor (z-VAD-fmk) reduziert den F-Protein-induzierten Zellverlust.....	63
Abbildung 24: Steigerung der Caspase-3/7-Aktivität nach Expression des bovinen und humanen RSV F-Proteins.....	64
Abbildung 25: DNA-Fragmentierung nach 48stündiger Expression des F-Proteins.....	65
Abbildung 26: DNA-Fragmentierung ausgestoßener MDCK-(hF-GFP)-Zellen.....	66
Abbildung 27: „ <i>Membrane blebbing</i> “ nach anhaltender F-Expression.....	67
Abbildung 28: Nachweis des aktivierten, proapoptotischen Proteins Bax.....	67
Abbildung 29: Inhibition der F-induzierten Caspase-3/7-Aktivität.....	68
Abbildung 30: Transkriptionelle Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53.....	69
Abbildung 31: Nachweis von phosphoryliertem p53 (Serin 15) in MDCK-(hF-GFP)-Zellen...70	
Abbildung 32: Hemmung der transkriptionellen Aktivität des p53 senkt die F-Protein-vermittelte Cytopathogenität.....	71
Abbildung 33: Auftreten sekundärer Nekrose nach anhaltender F-Expression.....	72
Abbildung 34: Stabile Expression der DN-Mutanten des FAS-R und des FADD in MDCK-(hF-GFP)-Zellen.....	74
Abbildung 35: Caspase-Inhibitoren hemmen den Zellverlust nach RSV-Infektion.....	75
Abbildung 36: DNA-Fragmentierung 40 Stunden nach HRSV-Infektion.....	76
Abbildung 37: Die Apoptose hat keinen Einfluss auf die RSV-Replikation.....	76
Abbildung 38: Synagis hemmt den Verlust infizierter Zellen.....	77
Abbildung 39: Aktivierung der Caspase-3/7-Aktivität nach HRSV-Infektion.....	78
Abbildung 40: Transkriptionelle Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53 nach Infektion....79	
Abbildung 41: Verminderte Caspase-3/7-Aktivität nach Infektion transgener A549-(p53-DN) und A549-(sh-p53)-Zellen.....	80
Abbildung 42: Infektion der HEp-2-Zellen weist nur geringe Caspase-Aktivität auf.....	81
Abbildung 43: Schematische Darstellung einer möglichen Aktivierung der Apoptose-Mediatoren.....	89
Abbildung 44: Schematische Darstellung der möglichen F-Protein-vermittelten Pathogenität.....	91

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Taxonomie der Familie der <i>Paramyxoviridae</i>	2
Tabelle 2:	RSV-Proteine und Ihre Funktion.....	8
Tabelle 3:	Verwendete Zelllinien.....	34
Tabelle 4:	Hergestellte transgene Zelllinien.....	35
Tabelle 5:	Eigenschaften der unterschiedlichen G α -Untereinheiten.....	85

Abkürzungsverzeichnis

AP:	alkalische Phosphatase
APS:	Ammoniumpersulfat
AS:	Aminosäure
ATP:	Adenosintriphosphat
b:	bovin
BRSV:	bovines respiratorisches Syncytialvirus
BSA:	Bovines Serumalbumin
DABCO:	1,4-Diazobicyclo[2.2.2]octane
DNA:	Desoxyribonucleinsäure
dNTP:	Desoxynukleotidtriphosphat
DMEM:	Dulbecco´s modified Eagle medium
DMSO :	Dimethylsulfoxid
DTT:	Dithiothreitol
E. coli:	<i>Escherichia coli</i>
EDTA:	Ethylen-diamin-tetra-acetat
ELISA:	<i>Enzyme-linked-immunosorbent assay</i>
ER:	Endoplasmatisches Retikulum
FKS:	Fötales Kälberserum
GFP:	grün fluoreszierendes Protein
GRK:	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
h:	human
HRP:	<i>horseradish peroxidase</i> , Peroxidase aus Meerrettich
HRSV :	humanes respiratorisches Syncytialvirus
H ₂ O:	Reinstwasser
kDa:	kilo Dalton
M:	Molar
mA:	milli Ampère
mAb:	monoklonaler Antikörper
MDCKII:	Madin Darby Canine Kidney Zellen
min:	Minuten
MOI:	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA:	<i>messenger RNA</i>
NKA :	Neurokinin A
NKB :	Neurokinin B

PAGE:	Polyacrylamid-Elektrophorese
PBS:	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PBSM:	PBS ohne Calcium- und Magnesiumsalze
PCR:	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase Kettenreaktion
PFU:	<i>plaque forming units</i> , Plaque-bildende Einheiten
r:	Ratte
RNA:	Ribonukleinsäure
SDS:	Natriumdodecylsulfat
SEAP:	<i>Secreted alkaline phosphatase</i> ; sezernierte alkalische Phosphatase
SeV:	Sendai Virus
SP:	Substanz P
Std:	Stunden
syn.:	synthetisch
TACR:	Tachykininrezeptor
TAE:	Tris-Acetat-EDTA
TBE:	Tris-Borsäure-EDTA
TEMED:	N,N,N',N',-Tetramethyl-Ethylendiamin
TER:	transepithelialer elektrischer Widerstand
Tris:	Trishydroxymethylaminomethan
Vk:	Virokinin

1. Einleitung

1.1 Das Respiratorische Syncytialvirus

Das Respiratorische Syncytialvirus konnte 1956 erstmals aus den oberen Atemwegen eines erkrankten Labor-Schimpansen isoliert werden und wurde zunächst als *Chimpanzee Coryza Agent* (Blount *et al.*, 1956) bezeichnet. Wenig später konnte das Virus bei Kindern nachgewiesen werden, die an einer schweren respiratorischen Erkrankung litten (Chanock & Finberg, 1957). *In vitro* Studien zeigten, dass das Virus vielkernige Riesenzellen, sogenannte Synzytien, induzierte. Diese gaben dem Virus den heutigen Namen Respiratorisches Syncytialvirus (RSV). Im Jahr 1967 wurde aus jungen Kälbern das bovine RSV (BRSV) isoliert (Paccaud & Jacquier, 1970). Bovines und humanes RSV weisen eine hohe Übereinstimmung in ihrer Genomsequenz auf und zeigen zudem einen ähnlichen Krankheitsverlauf. In Infektionsstudien konnten zudem Kälber mit einem aus dem Menschen isolierten RSV infiziert werden (Jacobs & Edington, 1975). Die Humanpathogenität von BRSV ist bis heute nicht untersucht (Kimman & Westenbrink, 1990).

1.2 Taxonomie

Das RSV gehört zum Genus *Pneumovirus*, das gemeinsam mit dem Genus *Metapneumovirus* die Unterfamilie *Pneumovirinae* innerhalb der Familie der *Paramyxoviridae* bildet (siehe Tabelle 1). Der Unterfamilie der *Pneumovirinae* steht die Unterfamilie der *Paramyxovirinae* gegenüber, die die fünf Genera *Respirovirus*, *Rubulavirus*, *Morbillivirus*, *Avulavirus* und *Henipavirus* enthält (Collins *et al.*, 2001). Die Vertreter der Genera *Paramyxovirus* und *Avulavirus* besitzen Neuraminidaseaktivität und können Erythrozyten agglutinieren. *Morbilliviren* besitzen hingegen keine Neuraminidaseaktivität, weisen jedoch hämagglutinierende Eigenschaften auf. Die Viren der Pneumoviren besitzen keine dieser Eigenschaften, weisen aber eine ähnliche Genomanordnung, einen ähnlichen Aufbau der Viruspartikel und einen ähnlichen Replikationszyklus auf. Die Familie der *Paramyxoviridae* bildet gemeinsam mit den Familien *Rhabdoviridae*, *Bornaviridae* und *Filoviridae* die Ordnung *Mononegavirales* (Pringle, 1999). Viren dieser Ordnung zeichnen sich durch eine nichtsegmentierte, einzelsträngige-RNA mit negativer Polarität aus.

Unterfamilie	Genus	Erreger
<i>Paramyxovirinae</i>	<i>Respirovirus</i>	Humanes Parainfluenzavirus Typ 1 und Typ 3
	<i>Rubulavirus</i>	Mumpsvirus
		Humanes Parainfluenzavirus Typ 2 und Typ 4, Canines Parainfluenzavirus Typ 2
	<i>Avulavirus</i>	Newcastle Disease-Virus
		Vogelparamyxoviren der Typen 2-9
	<i>Morbillivirus</i>	Masernvirus, Hundestaubevirus
<i>Henipavirus</i>	Hendravirus, Nipahvirus	
<i>Pneumovirinae</i>	<i>Pneumovirus</i>	Humanes/bovines RSV, murines Pneumovirus
	<i>Metapneumovirus</i>	Aviäres Pneumovirus, Humanes Metapneumovirus

Tabelle 1: Taxonomie der Familie der *Paramyxoviridae*

1.3 Verbreitung und Epidemiologie

Das humane RSV ist weltweit der bedeutendste virale Erreger respiratorischer Erkrankungen bei Säuglingen und Kleinkindern. Besonders gefährdet sind Säuglinge im Alter von sechs Wochen bis mehreren Monaten. Offiziellen Berichten zufolge werden in den USA jährlich 85.000–144.000 Kinder im Krankenhaus wegen einer RSV-Infektion behandelt (Heilman, 1990; Shay *et al.*, 1999). Schwere, zum Teil lebensbedrohliche Verläufe kann eine -Infektion bei Kindern annehmen, die unter bronchopulmonaler Dysplasie und Herzfehlern leiden, oder die zu früh geboren wurden. Von einer hohen Mortalität sind zudem ältere und immunsupprimierte Personen, wie Empfänger von Knochenmarktransplantaten und Leukämie-Patienten betroffen (Dowell *et al.*, 1996; Falsey *et al.*, 1995a; Falsey *et al.*, 1995b; Harrington *et al.*, 1992; Whimbey *et al.*, 1995; Whimbey *et al.*, 1996). Die hochansteckende Infektion mit dem Erreger erfolgt aerogen, wobei Tröpfcheninfektion und tröpfcheninfizierte Gegenstände zur Übertragung führen können. Der Speichel kann hierbei bis zu 10^6 infektiöse Viruspartikel enthalten (Modrow & Falke, 1998). Im Mausmodell konnte zudem eine respiratorische Infektion nach Übertragung des Virus in das Auge nachgewiesen werden (Bitko *et al.*, 2007). Die Infektion findet bei Kindern vor allem in den Wintermonaten (Oktober – März) statt (Alonso *et al.*, 2007). Im Fall von BRSV werden Jungtiere im Alter von vier Wochen bis sechs Monaten infiziert. Das Virus kann hierbei noch drei Wochen nach der Infektion der Tiere ausgeschieden werden.

Mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern (mAb), welche gegen das G-Protein gerichtet sind, können die beiden Serotypen A und B voneinander unterschieden werden (Collins *et al.*, 1990; Valarcher & Taylor, 2007).

1.4 Klinik

Die RSV-bedingten Krankheitsverläufe sind altersabhängig und variabel. Hierbei können milde bis lebensgefährliche oder gar tödliche Verläufe auftreten. Nach einer Inkubationszeit von etwa vier bis fünf Tagen treten nach Infektion der oberen Atemwege die ersten Symptome in Form von Entzündungen der Rachen- (Pharyngitis), der Luftröhrenschleimhäute (Tracheitis) und der Bronchien auf. Bei einer schweren Verlaufsform entwickelt sich meist eine Bronchitis mit Cyanose und Lungenentzündung. Einer RSV-Infektion folgen häufig Infektionen bakterieller Erreger, welche außerdem zu Mittelohrentzündungen führen können. Liegt das Alter des infizierten Kindes unter sechs Monaten, treten schwere Erkrankungsformen häufiger auf. Zudem wird vermutet, dass RSV-Infektionen in Verbindung mit einer verstärkten Hyperreaktion der Atemwege und Asthma im Kindes- und Jugendlichenalter stehen (Elhassan *et al.*, 2006; Martinez, 2003; Schwarze *et al.*, 1997; Schwarze *et al.*, 1999; Sigurs *et al.*, 2000; Sigurs *et al.*, 2005; Stein *et al.*, 1999). Ein ähnliches Krankheitsbild kann bei infizierten Kälbern beobachtet werden, die sechs Wochen bis mehrere Monate alt sind. Die Letalität kann bis zu 30% betragen. Bei wiederholt infizierten Tieren tritt eher eine subklinische Verlaufsform auf (Inaba *et al.*, 1970). Verschiedene Studien weisen daraufhin, dass sowohl HRSV als auch BRSV im infizierten Individuum persistieren kann (Schwarze *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 1980; Valarcher & Taylor, 2007).

1.5 Immunität

Im Gegensatz zum Masernvirus führt die primäre Infektion mit RSV zu keiner anhaltenden protektiven Immunität. Eine Reinfektion mit dem gleichen Serotyp ist sogar innerhalb weniger Monate möglich (Glezen *et al.*, 1986; Henderson *et al.*, 1979). Sehr junge Säuglinge weisen bereits maternale Serumantikörper auf (Englund, 1994; Lamprecht *et al.*, 1976; Ogilvie *et al.*, 1981). Diese führen aber nicht zu einer Protektion vor einer erfolgreichen HRSV-Infektion. Während einer Infektion werden neutralisierende Antikörper sowohl gegen das G-Protein als auch gegen das F-Protein gebildet. Im Gegensatz zu dem Fusionsprotein, welches hochkonserviert ist, unterliegt das G-Protein Antigenvariationen und ist hoch variabel (Galiano *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2002; Kamasaki *et al.*, 2001). Einige Studien weisen daraufhin, dass das Virus zudem Mechanismen entwickelt hat, die zu einer Immunsuppression führen. So wurde berichtet, dass das RSV F-Protein auf noch ungeklärte Weise eine Inhibierung der T-Zell-Aktivierung induziert (Schlender *et al.*, 2002). Studien, in welchen mononukleäre Zellen mit RSV kokultiviert wurden, wiesen eine Inhibition der T-Zell-Aktivierung durch Monozyten/Makrophagen nach (Braciale, 2005). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass RSV die Expression der Effektor-Aktivität von CD8⁺ T-Zellen und die Entwicklung eines pulmonalen CD8⁺ T-Zellgedächtnis inhibiert (Chang & Braciale, 2002). In

Infektionsstudien mit dendritischen Zellen wurde eine Beeinträchtigung der CD4⁺ T-Zellaktivität, in Verbindung mit verringerter Zell-Proliferation und Cytokinproduktion, nachgewiesen (de Graaff *et al.*, 2005).

1.6 Prophylaxe und Therapie

Ein Impfstoff gegen HRSV ist bis heute nicht verfügbar. Ein 1966 zugelassener Totimpfstoff, dessen Viren mit Formalin inaktiviert wurden, schützte nicht vor nachfolgenden HRSV-Infektionen und führte zudem zu einer Verstärkung der Krankheitssymptome. Dies hatte sogar einige Todesfälle unter den immunisierten Kindern zur Folge (Kapikian *et al.*, 1969). Die Verwendung eines Totimpfstoffes im Rind führte ebenfalls zu einer verstärkten Pathogenese (Schreiber *et al.*, 2000). Des Weiteren wurden Protein-Impfstoffe auf Basis des F-Proteins oder G-Proteins eingesetzt, die jedoch wie auch die Impfstoffentwicklung eines lebend-attenuierten Impfstoffes (McKay *et al.*, 1988) und rekombinanten RSV-Lebendimpfstoffen (Martinez-Sobrido *et al.*, 2006; Takimoto *et al.*, 2005) zu keiner Protektion vor einer RSV-Infektion führten. Diese Impfstoffe waren entweder zu attenuiert oder noch zu pathogen. Keiner dieser Impfstoffe wurde bis heute zugelassen.

Ein 1997 hergestellter monoklonaler, humanisierter Antikörper Synagis (Palivizumab) wird Kindern oder Personen der beschriebenen Risikogruppen in den Wintermonaten präventiv jeden Monat verabreicht, um eine Hospitalisierung zu verhindern (Cardenas *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 1997). Eine Therapie einer akuten, HRSV-induzierten Erkrankung existiert bis heute nicht. Den Patienten wird in der intensivmedizinischen Therapie eine erhöhte Sauerstoffzufuhr verabreicht, um einer Cyanose entgegenzuwirken.

1.7 Pathologie

Das Virus gelangt zunächst in die oberen Atemwege, in welchen es sich in den Zellen des Schleimhautepithels vermehrt. Von dort breitet es sich in die unteren Luftwege aus. Wie in Infektionsstudien mit BRSV gezeigt werden konnte, repliziert das Virus vorwiegend in dem respiratorischen, bewimperten Epithel, aber auch in Typ II Pneumozyten (Verhoeff *et al.*, 1984; Viuff *et al.*, 1996). Eine Infektion von kultivierten humanen Epithelzellen zeigte, dass diese von apikal erfolgt und spezifisch für bewimperte Zellen ist (Zhang *et al.*, 2002). Bei einer schweren RSV-Infektion treten gravierende pathologische Veränderungen der infizierten Bronchi und Alveoli auf.

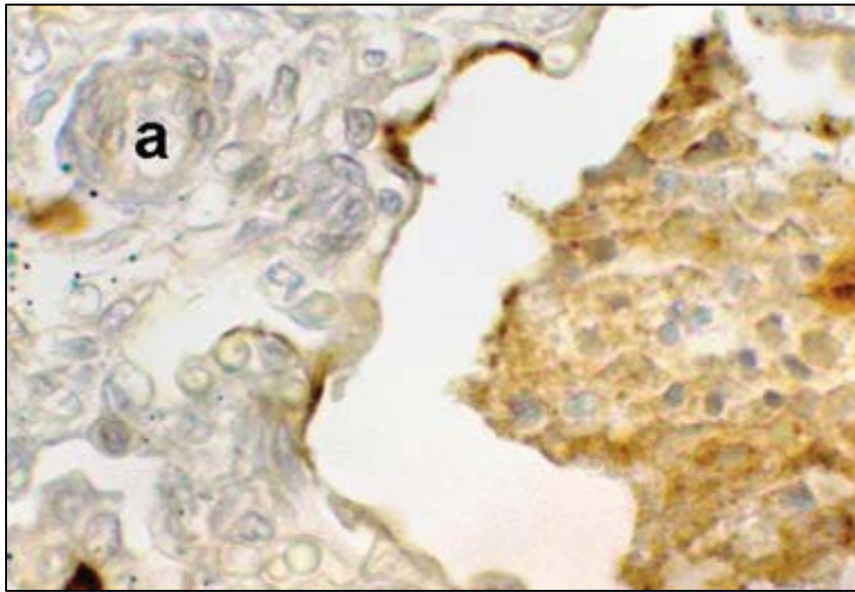


Abbildung 1: Pathologische Veränderungen der Atemwege aufgrund einer HRSV-Infektion. Histologie der kleinen Atemwege nach HRSV-Infektion. Intraluminale Ablagerung bestehend aus abgelösten Epithelzellen und inflammatorischen Zellen, die eine RSV-positive Färbung aufweisen. Vergrößerung: 260-fach;(a: Arteriole). (Johnson *et al.*, 2007).

Histologische Untersuchungen deuten auf eine ausgeprägte Zerstörung der Zellen hin, die mit einer peribronchialen Infiltration durch Makrophagen, eosinophilen-Granulozyten und anderen Lymphozyten einhergeht. Die Obstruktion der Atemwege wird vor allem durch vermehrte Schleimbildung und Ödembildung bewirkt (Aherne *et al.*, 1970; Bitko & Barik, 2001; Johnson *et al.*, 2007). Es ist bis heute nicht geklärt, ob die Pathologie der RSV-Infektion auf die direkte, zellschädigende Wirkung des Virus basiert (Johnson *et al.*, 2007; Kotelkin *et al.*, 2003; O'Donnell D *et al.*, 1999; Roe *et al.*, 2004) oder ob immunpathologische Prozesse dafür verantwortlich sind (Domachowske & Rosenberg, 1999; Sheeran *et al.*, 1999; Tripp *et al.*, 2002).

1.8 Aufbau der Viruspartikel

RSV-Partikel können eine sphärische Gestalt, mit einem Durchmesser von 150 bis 300 nm besitzen (Abbildung 2). Zudem treten filamentöse Virionen auf, die einen Durchmesser von 60 bis 100 nm und eine Länge von bis zu 10 µm haben (Collins *et al.*, 2001). Die Virionen weisen ein helikales Nukleokapsid mit einem Durchmesser von 12-15 nm auf. Dieses Nukleokapsid ist von einer Hüllmembran umgeben, die von der Plasmamembran der infizierten Zellen abstammt. In die Hüllmembran des Viruspartikels sind drei Glykoproteine eingelagert, die zu einer Stachel-ähnlichen Struktur der Oberfläche führen (Collins *et al.*, 1999).

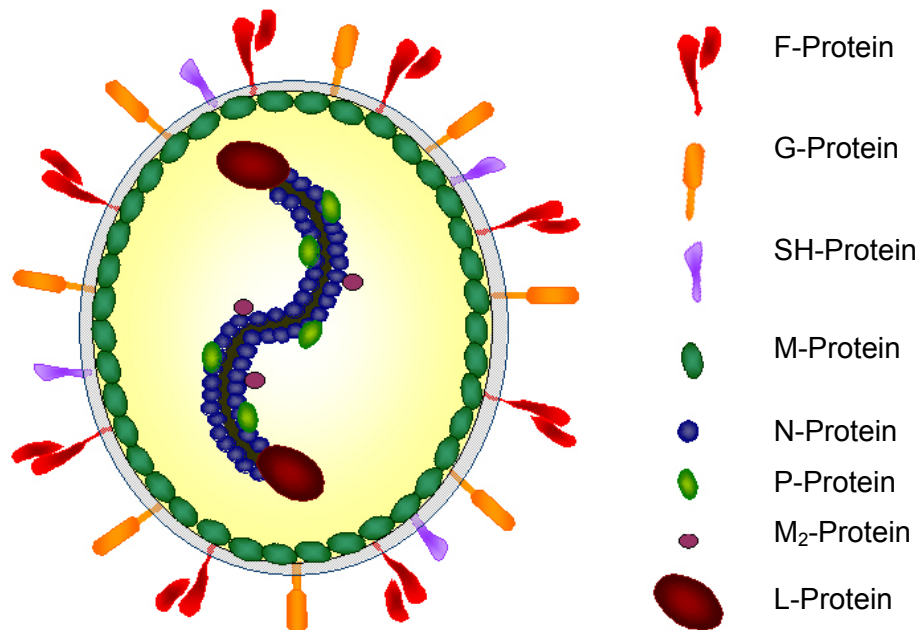


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines RSV-Partikels

Das Genom liegt als einzelsträngige, nicht segmentierte RNA in negativer Polarität vor. Es hat eine Länge von 15.222 Basen und kodiert für 10 Gene und 11 offene Leserahmen, die die Information für die viralen Struktur- und Nichtstrukturproteine enthalten. Für die Proteine M2-1 und M2-2 liegen zwei offene Leserahmen innerhalb des M2-Gens vor (Collins *et al.*, 1990). Am 3' Ende des Genoms befindet sich eine 44 Basen lange nicht kodierende Vorläufer-Sequenz. Das 5' Ende des Genoms wird von einer 155 Basen langen *Trailer*sequenz flankiert. Zwischen den einzelnen Genen befinden sich intergenische Abschnitte. Die einzelnen Gene werden von konservierten Start- und Stoppssequenzen flankiert (Collins *et al.*, 2001).

Name	Länge [AS]	Größe theoretisch	prozessiert	Proteinfunktion
Nicht-Strukturprotein 1 (NS1)	139	15,6		Antagonist der Typ-I-Interferonsynthese und des Interferon-Signalweges (Elliott <i>et al.</i> , 2007; Schlender <i>et al.</i> , 2000; Spann <i>et al.</i> , 2004); Regulationsfaktor der Transkription und Replikation (Atreya <i>et al.</i> , 1998); unterdrückt verfrühte Apoptose durch NFκB-Aktivierung (Bitko <i>et al.</i> , 2007)
Nicht-Strukturprotein 2 (NS2)	124	14,7		Antagonist der Typ-I-Interferonsynthese und des Interferon-Signalweges (Ramaswamy <i>et al.</i> , 2006; Schlender <i>et al.</i> , 2000; Spann <i>et al.</i> , 2004); unterdrückt verfrühte Apoptose durch NFκB-Aktivierung (Bitko <i>et al.</i> , 2007)
Nukleoprotein (N)	391	43,5		Hauptbestandteil des Nukleokapsids; Bestandteil des Polymerasekomplexes
Phosphoprotein (P)	241	27,1		Komponente des Polymerasekomplexes
L-Protein	2165	250,2		virale RNA-abhängige RNA-Polymerase
Matrixprotein (M)	256	28,7		beteiligt an der Virusmorphogenese und dem Knospungsprozess
M2-1Protein	194	22,2		Transkriptionselongationsfaktor (Fearn & Collins, 1999); nicht essentiell (Collins <i>et al.</i> , 1999)
M2-2Protein				Regulation des Replikations- und Transkriptionsmodus (Bermingham & Collins, 1999)

Name	Länge [AS]	Größe theoretisch	prozessiert	Proteinfunktion
Kleines hydrophobes Protein (SH)	64	7,5	15;21-30	inhibiert TNF α -Signalweg (Fuentes <i>et al.</i> , 2007), nicht essentiell (Bukreyev <i>et al.</i> , 1997)
Glykosyliertes Oberflächenprotein (G)	298	32,6	84-90	mucinähnliches O-glykosyliertes Membranprotein vom Typ II, Bindung an Glykosaminoglykane (Teng <i>et al.</i> , 2001; Teng & Collins, 2002), Chemokin-Mimikrie (Tripp <i>et al.</i> , 2001; Tripp <i>et al.</i> , 2003); nicht essentiell <i>in vitro</i> (Karron <i>et al.</i> , 1997a)
Fusionsprotein (F ₀)	574	63,453	70	Vorläufer des Fusions-Glykoprotein; wird in der Zelle in die Untereinheiten F ₁ und F ₂ gespalten Membranfusion (Heminway <i>et al.</i> , 1994), rezeptorbindende Aktivität (Karger <i>et al.</i> , 2001), Zelltropismus (Schlender <i>et al.</i> , 2003).
F ₁ -Untereinheit	438	48,2	54	
F ₂ -Untereinheit	109	12,1	20	

Tabelle 2 : RSV-Proteine und ihre Funktion.

1.9 Replikationszyklus des Respiratorischen Syncytial Virus

Der Replikationszyklus des RSV beginnt mit der Bindung der Virionen an die Plasmamembran der Wirtszelle, hierbei sind das G-Protein und das F-Protein beteiligt. Das G-Protein, ein als Trimer vorliegendes Membranprotein vom Typ II, interagiert mit Glykosaminoglykanen auf der Wirtszelloberfläche (Teng & Collins, 1999; Teng *et al.*, 2001; Teng & Collins, 2002). Zudem konnte eine Bindung des G-Proteins an Heparin gezeigt werden (Bourgeois *et al.*, 1998; Krusat & Streckert, 1997). Das G-Protein verfügt weiterhin über ein CX3C-Chemokinmotiv, welches an den CX3C Rezeptor 1 bindet. Diese Interaktion scheint für die Infektion bestimmter Zellen eine Rolle zu spielen (Tripp *et al.*, 2001). Das G-Protein besitzt außerdem Ähnlichkeit mit dem TNF-Rezeptor (Langedijk *et al.*, 1997). Obwohl die Deletion des G-Proteins *in vivo* zu einer Attenuierung des Virus führt (Techaarpornkul *et al.*, 2001), ist das G-Protein in Infektionsstudien in der Zellkultur nicht essentiell (Karron *et al.*, 1997a; Techaarpornkul *et al.*, 2001). Die Bindung des Virus an die Wirtsplasmamembran kann hierbei alleine über das Fusions-Protein erfolgen. Studien mit SeV-Pseudotypen die das RSV F-Protein enthielten, konnten zeigen, dass das F-Protein in Abwesenheit der viralen Glykoproteine, eine Infektion vermitteln kann (Zimmer *et al.*, 2005). Verschiedene Studien wiesen eine Bindung des F-Proteins an zelluläres Heparansulfat nach (Feldman *et al.*, 2000; Karger *et al.*, 2001). Die F₂-Untereinheit des F-Proteins vermittelt zudem einen Art-spezifischen Eintritt in hämatopoetische Zellen (Schlender *et al.*, 2003). Die nach Bindung des Virus an die Plasmamembran folgende pH-unabhängige Fusion zwischen viraler und zellulärer Membran wird ebenfalls durch das F-Protein vermittelt und führt zur Aufnahme des Nukleokapsids durch die Zellen. Als Folge der Fusion wird das Nukleokapsid in das Cytoplasma freigesetzt, wo Transkription und Replikation stattfinden. Die RNA liegt in der Zelle nicht nackt vor, sondern bildet mit den N-, P- und L-Proteinen einen Ribonukleoproteinkomplex. Das N-Protein ist Hauptbestandteil des Nukleokapsids und geht eine enge Bindung mit der RNA ein. Dabei schützt es diese vor Abbau durch RNAsen (Mallipeddi *et al.*, 1990). Die RNA-Polymerase bindet an die 3'-terminale Leader-Region der genomischen RNA, die als Promoter fungiert. Die Synthese der subgenomischen mRNA-Moleküle erfolgt über einen Start-Stop-Mechanismus, der durch *cis*-aktive intergenische Sequenzen gesteuert wird. Während dieser Transkription tritt ein Expressionsgradient auf, in welchem Gene proximal zum Promotor häufiger transkribiert werden als Gene, die im 5'-terminalen Bereich des Genoms liegen (Collins & Wertz, 1983; Kreml *et al.*, 2002; Kuo *et al.*, 1996). Das M2-1 Protein stellt hierbei einen Transkriptionselongationsfaktor dar und führt zu einer sequentiellen Transkription des gesamten Genoms (Fearn & Collins, 1999). Für die „Capping“- und Methylierungsreaktionen am 5'-Ende der mRNA (Cowton & Fearn, 2005) und die Polyadenylierung der 3'-Enden, ist der Komplex aus L- und P-Protein verantwortlich.

Auf noch ungeklärte Weise wechselt die Polymerase von einem Transkriptionsmodus in den Replikationsmodus. Das M2-2-Protein übt eine negative Regulation auf die Replikation und Transkription aus (Birmingham & Collins, 1999). Sowohl die Ribonukleoproteinkomplexe als auch die Glykoproteine werden an die Plasmamembran der Wirtszelle transportiert. Wobei die Glykoproteine am rauen Endoplasmatischen Retikulum translatiert werden und über den sekretorischen Exportweg an die Plasmamembran gelangen. Das M-Protein gelangt auf noch unbekannte Weise ebenfalls an die Plasmamembran wo es wie die Proteine F und L in Membrandomänen, den „*Lipid rafts*“ nachgewiesen werden kann (Fleming *et al.*, 2006; Henderson *et al.*, 2002; McDonald *et al.*, 2004). Weitere virale Komponenten stellen die Nichtstrukturproteine NS1, NS2 und das kleine hydrophobe Glykoprotein (SH) dar. Nachdem die viralen Komponenten die Plasmamembran erreicht haben erfolgt die Bildung und das Abschnüren der neuen Viruspartikel.

1.10 Das Fusionsprotein

Das als Trimer vorliegende, glykosylierte Membranprotein vom Typ I besitzt an seinem aminoterminalen Ende ein Signalpeptid. Diese Sequenz ist für den Eintritt in den sekretorischen Exportweg verantwortlich und wird im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) abgespalten. Auf seinem Weg zur Plasmamembran wird das Protein an dem Cystein-Rest (AS 550) in der C-terminalen Ankersequenz der F₁-Untereinheit acyliert (Arumugham *et al.*, 1989). Die N-Glykosylierung findet sowohl im ER als auch im Golgi-Apparat statt. Das humane RSV F-Protein besitzt sechs (Zimmer *et al.*, 2001b), das bovine RSV F-Protein nur vier potentielle N-Glykosylierungsstellen (Pastey & Samal, 1997). Im Trans-Golgi-Netzwerk wird das, als Vorläufer synthetisierte F-Protein (F₀) von der zellulären Prohormon-Convertase Furin in die zwei Untereinheiten F₁ (50 kDa) und F₂ (19kDa) gespalten, welche über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden bleiben (Gruber & Levine, 1985). Die Spaltung des Vorläuferproteins führt zur Exposition des hydrophoben Fusionspeptides am N-Terminus der F₁-Untereinheit und verleiht dem Protein seine fusogene Eigenschaften (Klenk & Garten, 1994; Zimmer *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu vielen anderen Fusionsproteinen der Paramyxoviridae erfolgt die Spaltung des RSV-Fusionsproteins an zwei multibasischen Spaltstellen KKRKRR¹³⁶ und RARR¹⁰⁹, was zusätzlich zur Freisetzung eines 27 Aminosäuren langen Peptids führt (Gonzalez-Reyes *et al.*, 2001; Zimmer *et al.*, 2001a). Dieses Peptid, das sogenannte pep27, unterliegt im Falle des bovinen RSV F-Proteins weiteren Modifikationen. Die basischen Aminosäuren KKRKRR am C-Terminus des Peptids werden vermutlich durch eine Carboxypeptidase getrimmt (Garten & Klenk, 1983; Zimmer *et al.*, 2003). Der Glycinrest an der Position 130 stellt das Substrat für die C-terminale Amidierung des Peptids durch die Petidylglycin- α -amidierende-Monooxygenase dar (Prigge *et al.*, 2000).

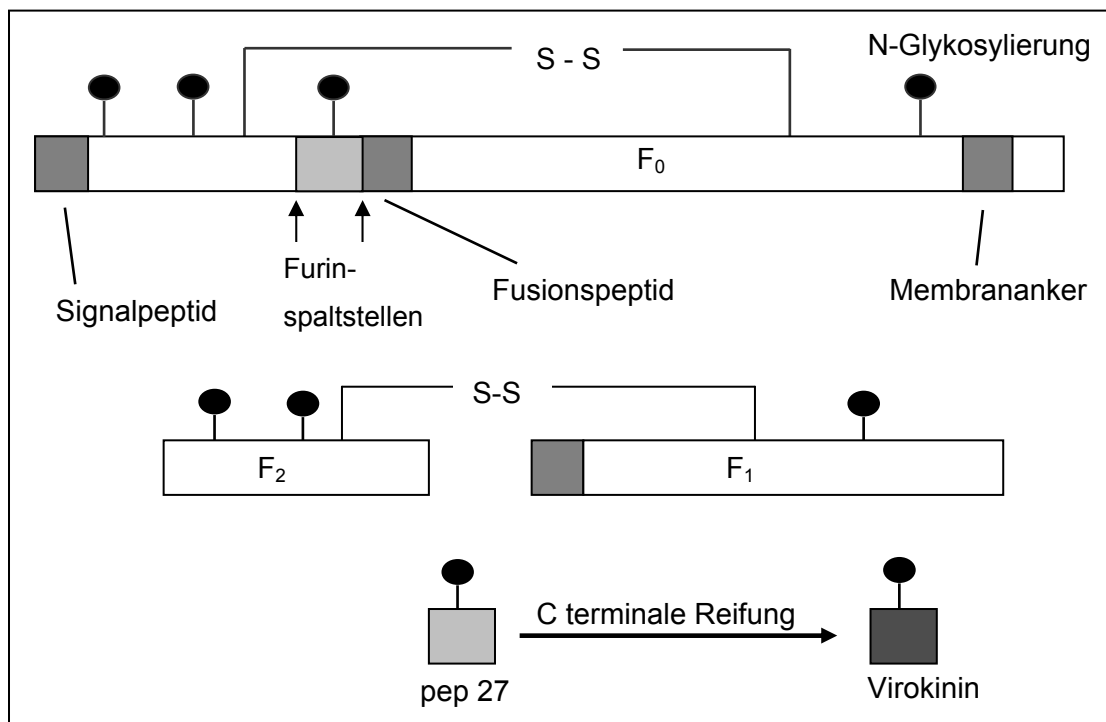


Abbildung 3: Schematische Darstellung des BRSV F-Vorläuferproteins und dessen proteolytische Spaltung. Ebenfalls dargestellt sind die vier potentiellen Glykosylierungsstellen (♣).

Das reife Peptid besitzt an seinem C-Terminus ein Motiv, FXGLM, das für die Peptidhormone der Tachykininfamilie kennzeichnend ist und daher als Virokinin bezeichnet wurde (Zimmer *et al.*, 2003). Tatsächlich konnte nachgewiesen werden das Virokinin die Tachykininrezeptoren 1 und 3 aktiviert und zu einer Kontraktion glatter Muskulatur führt (Zimmer *et al.*, 2003). Das F-Protein des HRSV wird ebenfalls an zwei Positionen durch Furin gespalten. Die Funktion des hierbei freigesetzten Peptids ist aber bislang unbekannt. Am carboxyterminalen Ende des Fusionspeptides und am aminoterminalen Ende des Membranankers liegen die Bereiche der „Heptad repeats“ (Chambers *et al.*, 1990), die ein stabiles Trimer aus „Hairpin“-ähnlichen Strukturen bilden, welche durch Konformationsänderung eine Annäherung der viralen und zellulären Membran ermöglichen (Harris & Werling, 2003). Nach seinem Transport an die Plasmamembran ist das F-Protein in den sogenannten „lipid rafts“ lokalisiert (Fleming *et al.*, 2006) und führt dort zu einer pH-unabhängigen Fusion zwischen der Wirtszellmembran und Membranen benachbarter Zellen, so dass vielkernige Riesenzellen (Synzytien) entstehen. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass RhoA, eine kleine Rho GTPase, für die Bildung von Synzytien notwendig ist. Die Inhibition dieser kleinen GTPase führte jedoch zu keiner verminderten Produktion von Virionen (Gower *et al.*, 2005). Weitere Studien beschrieben zudem eine immunmodulatorische Fähigkeit des F-Proteins. So führte das F-Protein zu einer kontaktvermittelten Inhibition der Mitogen-induzierten T-Zell-Proliferation (Schlender *et al.*,

2002). Weiterhin konnten Untersuchungen zeigen, dass das RSV F-Protein zu einer Aktivierung des *Toll like Rezeptor 4* (TLR4) führt (Kurt-Jones *et al.*, 2000).

1.11 Tachykinine und Tachykininrezeptoren

Tachykinine stellen eine Familie eng verwandter Peptidhormone dar, zu denen Substanz P (SP), Neurokinin A (NKA) und Neurokinin B (NKB) gehören. In Säugetieren kodieren zwei separate Gene, Preprotachykinin I (PPT-I) und Preprotachykinin II (PPT-II), für die zellulären Tachykinine (Nawa *et al.*, 1984). Durch alternatives Spleißen des PPT-I Gens können vier mRNA Formen entstehen, von denen zwei (β und γ) für die Synthese von Substanz P und Neurokinin A kodieren, die Formen α und δ kodieren hingegen nur für Substanz P (Nawa *et al.*, 1984). PPT-II kodiert für Neurokinin B. Eine posttranslationale Prozessierung, d.h. Spaltung und Modifikation individueller Aminosäurereste, wandelt den Vorläufer in kleine aktive Peptidhormone um (MacDonald *et al.*, 1988). Die prozessierten und modifizierten Peptidhormone weisen ein unterschiedliches Expressionsprofil auf. So ist NKB im zentralen Nervensystem nachweisbar (Moussaoui *et al.*, 1992; Patacchini & Maggi, 1995). Die Tachykinine SP und NKA, welche aus einem Preprotachykinin stammen, werden zudem in Epithelzellen (Chu *et al.*, 2000), Fibroblasten (Bae *et al.*, 2002) sowie Zellen der glatten Muskulatur des Intestinal- und Atemwegtraktes exprimiert (Khan & Collins, 1994; Maghni *et al.*, 2003).

Die durch die Peptidhormone aktivierten humanen Tachykininrezeptoren, von denen bis heute drei Subtypen bekannt sind, gehören zu der Familie (Rhodopsin-ähnliche) der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Diese Rezeptoren teilen die folgenden Struktur motive (Abbildung 4): sieben Transmembrandomänen (TM I-VII), drei extrazelluläre - (ES 1-3), drei intrazelluläre Schleifen (IS 1-3), ein extrazellulärer N-Terminus und ein cytoplasmatischer C-Terminus (Krause *et al.*, 1995; Regoli *et al.*, 1994).

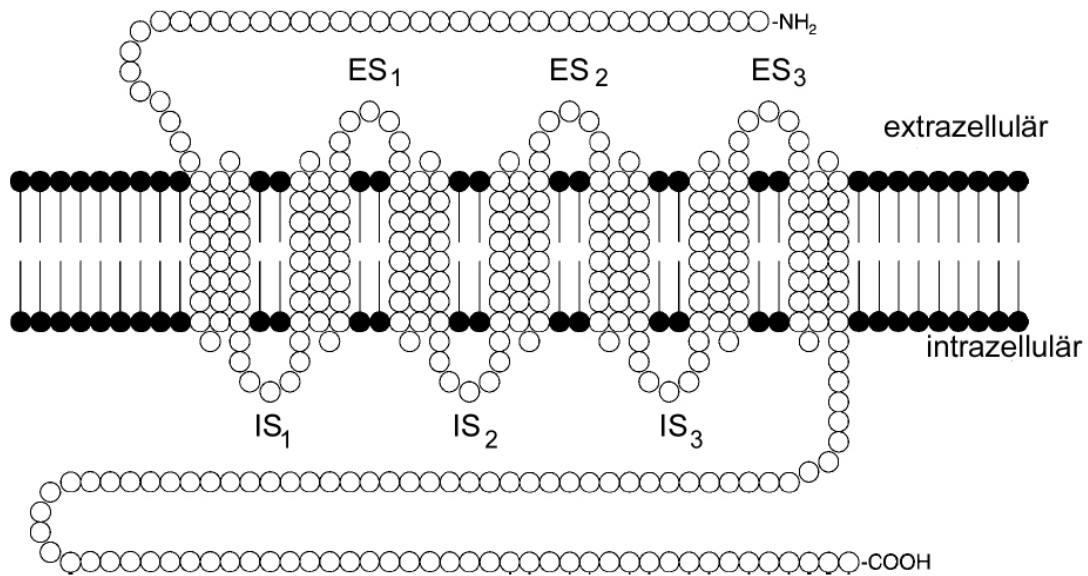


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Tachykininrezeptors 1.

Abgeändert aus (O'Connor *et al.*, 2004).

Die Tachykininrezeptoren 1 und 2 bestehen aus 407 und 398 Aminosäuren, der Tachykininrezeptor 3 hingegen ist am N-Terminus verlängert und besteht daher aus 465 Aminosäuren. Die in „Lipid rafts“ lokalisierten Rezeptoren (Monastyrskaya *et al.*, 2005) reagieren unterschiedlich stark auf die verschiedenen Tachykininen (**TACR-1**: Substanz P \geq Neurokinin A > Neurokinin B; **TACR-2**: Neurokinin A > Neurokinin B > Substanz P; **TACR-3**: Neurokinin B > Neurokinin A > Substanz P). Zudem weisen die TACR-Subtypen ein unterschiedliches Expressionsprofil auf. Der TACR-1 ist sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem verschiedener Spezies verbreitet. TACR-2 findet sich vor allem im peripheren Nervensystem, und dort hauptsächlich in der glatten Muskulatur des Respirations-, Gastrointestinal- und Harntraktes. Im Gegensatz zu TACR-1 und TACR-2 liegt TACR-3 in sehr geringen Mengen im peripheren Nervensystem vor, ist jedoch dafür im zentralen Nervensystem und im Rückenmark nachweisbar (Maggi, 1995). In Abhängigkeit von der G_{α} -Untereinheit führt eine Bindung des Liganden an den entsprechenden Rezeptor zu einer Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege (Hershey & Krause, 1990). Hierbei werden Effektorproteine aktiviert oder inhibiert, wie z.B. Adenylatzyklase, Phospholipasen und Ionenkanäle, was zur Bildung verschiedener „Second messenger“ führt (Attramadal *et al.*, 1992; Lohse *et al.*, 1990; Pippig *et al.*, 1993). Mehrere Studien zeigten, dass der TACR-1-Agonist Substanz P eine bedeutende Rolle in der zellulären Immunmodulation und Inflammation spielt (DeFea *et al.*, 2000a; Grady *et al.*, 2000; Groneberg *et al.*, 2004). Hierbei führt Substanz P zu einer verstärkten Lymphozytenproliferation und Immunglobulinfreisetzung und induziert die Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren.

2. Zielsetzung

Die proteolytische Spaltung des Virokinins aus dem bovinen RSV Fusionsprotein stellt eine bis heute einzigartige Form der molekularen Mimikrie bei viralen Erregern dar. Da RSV das respiratorische Epithel apikal infiziert, sollte in dieser Arbeit die Sekretion des Virokinins in polaren Epithelzellen und seine Wirkung auf G-Protein-gekoppelte Rezeptoren untersucht werden. Da bis heute nicht bekannt war, ob die Tachykininrezeptorsubtypen in polaren Epithelzellen an der apikalen oder basolateralen Membran lokalisiert sind und somit Virokinin im Falle einer apikalen Sekretion, autokrin oder parakrin wirken kann, sollte die Lokalisation der Rezeptoren in polaren Epithelzellen gezeigt werden. Hierfür sollten transgene MDCKII Zelllinien hergestellt werden, die verschiedene Tachykininrezeptoren bzw. das F-Protein des BRSV induzierbar exprimieren.

Da aufgrund der Untersuchung des Virokinins in polaren Epithelzellen eine induzierbare Expression des F-Proteins möglich war, konnte die Cytopathogenität des Glykoproteins in Abwesenheit weiterer viraler Proteine dargestellt und die aktivierten Signalwege näher untersucht werden.

3. Material

3.1 Zelllinien

16 HBE14o	Humane Bronchialepithelzellen; Dr. Gruenert, Human Molecular Genetics Unit, Department of Medicine, University of Vermont, Burlington, USA
A549	Humane Lungenkarzinomzellen; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
BHK-21	<i>Baby hamster kidney cells</i> , fibroblastenähnliche Zellen aus der Niere; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
Calu3	Humane Lungenepithelzelllinie; American Type Culture Collection (ATTC)
HEp-2	Humane Larynxepithel-Karzinomzelllinie; Institut für Virologie, Philipps Universität Marburg
MDCKII	<i>Madin-Darby canine kidney cells</i> ; Nierenepithelzellen des Hundes; Kai Simons, Max-Planck-Institut Dresden
MDCK II-switch	Transgene MDCK-II-Zelllinie, die konstitutiv das pSwitch-Regulatorprotein (Invitrogen) exprimiert.
Vero	Permanente Zelllinie aus Nierenepithelzellen der grünen Meerkatze, American Type Culture Collection (ATCC)

3.2 Zellkulturmaterial

EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium)	Gibco BRL, Karlsruhe
EDULB (Dulbecco's modified Eagle Medium)	Gibco BRL, Karlsruhe
HAM's F12 Medium	Biochrom, Hamburg
PBSM/ PBS	Gibco BRL, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom, Hamburg
Versen-Trypsin 0,125%	Gibco BRL, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin Antibiotikallösung	Gibco BRL, Karlsruhe
RU486 (Mifepriston)	Sigma, Deisenhofen
Zeocin	Invivogen, San Diego

Hygromycin	Roche, Mannheim
Geneticin G418 Sulfat	Calbiochem, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe

3.3 Viren

Humanes respiratorisches Syncytialvirus (HRSV), Stamm A2	Geraldine Taylor, Institute for Animal Health, Compton, Großbritannien
Humanes respiratorisches Syncytialvirus (HRSV), Stamm Long	H.- Jürgen Streckert, Ruhr-Universität Bochum, Deutschland

3.4 Bakterien

<i>E. coli</i> XL1 blue	Stratagene, La Jolla
LyoComp GT116 <i>E.coli</i>	Invivogen, San Diego

3.5 Plasmide

pGeneC	Firma Invitrogen; pGeneC ist Teil des Gene Switch Systems und erlaubt die induzierbare Expression des gewünschten Proteins in Säugerzellen im Zusammenspiel mit dem pSwitch-Plasmid.
pEGFP-N1	Firma Clontech; erlaubt die Expression eines Proteins fusioniert mit GFP (green fluorescence protein), wobei das exprimierte Protein mit dem N-terminalen Ende von GFP fusioniert ist.
pCMV-3Tag-3	Firma Stratagene; erlaubt die Expression eines Proteins, das am C-Terminus ein 3xFlag Epitop erhält. Als Selektionsmarker in eukaryotischen Zellen wird G418 Sulfat verwendet.
pCMV-3Tag-1	Firma Stratagene; Plasmid erlaubt die Expression eines Proteins das am N-Terminus ein 3x Flag-Epitop erhält. Als Selektionsmarker in eukaryotischen Zellen wird G418 Sulfat verwendet.
pcDNA 3.1-rTACR-1-Flag	Tachykininrezeptor-1 aus der Ratte, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Nigel Bunnett, University of California, San Francisco, USA.

Reportergenplasmide

Mercury™ Profiling Vektoren	pSEAP2-Control, pTAL-SEAP, pCRE-SEAP, pNFAT-SEAP, pSRE-SEAP stammen von der Firma Clontech und ermöglichen den Nachweis aktivierter Transkriptionsfaktors mit Hilfe der sezernierten alkalischen Phosphatase als Reportergen, das unter Kontrolle eines Promotors mit dem entsprechenden cis-aktiven Element steht.
Luziferase-Reportergenplasmide	Die verwendeten Reporterplasmide AP1-luc, NF- κ B-luc, p53-luc und TARE-luc besitzen ein <i>firefly</i> Luziferase-Gen, welches unter der Kontrolle des jeweiligen <i>cis</i> -aktiven Elementes steht (Stratagene). Das Reporterplasmid 125-luc stellt ein durch Interferon stimulierbares Element dar. Es wurde von Takashi Fujita (Department for Tumor Cell Biology, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Tokyo, Japan) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

siRNA-Vektoren

psiRNA-hp53	Firma Invivogen; Plasmid, welches die Expression einer gegen das humane p53 gerichteten „ <i>short hairpin</i> “ RNA ermöglicht. Das Plasmid enthält zudem ein GFP-Zeocin Fusionsgen, welches eine Selektion in eukaryotischen Zellen ermöglicht.
psiRNA-luc	Firma Invivogen; Kontrollplasmid
pIRESneo-p53DN (R273H)	Dominant-negative Mutante des humanen p53, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Matthias Dobbstein, Georg-August Universität Göttingen
pIRESneo	Kontrollplasmid; (Clontech)

3.6 Synthetische Gene

BRSV F-Protein	Codon-optimiertes Gen des bovinen RSV-Fusionsproteins, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Günther Keil, Insel Riems
HRSV F-Protein	Codon-optimiertes Gen des humanen RSV-Fusionsproteins, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Klaus Überla, Ruhr-Universität, Bochum

3.7 Enzyme

<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (5 U/ml)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4 DNA-Ligase (5 U/ml)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/ml)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Calf Intestine Alkaline Phosphatase</i> (CIAP) (1 U/ml)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Streptavidin biotinylated horseradish <i>Peroxidase complex</i>	Amersham Bioscience, Freiburg

3.8 Restriktionsenzyme

<i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RI, <i>Hind</i> III, <i>Kpn</i> I, <i>Not</i> I, <i>Xho</i> I	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
---	-----------------------------

3.9 Kits

QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
Pure Yield™ Plasmid Midiprep System	Promega, Mannheim
CytoTox-ONE™ Homogenous Membrane Integrity Assay	Promega, Mannheim
Caspase-3/7 Glo Assay	Promega, Mannheim
In Situ Cell Death Detection Kit (TMRred)	Roche, Mannheim
Titan One Tube RT-PCR System	Roche, Mannheim

3.10 Primer

Die Primer wurden von den Firmen MWG Biotech AG und Invitrogen synthetisiert. Die Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen sind fett-kursiv dargestellt.

Primer für die Sequenzierung:

Name	Sequenz
bFsyn-Seq 1	ATCAAGAATGCATTGCTGAGC
bFsyn-Seq 2	ACAACAAGGAGGGCAGCAAC
pGeneA-S	CTGCTATTCTGCTCAACCT

Primer für die Klonierung:

Name	Sequenz
bFsyn-S (BamHI)	GGCCGG GGATCC CTGACCATGGCCACGACCACGATG
bFsyn-AS (EcoRI)	GGCCGG GAATTC CTACTTGCTGAAGCTCAGGTTGTTG
cgp40-S(HindIII)	TTCCTT AAGCTT GAGATGTGGAGGGTGCCAGTCCTGCTCTTG
cgp40-AS (KpnI)	TTCCTT GGTACC GTGGGCGAGTACCTTTCTGACATTTTTTC
FADD-DN-S(BamHI)	TTGGCC GGATCC GACGACTTCGAGGCGGGGGCGGCG
FADD-DN-AS(HindIII)	TTGGCC AAGCTT CAGGACGCTTCGGAGGTAGATGCG
Fas-DN-S(EcoRI)	TTGGCC GAATTC ACCATGCTGGGCATCTGGACCCTC
Fas-DN-AS(XhoI)	TTGGCC CTCGAG TTCTGCTGTGTCTTGGACATTGTC
Fsyn-S (HindIII)	GGCCGG AAGCTT ATGGCCACGACCACGATGCGGATG
Fsyn-AS KpnI	CCGGCC GGTACC ACCTTGCTGAAGCTCAGGTTGTTGAT
GFP-AS (EcoRI)	GGCCGG GAATTC TTACTTGACAGCTCGTCCATGCCG
Nk1-AS(EcoRI)	AATTA GAATTC CTAGGAGAGCACATTGGAGGAGAAG
hTACR1/GFP-AS (BamHI)	GGCCGG GGATCCC GGGAGAGCACATTGGAGGAGAAGCTGAAGC
Nk1R-S (KpnI)	TTTT GGTACC GAAATGGATAACGTCCTCCCGGTGGAC
Nk1-S(BamHI)	AATTA GGATCC ATGGATAACGTCCTCCCGGTGGAC
Nk1R-AS (BamHI)	TTTT GGATCC CTAGGAGAGCACATTGGAGGAGAAGC
Nk2 (KpnI)-S	TTTT GGTACC ATGGGACCTGTGACATTGTGACTGAAGCC
Nk2 (BamHI)-AS	TTTT GGATCC TCAAATTTCAACATGAGTTTTGGTGGG

Nk2-S (BamHI)	AATTAAG GGATCC ATGGGGACCTGTGACATTGTGACTG
Nk2-AS (EcoRI)	AATTAAG GAATTC TCAAATTTCAACATGAGTTTTGGTG
Nk3 (KpnI)-S	GGCCGG GGTACC ATGGCCACTCTCCCAGCAGAAACCTGGATA
Nk3-S (BamHI)	AATTAAG GGATCC ATGGCCACTCTCCCAGCAGCAGAAACC

3.11 Peroxidase-Substrate

Name	Firma
BM Chemiluminescence Blotting substrate (POD)	Roche, Mannheim
Super Signal [®] West Dura Extended Duration Substrate	PIERCE, Rockford, USA

3.12 Antikörper

Polyklonal

Name	Endverdünnung	Firma
Kaninchen anti-Bax (N20)	1:100	Santa Cruz, Heidelberg
Kaninchen anti phospho-p53 (ser 15)	1:200	Cell Signaling, Frankfurt
Kaninchen anti-phospho-p53 (ser 46)	1:200	Cell Signaling, Frankfurt
Kaninchen anti-BRSV-FITC	1:100	TiHo Hannover
Ziege anti-Kaninchen IgG, Rhodamin-Konjugat	1:500	Dianova, Hamburg
Ziege anti-Maus IgG, Rhodamin-Konjugat	1:500	Molecular Probes, Karlsruhe

Monoklonal

Name	Endverdünnung	Firma
mAb RSV 3216	1:200	Serotec, Düsseldorf
mAb anti-β-Catenin (Clone 15B8)	1:500	Sigma, Deidenhofen
Palivizumab (Synagis)	1:1000 (5µg/ml)	Abbott Laboratories Ltd., Wiesbaden

3.13 Peptidhormone

Name	Firma
Substanz P	Bachem, Weil am Rhein
Neurokinin A	Bachem, Weil am Rhein
Neurokinin B	Bachem, Weil am Rhein
Synthetisches Virokinin	Biosynthan, Berlin

3.14 Inhibitoren

Name	Endkonzentration	Firma
Caspase Inhibitor I [z-VAD-fmk]	25 µM	Calbiochem, Heidelberg
Caspase-2 Inhibitor I [z-VDVAD-fmk]	25 µM	Calbiochem, Heidelberg
Caspase-8 Inhibitor II [z-IETD-fmk]	25 µM	Calbiochem, Heidelberg
Caspase-9 Inhibitor I [z-LEHD-fmk]	25 µM	Calbiochem, Heidelberg
In Solution™ Caspase-3 Inhibitor II	25 µM	Calbiochem, Heidelberg
JNK Inhibitor II	30 µM	Calbiochem, Heidelberg
Roscovitine	1 µM	Calbiochem, Heidelberg
SB203580	5 µM	Calbiochem, Heidelberg
Y27632 in solution™	5 µM	Calbiochem, Heidelberg
α-Pifithrin	10 µM	Calbiochem, Heidelberg

3.15 Marker SDS-PAGE

PageRuler Prestained Protein Ladder	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
-------------------------------------	-----------------------------

3.16 Chemikalien

ACE	Sigma, Deisenhofen
Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamidlösung 30% „rotiphorese® Gel 30“	Roth, Karlsruhe

Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
APS	Bio-Rad, München
Bacto-Trypton	Roth, Karlsruhe
Blocking-Reagenz	Roche, Mannheim
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
<i>Complete</i> , Proteinaseinhibitorcocktail	Roche, Mannheim
DABCO	Sigma, Deisenhofen
DAPI (4-6-Diamidino-2-Phenylindol-Di-Hydrochlorid)	Sigma, Deisenhofen
DEPC-treated water	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
dNTP Set (4 times 0,25 ml of 100 mM Solution)	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
DTT	Roth, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	MoBiTec, Göttingen
Glucose	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
6 x Loading Dye Solution	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Methylzellulose	Sigma, Deisenhofen

Mowiol 4 88	Calbiochem, Heidelberg
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
2-Propanol (Isopropanol)	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
Pepton	Roth, Karlsruhe
Rubidiumchlorid	Merck, Darmstadt
Tris-Hydroxymethylaminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Roth, Karlsruhe
Tween	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt

3.17 Medien, Puffer und Lösungen

Medien für Bakterien

LB-Medium	Pepton	10 g
	NaCl	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	H ₂ O	ad 1 l
	Autoklavieren, bei Raumtemperatur	
LB-Agar (pH7,0)	Pepton	10 g
	NaCl ₂	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	H ₂ O	ad 1 l
	Agar	20 g
Autoklavieren, bei Raumtemperatur		

TFB I-Puffer	Calciumchlorid (CaCl ₂)	10 mM
	Glycerin	15 %
	Kaliumacetat (KCOOH)	30 mM
	Rubidiumchlorid (RbCl ₂)	100 mM
	Manganchlorid	50 mM
	Reinstwasser	ad 1 l
TFB II-Puffer	MOPS	10 mM
	Rubidiumchlorid	10 mM
	Calciumchlorid	75 mM
	Glycerin	15 %
	Reinstwasser	ad 1 l

Polyacrylamidgel-Elektrophorese

SDS-Laufpuffer (10x)	SDS	10,0 g
	TRIS	30,0 g
	Glycin	144,0 g
	H ₂ O	ad 1 l
Sammelgel (2 ml-Ansatz)	H ₂ O	1,4 ml
	TRIS/HCl (1M) pH 6,8	0,25 ml
	Acrylamidlösung 30 %	0,33 ml
	SDS 10 % (in H ₂ O)	20 µl
	APS 10% (in H ₂ O)	20 µl
	TEMED	2 µl

Trenngel (10 %)	H ₂ O	2,0 ml
(5 ml-Ansatz)	TRIS/ HCl (1,5 M) p8,8	1,3 ml
	Acrylamidlösung 30%	1,7 ml
	SDS 10% (in H ₂ O)	50 µl
	APS 10% (in H ₂ O)	50 µl
	TEMED	4 µl
SDS-Probenpuffer (2x)	0,5 M Tris/HCl (pH6,8)	10 ml
	10 % SDS	20 ml
	Glycerin	10 ml
	H ₂ O	9 ml
	2 % Bromphenolblau	(20 mg/ml in H ₂ O)

Westernblot

Anoden-Puffer I	1M Tris	300 ml
(pH 9,0)	H ₂ O	500 ml
	Ethanol	200 ml
	pH-Wert mit HCl einstellen	
Anoden-Puffer II	1M Tris	25 ml
(pH 7,4)	H ₂ O	770 ml
	Ethanol	200 ml
	pH-Wert mit HCl einstellen	
Kathoden-Puffer	1M Tris	25 ml
(pH 9,0)	Aminocaprinsäure	5,25 g
	H ₂ O	770 ml
	Ethanol	200 ml
	pH-Wert mit HCl einstellen	

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS) pH 7,2	NaCl	8 g
	KCl	0,2 g
	Na ₂ HPO ₄	1,15 g
	KH ₂ PO ₄	0,2 g
	MgCl ₂ x 6H ₂ O	0,1 g
	CaCl ₂ x 2H ₂ O	1,3 g
	H ₂ O	ad 1 l
PBS ohne Calcium und Magnesium pH 7,2 (PBSM)	NaCl	8 g
	KCl	0,2 g
	Na ₂ HPO ₄	1,15 g
	H ₂ O	ad 1 l
Agarosegelelektrophorese		
TBE-Puffer (10x)	Tris	108 g
	Borsäure	55 g
	0,5 M EDTA (pH 8,0)	40 ml
	H ₂ O	ad 1 l
Agarosegele	1% TBE-Gel	1 g Agarose/ 100ml TBE
	1,5% TBE-Gel	1,5 g Agarose/ 100ml TBE
	2% TBE-Gel	2 g Agarose/ 100ml TBE
DNA-Probenpuffer (6x)	Bromphenolblau	0,25 %
	Saccharose in H ₂ O	40 % (w/v)
	bei 4 °C lagern	

Ethidiumbromid- Stocklösung	Ethidiumbromid H ₂ O Färbung: 0,5 µg/ ml (in H ₂ O)	1 g ad 100 ml
--------------------------------	---	------------------

Zell-Lysate

NP40-Lysispuffer pH 7,5 (Proteaseinhibitoren)	Natriumdesoxycholat TBS pH 7,5 Nonidet P40 (bei 37°C erwärmt) <i>Complete</i>	0,5 % 50 ml 1 % 1 Tablette
--	--	-------------------------------------

Immunfluoreszenz

DAPI	DAPI (1 mg/ml in H ₂ O)	
Mowiol Eindeckelmedium	Mowiol Glycerol H ₂ O 0,2 M TRIS (pH8,5) DABCO Aliquotieren und bei -20°C lagern	2,5 g 6 g 6 ml 12 ml Endkonz. 2,5%

Immunoplaquetest

Methylzellulose	sterile Methylzellulose (4.000 Centipoisens) DMEM mit 2 % FKS und Antibiotika Unter Rühren bei 4°C lösen (ca. 2 Tage)	2 g 250 ml
ACE-Stocklösung	3-amino-9-ethylcarbazol Dimethylformamid	2 mg 300 ml

AEC-Gebrauchslösung	Natriumacetatpuffer	50 mM
	(pH 5,0)	5 ml
	AEC-Stocklösung	300 µl
	3 % H ₂ O	50µl

3.18 Geräte

Fluoreszenzmikroskop Axiophot	Zeiss, Göttingen
Spektral und konfokales Multiphoton System Leica DM IBRE + LEICA TCS SP2	Leica Microsystems, Heidelberg
<i>Gene Quant RNA/DNA Calculator</i>	Pharmacia Biotech,
GENios pro	Tecan, Crailsheim
UV-Transilluminator	UVP, USA
Photometer Ultraspec 2000	Amersham, Freiburg
Ohm-Meter (Millicell®ers)	Millipore, Schwalbach
Epics XL-Cytometer mit Expo 32 ADC Software	Beckman-Coulter, Krefeld

3.19 Zellkulturmaterial

Gewebekulturflaschen 25 cm ²	Nunc, Wiesbaden
Gewebekulturflaschen 75 cm ²	Nunc, Wiesbaden
96-Napf-Platten	Nunc, Wiesbaden
96-Napf-Platten (weiß)	Nunc, Wiesbaden
96-Napf-Platten	Costar, Bodenheim
24-Napf-Platten	Greiner, Nürtingen
Transwell® Filtersysteme, 0,4µm, Ø 6,4 mm Insert	Costar, Bodenheim
Transwell® Filtersysteme, 0,4 µm, Ø 24 mm Insert	Costar, Bodenheim

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Polymerasenkettenreaktion (PCR)

Für die Klonierung der, in 4.1.8 dargestellten, Konstrukte wurde die *Pfu*-DNA-Polymerase (MBI Fermentas) aus dem Bakterium *Pyrococcus furiosus* verwendet. Einem Standard-PCR- Ansatz wurden folgende Reagenzien auf Eis zugesetzt:

DEPC-Wasser	38 μ l
10x <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase-Puffer + MgSO ₄	5 μ l
10 mM dNTP	1 μ l
Primer-S (10 pmol/ μ l)	2 μ l
Primer-AS (10 pmol/ μ l)	2 μ l
Template (50-100 ng)	1 μ l
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (3 U/ μ l)	1 μ l

*Die Polymerase wurde erst dazugegeben, nachdem der restliche Ansatz ca. 30 s bei 70°C erhitzt wurde („hot start“). Die PCR- Reaktionen wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt.

70°C (hot start)		
95°C	2 min	
95°C	30 sec	} 10 Zyklen
55°C (-0,3°C/Zyklus)	30 sec	
72°C	X min*	
95°C	30 sec	
55°C	30 sec	} 8- 15 Zyklen
72°C	X min* + 10 sec	
72°C	7 min	
4°C	∞	

* Die Elongationszeit richtet sich nach der Länge des zu amplifizierenden DNA Fragmentes. Für die Pfu-Polymerase wurde mit 500 nt/ min gerechnet.

4.1.2 Agarosegelelektrophorese

Zum Nachweis der amplifizierten DNA-Fragmente wurden 5 µl der PCR-Probe mit je 3 µl DNA-Probenpuffer versetzt und auf einem TBE-Agarosegel aufgetrennt. Abhängig von der Größe der zu analysierenden DNA-Fragmente lag die Agarosekonzentration zwischen 0,8 und 2%. Die Gelelektrophorese wurde bei 130V durchgeführt. Die Gele wurden für 5 min im Ethidiumbromidbad gefärbt und für 10 min in Wasser entwässert. Ethidiumbromid interkaliert hierbei zwischen die Basen der DNA und macht dadurch die DNA unter UV- Bestrahlung fluoreszierend sichtbar.

Zur Isolierung von amplifizierten DNA-Fragmenten nach ihrer Behandlung mit Restriktionsendonukleasen wurde die DNA auf einem TAE-Agarosegel bei 80 V aufgetrennt. Hierbei wurde neben den Größenmarker eine Spur mit der DNA-Probe (10 µl) aufgetragen dann folgte eine freie Spur. In die folgenden Spuren wurden jeweils 20 µl der DNA aufgetragen. Nach der Auftrennung im Gel wurde der Marker sowie die folgende Ansatz-Spur von dem restlichen Gel mit Hilfe eines Skalpell getrennt und im Ethidiumbromidbad gefärbt. Die geschnittenen DNA-Fragmente konnte daraufhin in der Höhe der gefärbten Bande ausgeschnitten und gereinigt werden. Auf diese Weise wurde eine Schädigung der DNA durch das UV-Licht vermieden.

4.1.3 Restriktion von DNA

Um eine Klonierung der amplifizierten DNA-Fragmente in den jeweiligen Vektor zu ermöglichen, wurden diese in einem 50 µl Ansatz mit den jeweiligen Restriktionsendonukleasen (3.1.10) geschnitten. Hierbei wurden bis zu 5 Units/µl pro Endonuklease für 12 Stunden bei dem jeweiligen Temperaturoptimum des Enzyms verdaut. Die Plasmid-DNA (3 µg DNA) wurde mit bis zu 5 Units/ µl pro Endonuklease für eine Stunde bei 37°C verdaut. Die Reinigung der geschnittenen DNA erfolgte mit Hilfe des *Qiaquick PCR Purification Kit*. Die DNA wurde in 40 µl DEPC-Wasser eluiert.

4.1.4 Dephosphorylierung linearer DNA

Um eine Religation der linearisierten Plasmid-DNA zu verhindern, wurde eine Dephosphorylierung mittels *CIAP* (*calf intestine alkaline phosphatase*) durchgeführt. Hierbei wurde die in 40 µl eluierte Plasmid-DNA mit 2 µl CIAP, 3 µl Wasser und 5 µl CIAP Puffer versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Dieser Dephosphorylierung folgte eine PCR Reinigung der DNA mit dem *Qiaquick PCR Purification System*.

4.1.5 Ligation von DNA

Hierbei wurden die zuvor durch Restriktionsendonukleasen geschnittene DNA-Fragmente und der Vektor in einem molaren Verhältnis von 5:1 ligiert. Die einzusetzende Menge an DNA konnte mit folgender Formel berechnet werden.

$$\left[\frac{80 \text{ ng des Vektors} \times \text{kb Größe des Inserts} \times 5}{\text{kb Größe des Vektors}} \right] = \text{ng des Inserts}$$

In einem 20 µl Ligationsansatz war die nötige Menge an Insert und Vektor, sowie 2 µl 10 x T4 DNA-Ligase-Puffer und 2 µl T4 DNA-Ligase enthalten. Die Ligation wurde bei 14° C für 16 Stunden durchgeführt.

4.1.6 Hitzeschocktransformation von *E.coli*

Mit dieser Methode wird erreicht, dass Plasmide von *E. coli* XL-1 Blue Bakterien aufgenommen werden. Hierfür wurden zunächst 20 ml LB-Medium (+Tetracyclin) mit einer Kolonie XL-1 Blue *E. coli* angeimpft und über Nacht bei 37°C in einem Schüttler inkubiert. 250 ml frisches LB-Medium wurden mit 5 ml dieser Vorkultur angeimpft und für 2-3 Stunden bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Kultur bei 4500 U/min. Das entstandene Pellet wurde in 75 ml TFBII-Puffer resuspendiert, für 15 min auf Eis gestellt und die Bakterien danach erneut pelletiert. Daraufhin folgte die Resuspension des Pellet in 10 ml TFBII-Puffer. Die Bakterien wurden in Portionen zu 100 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Diese Aliquots der Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, 2-4 µl Ligationsansatz dazu pipettiert und dieses Gemisch für 30 min auf Eis inkubiert. Dieser Inkubation folgte der 30 Sekunden dauernde Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad. Nach weiteren 2 min auf Eis wurden 250 µl LB Medium zugegeben und der Ansatz für eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Der Inkubation folgte das Ausstreichen der Transformation auf den, die jeweiligen Antibiotika (Ampicillin (100 µg/ml); Kanamycin (50 µg/ml) enthaltenden, LB-Platten. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

4.1.7 Kolonie PCR

Mit dieser Methode können Kolonien auf die Anwesenheit von rekombinantem Plasmid untersucht werden. Die verwendeten Primer wurden so ausgesucht, dass diese sowohl an das klonierte Fragment als auch an eine spezifische Stelle in dem verwendeten Vektor gebunden haben. Der Mastermix hatte folgende Zusammensetzung (für 12 Ansätze):

DEPC-Wasser:	132 μ l
10 x Taq-Puffer:	18 μ l
25 mM MgCl ₂ :	14,4 μ l
10 mM dNTP:	3,6 μ l
S-Primer (10 pmol):	5,4 μ l
AS-Primer (10 pmol):	5,4 μ l
Taq-Polymerase (5 U/ μ l):	1,2 μ l

Pro Konstrukt wurden 10 bis 20 Kolonien mit Hilfe der Kolonie PCR untersucht. Der Master-Mix wurde auf durchnummerierte PCR-Reaktionsgefäße aufgeteilt (15 μ l/ Ansatz). Die gleiche Anzahl an Eppendorf Reaktionsgefäße wurden mit 250 μ l LB Medium (mit Selektionsantibiotika) angesetzt und ebenfalls durchnummeriert. Mit einer sterilen 10 μ l Spitze erfolgte die Aufnahme einzelner Kolonien und die Resuspension im PCR-Mix und im LB-Medium. Die LB-Kulturen wurden daraufhin bei 37°C geschüttelt und die PCR unter den folgenden Bedingungen gefahren:

95°C	3 min	} 20 Zyklen
95°C	15 sec	
55°C	30 sec	
72°C	X min*	
72°C	5 min	
4°C	∞	

* Die Elongationszeit richtet sich nach der Länge des zu amplifizierenden DNA Fragmentes. Für die Pfu-Polymerase wurde mit 2 kb/ min gerechnet.

Die PCR-Produkte wurden auf 1 % Agarosegelen in TBE-Puffer bei 130 V aufgetrennt und daraufhin im Ethidiumbromidbad gefärbt. Mit zwei ausgewählten Klonen wurde eine Übernachtskultur angeimpft und diese bei 37°C und 180 U/min für 16 Stunden geschüttelt.

4.1.8 Klonierung

Zur Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte wurden die folgenden „Templates“ über die angegebenen Schnittstellen in die jeweiligen Vektoren kloniert.

Template	Vektor	Schnittstellen	Endkonstrukt
hTACR1 (S62045)	pEGFP-N1	<i>KpnI/BamHI</i>	pEGFPN1-hTACR1
TACR1-GFP	pGene C	<i>KpnI / EcoRI</i>	pGeneC-TACR1-GFP
TACR2 (NM_001057)	pEGFP-N1	<i>KpnI/BamHI</i>	pEGFPN1-hTACR2
TACR2-GFP	pGeneC	<i>KpnI/ EcoRI</i>	pGeneC-TACR2-GFP
TACR3 (NM_001059)	pEGFP-N1	<i>KpnI/ BamHI</i>	pEGFPN1-TACR3
TACR3-GFP	pGeneC	<i>KpnI/EcoRI</i>	pGeneC-TACR3-GFP
BRSV Fsyn (AM746678)	pGeneC	<i>BamHI/EcoRI</i>	pGeneC-bF
BRSV Fsyn (AM746678)	pEGFPN1	<i>HindIII/KpnI</i>	pEGFPN1-bFsyn
BRSV Fsyn-GFP	pGeneC	<i>HindIII/EcoRI</i>	pGeneC-Fsyn-GFP
cgp40-GFP (Z81018)	pGeneC	<i>HindIII/KpnI</i>	pGeneC-gp40-GFP
hFAS (BC012479)	pCMV-3Tag3	<i>EcoRI/XhoI</i>	pCMV-3Tag3-DN FAS
hFADD (BC000334)	pCMV-3Tag1	<i>BamHI/HindIII</i>	pCMV-3Tag1-DN FADD

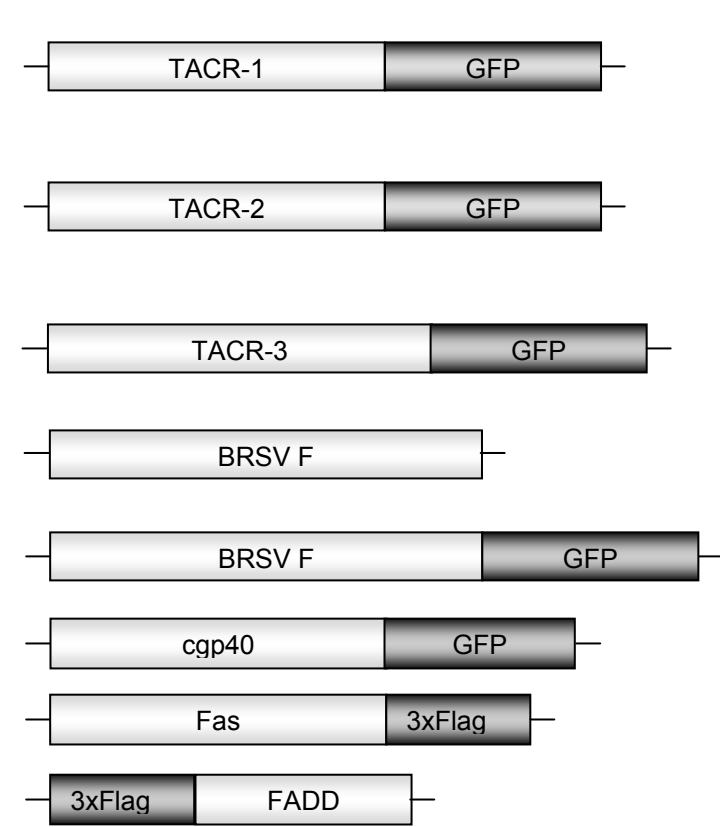


Abbildung 5: Übersicht der verwendeten Konstrukte.

4.2 Cytologische Methoden

4.2.1 Zellkultur von Zellen

Alle Zellkulturen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ Atmosphäre in 75 cm² Kulturflaschen kultiviert. Nach 3-4 Tagen wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 10 ml PBSM gewaschen und daraufhin mit 1 ml Trypsin/EDTA bis zum Ablösen der Zellen inkubiert. Zum Stoppen der Trypsinierung wurde nach Ablösen der Zellen 1 ml fötales Kälberserum zu der Zellsuspension hinzugegeben. Diese Suspension wurde in 9 ml Medium resuspendiert, aufgeteilt und in dem entsprechenden Medium mit fötalem Kälberserum aufgenommen (Tabelle 3).

Zelllinie	Medium	FKS	Selektionsantibiotika
A549	HAM's	10 %	-
BHK 21	EMEM	5 %	-
Calu3	EMEM	5 %	-
HBE	EDULB	10 %	-
HEp-2	EMEM	10 %	-
MDCKII	EMEM	5 %	-
MDCKII switch	EMEM	5 %	Hygromycin (500 µg/ ml)
MDCKII switch/ pGeneC	EMEM	5 %	Hygromycin(500 µg/ml) Zeocin (1 mg/ml)
Vero	EDULB	5 %	-

Tabelle 3: Verwendete Zelllinien

4.2.2 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Transiente Transfektion (BHK21, A549)

Für die transiente Transfektion wurden am Vortag BHK21-Zellen mit einer Dichte von $1,5 \times 10^5$ Zellen pro ml in einer 24-Napf-Platte (Greiner) ohne Antibiotika ausgesät. Am darauf folgenden Tag erfolgte ein Mediumwechsel (500 µl/ Napf). Zu diesem Zeitpunkt waren die Zellen zu 80% konfluent. Für die Transfektion wurde zunächst die DNA (1µg/Napf) bzw. *Lipofectamin* (2µl/ Napf) in jeweils 50 µl serumfreien Medium ohne Antibiotika verdünnt und für 5 min bei RT inkubiert. Daraufhin wurden die DNA und das Transfektionsreagenz gemischt und für weitere 20 min inkubiert. Schließlich wurde das Gemisch zu den Zellen

gegeben, diese für weitere 24 Stunden kultiviert. Je nach Versuchsaufbau erfolgte am folgenden Tag ein Mediumwechsel.

Stabile Transfektion von Zelllinien

Zur Herstellung einer transgenen Zelllinie wurden über nicht-homologe Rekombination die jeweiligen Transgene in die jeweilige Zelle eingebracht. MDCK- bzw. A549-Zellen wurden mit einer Dichte von $1,5 \times 10^5$ Zellen pro ml in 66 mm Schalen ausgesät und am folgenden Tag unter Verwendung von 10 µg des jeweiligen Plasmids und 20 µl des Transfektionsreagenz *Lipofectamin* transfiziert. Am darauf folgenden Tag wurden sowohl die nicht transfizierten Kontrollzellen als auch die transfizierten Zellen in 75 cm²-Flaschen umgesetzt und die jeweiligen Selektionsantibiotika zugefügt (Tabelle 4). Nach dem Tod der Kontrollzellen wurden von antibiotikaresistenten Zellen mittels "*Limiting dilution*" einzelne Klone hochgezogen. Die Expressionsanalyse der Zelllinien erfolgte im Tecan Mikroplattenleser (GFP-Konstrukte) und mittels Immunfluoreszenz (Flag-Epitope).

Name	Selektionsantibiotika	Endkonzentration
Calu 3-hF-GFP	Hygromycin/Zeocin	500 µg/ml-1 mg/ml
MDCK-(bFsyn)	Hygromycin/Zeocin	500 µg/ml -1 mg/ml
MCK-(bFsyn-GFP)	Hygromycin/Zeocin	500 µg/ml -1 mg/ml
MDCK-(TACR1-GFP)	Hygromycin/Zeocin	500 µg/ml -1 mg/ml
MDCK-(TACR2-GFP)	Hygromycin/Zeocin	500 µg/ml -1 mg/ml
MDCK-(TACR3-GFP)	Hygromycin/Zeocin	500 µg/ml -1 mg/ml
MDCK-(GFP)	Hygromycin/Zeocin	500 µg/ml -1 mg/ml
MDCK-(gp40-GFP)	Hygromycin/Zeocin	500 µg/ml –1 mg/ml
MDCK-(hF-GFP)-FasDN-3xFlag	Hygromycin/Zeocin	1 mg/ml
MDCK-(hF-GFP)-3xFlag-FADD-DN	Hygromycin/Zeocin	1 mg/ml
MDCK-(hF-GFP)-p53-DN	Hygromycin/Zeocin	1 mg/ml
A549–p53-DN	Geneticin (G418) Sulfat	0,75 mg/ml
A549-pIRESneo	Geneticin (G418) Sulfat	0,75 mg/ml
A549-siRNAp53sh	Geneticin (G418) Sulfat	0,75 mg/ml
A549-siRNA-luc	Geneticin (G418) Sulfat	0,75 mg/ml

Tabelle 4: Hergestellte transgene Zelllinien.

4.2.3 Reporter-genversuche

Zum Nachweis einer transkriptionellen Aktivität standen verschiedene Reporter-gene zur Verfügung. Das entsprechende Reporter-gen (*firefly* Luziferase oder sezernierte alkalische Phosphatase [SEAP]) unter Kontrolle verschiedener cis-aktiver Elemente wurde in die jeweilige Zelllinie (BHK-21-, A549-Zellen) wie in 4.2.2 beschrieben transfiziert.

SEAP-Reporter-gen

Die Untersuchung einer transkriptionellen Aktivierung nach Inkubation des Tachykininrezeptors-1 (aus der Ratte) mit synthetischem Virokinin bzw. konditionierten Kulturüberständen wurde mit Hilfe der SEAP-Reporterplasmide nachgewiesen. Hierfür wurden 24 Stunden nach Aussaat die BHK-21-Zellen mit dem aus der Ratte stammenden TACR-1 und jeweils einem SEAP-Reporterplasmid transfiziert (siehe 4.2.2). Das leere pCMV-Plasmid diente hierbei als Kontrolle und wurde in einem weiteren Ansatz zusammen mit dem Reporterplasmid in Abwesenheit des Rezeptors transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Substanz P, synthetischem Virokinin oder konditioniertem Überstand für 24 Stunden inkubiert. Daraufhin erfolgte der Nachweis des sezernierten Reporters im Überstand der Zellen mit einem lumineszierenden alkalische Phosphatase-Substrates (BM Lumineszenz Detektion Kit) im Luminometer.

Firefly-Luziferase-Reporter-gen

Nach Transfektion von MDCK-(hF-GFP)-Zellen mit der *firefly*-Luziferase wurde die Expression des Transgens induziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen trypsiniert und durch Zentrifugation pelletiert. Danach folgte die Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer. Zu 2×10^4 Zellen wurden 100 μ l des "Cell lysis"-Puffer (Promega) zugegeben und anschließend unlösliches Material durch Zentrifugation entfernt. Vom Überstand wurden 20 μ l mit 80 μ l des Luziferase-Substrates (Luziferase Substrat System, Promega) gemischt. Die freigesetzte Lumineszenz wurde nach 5 minütiger Inkubation mit Hilfe des Plattenlesegerätes (Tecan) gemessen.

Für die Untersuchung einer transkriptionellen Aktivierung im Kontext einer RSV-Infektion wurden A549-Zellen 20 Stunden nach Transfektion mit dem jeweiligen Reporterplasmid mit einer MOI von 3 infiziert. Nach 24 Stunden erfolgte der Nachweis der Luziferase wie oben beschrieben.

4.2.4 Kultivierung von MDCK-Switch-Zelllinien auf Transwell-Filterssystemen

Die Lokalisation einzelner Proteine wurde in polarisierten MDCK-Zellen durchgeführt, die auf Transwell-Filterssystemen (\varnothing 6,4 mm) kultiviert worden waren. Die apikale Filterkammer wurde dafür mit 200 μ l einer Zellsuspension (2×10^5 Zellen/ml) befüllt, in die basale Filterkammer wurden 800 μ l EMEM-Mediums + 10% FKS vorgelegt. Sollte eine Oberflächenbiotinylierung durchgeführt werden (siehe 4.3.3) wurde die apikale Kammer von Transwell-Filterssystemen (\varnothing 24 mm) mit 2 ml einer Zellsuspension (2×10^5 Zellen/ml) befüllt. In die basale Kammer wurden 2 ml des EMEM-Mediums (10% FKS) vorgelegt.

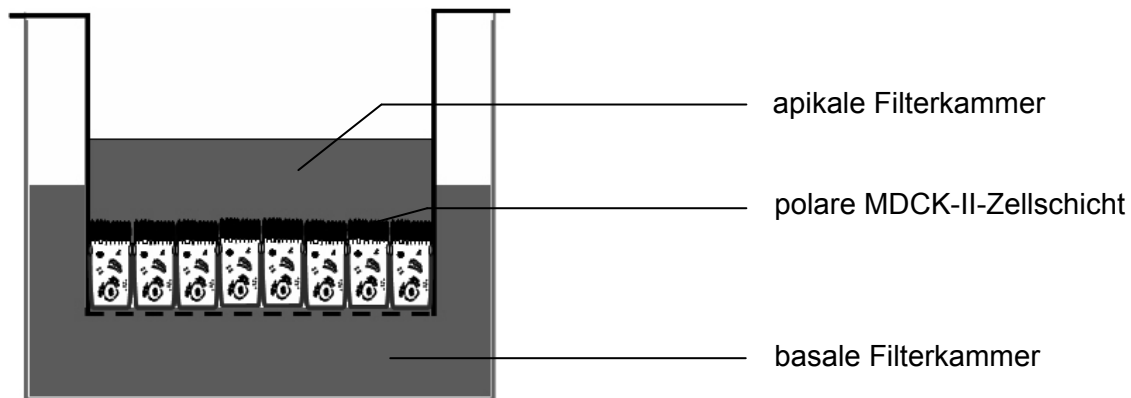


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Membranfiltervorrichtung für die Kultivierung von MDCK-Zellen.

Während der viertägigen Kultivierung der Zellen bildete sich eine polarisierte Epithelzellschicht aus, die durch einen erhöhten transepithelialen elektrischen Widerstand (TER) gekennzeichnet war. Das Maximum dieses TER wurde in der Regel nach vier Tagen erreicht, woraufhin die Expression des jeweiligen Proteins durch Zugabe des Induktors RU486 (10^{-9} M Mifepriston) induziert wurde.

4.3 Biochemische Methoden

4.3.1 Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie

Sterile Deckgläschen wurden in die Kavitäten einer 24-Napf-Platte gelegt und die Zellen in der benötigten Dichte ($0,5 \times 10^5$ – $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml) darauf ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde die Expression des jeweiligen Proteins induziert und in Abhängigkeit von dem jeweiligen Versuch mit verschiedenen Inhibitoren (Konzentration siehe 3.13) inkubiert. Nach den angegebenen Expressionszeiten wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit 3% Paraformaldehyd für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Der Fixierung

folgten drei Waschschr tte und eine f nfmin tliche Inkubation (RT) der Zellen mit 0,1 M Glycin. Zur Färbung von intrazellulären Proteinen wurden die Zellen auf zwei verschiedene Weisen permeabilisiert:

0,2% Triton-X-100 (Plasmamembran)	5 min	RT
Methanol/ Aceton (Plasmamembran+Kernhülle)	1 min	-20 �C

Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit PBSM wurden diese mit dem jeweiligen Primärantikörpern (Verdünnung siehe 3.11) für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen der Zellen folgte eine weitere einst ndige Inkubation mit einem Sekundärantikörper, der mit Rhodamin konjugiert war (Verdünnung siehe 3.11). Die Inkubation fand für 60 min bei Raumtemperatur, im Dunkeln statt, um ein Ausbleichen des Farbstoffes zu verhindern. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBSM und einmal mit destilliertem Wasser gewaschen, um übriggebliebene Salze zu entfernen. Um ein Ausbleichen der Präparate zu verhindern wurden die Zellen mit Mowiol auf einem Objekträger eingedeckelt werden.

Im Falle einer Kultivierung der Zellen auf Transwell-Filterssystemen erfolgte die Permeabilisierung der Filter mit 0,2% Triton-x-100 für 10 min bei RT. Die Färbung der Filter erfolgte wie für Deckgläschen beschrieben.

Durchflusscytometrie

Transgene MDCK-(hF-GFP)- bzw. MDCK-(SeVF-GFP)-Zellen wurden wie in 4.2.4 beschrieben auf 66 mm Transwell Filtersystemen ausgesät. 24, 48 und 72 Stunden nach Induktion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Hilfe von 0,125 % Trypsin abgelöst. Der prozentuale Anteil der GFP-positiven Zellen konnte mittels Beckman-Coulter Epics- XL Cytometer und der Expo 32 ADC Software ermittelt werden.

Zum Nachweis infizierter Zellen erfolgte 24 Stunden nach Infektion eine zehnm n tliche Behandlung der Zellen mit *Accunitase*. Nach Ablösen der Zellen wurden diese mit 0,1% BSA versetzt. Nach dem Pelletieren der Zellen mittels Zentrifugation bei 4000 rpm für 5 min folgte die Inkubation der Zellen mit dem anti-BRSV-FITC Antikörper (1:100) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Aufgrund des direkt gekoppelten Fluorchroms erfolgte die Inkubation der Zellen im Dunkeln. Der Inkubation folgten drei Waschschr tte mit 0,1%igem BSA. Daraufhin wurde die Anzahl der infizierten Zellen im Durchflußcytometer bestimmt.

4.3.2 Translokationsassay von Tachykininrezeptoren in polaren Epithelzellen

Dieser Test wurde dazu verwendet, eine Translokation von Tachykininrezeptoren von der Plasmamembran in das Cytosol nach Aktivierung durch verschiedene Tachykinine

nachzuweisen. Die MDCK-(TACR-1-GFP)-, MDCK-(TACR-2-GFP)- und MDCK-(TACR-3-GFP)-Zellen wurden auf poröse Filtersysteme (\varnothing 24 mm) ausgesät. Nachdem sich eine polarisierte Zellschicht ausgebildet hatte, wurde die Expression des Transgens durch Zugabe von RU496 (10^{-9} M) für 24 Stunden induziert und danach in FKS-freiem Medium kultiviert. Um die Rezeptoren zu aktivieren, wurden unterschiedliche Konzentrationen von synthetischen Tachykininen bzw. konditionierte Überständen von MDCK-(bF-Protein)-Zellen zugegeben. Die Zugabe erfolgte zur apikalen oder basolateralen Plasmamembran. Die Zellen wurden für 15 min bei 37°C inkubiert und daraufhin mit PBSM gewaschen, fixiert und schließlich mit Mowiol eingedeckelt. Die Lokalisation der TACR-GFP-Chimären wurde mit Hilfe des konfokalen Laser-Mikroskops untersucht.

4.3.3 Oberflächenbiotinylierung und Immunpräzipitation der RSV F-Proteine

MDCK-(bF-GFP)- und MDCK-(hF-GFP)-Zellen wurden für vier Tage auf Filtersystemen (\varnothing 24 mm) kultiviert und die Expression des jeweiligen Proteins durch Zugabe des Induktors induziert. Nach 12, 24, 48, 72 Stunden wurden jeweils zwei Filter mit eiskaltem PBS gewaschen und von der apikalen bzw. basolateralen Seite mit je 2 ml der Biotinlösung Sulfo-NHS-LC-Biotin-Lösung (0,5 mg/ml) für 30 min bei 4°C inkubiert und die jeweils andere Plasmamembran mit 2 ml 0,1 M Glycin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen beiderseits mit 0,1 M Glycin gewaschen und noch einmal mit 0,1M Glycin für 15 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 20 min auf Eis mit 600 μ l Lysispuffer (*NP40 Complete*) lysiert, mit Hilfe eines Zellschabers (Greiner) suspendiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach einer Zentrifugation für 30 min bei 14.000 rpm und 4 °C wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 2 μ l des RSV F-Antikörpers (Serotec) sowie 50 μ l ProteinA-Sepharosebeads zugegeben. Der Ansatz wurde über Nacht bei 4°C geschüttelt. Am darauf folgenden Tag wurden die ProteinA-Sepharose für 5 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die ProteinA-Sepharose wurde dreimal mit NP40-Waschpuffer gewaschen und dann mit 50 μ l 2 x SDS Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden für 10 min bei 96°C erhitzt, um die Bindung zwischen der ProteinA-Sepharose und dem präzipitierten Protein aufzulösen. Nach einer erneuten Zentrifugation für 5 min bei 14.000 rpm wurde der Überstand abgenommen und stand für die Western-Blot Analyse zur Verfügung.

4.3.4 Western-Blot

Mit Hilfe der diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese wurden die präzipitierten Proteine aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die Auftrennung erfolgte im Sammelgel bei 80V, im Trenngel bei 120 V. Als Marker wurden vorgefärbte Proteine mit Größen zwischen 14,3 und 220 kDa verwendet.

Nach der Gelelektrophorese wurde das Sammelgel von dem Trenngel getrennt und das Trenngel mit Hilfe des *Semi-Dry-Blot*-Verfahrens (Kyhse-Andersen, 1984) auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Transfer erfolgte bei 0,8 mA/ cm² für 75 min. Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran im Blocking-Reagenz über Nacht bei 4°C inkubiert, um freien Bindungsstellen auf der Membran zu blocken. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal mit PBSM-0,1% Tween für 10 min auf dem Schwenktisch gewaschen. Zum Nachweis der biotinylierten Proteine wurde die Membran mit Streptavidin-Peroxidase (10 µl Streptavidin-Peroxidase in 10 ml PBSM) für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Dieser Inkubation folgten drei weitere Waschschrte mit PBSM-0,1%Tween und die Detektion des gebundenen Peroxidasekomplexes mit einem chemilumineszierenden Substrat (*Super signal*) für fünf Minuten inkubiert und mit Hilfe des Chemi-Imagers (Bio-Rad) analysiert.

4.3.5 Nachweis von Apoptose

Zum Nachweis der Apoptose nach Induktion der F-Protein-Expression oder nach Infektion wurden die Zellen abhängig von dem jeweiligen Versuch in 24-Napfplatten, 6-Napfplatten oder Transwell-Filtersystemen (Ø 66 mm) ausgesät.

Die Zugabe von spezifischen Inhibitoren erfolgte zeitgleich zur Induktion der Proteinexpression in den in 3.13 angegebenen Konzentrationen. Bei den Infektionsversuchen wurden die Inhibitoren 8 Stunden nach erfolgter Infektion zugegeben.

Nachweis ausgestoßener Zellen

Um den Verlust von Epithelzellen nach F-Protein Expression zu messen wurden MDCK-(bF-GFP)-, MDCK-(hF-GFP) oder MDCK-(gp40-GFP)-Zellen auf Filtersystemen (Ø 66 mm) ausgesät (4.2.4). Nach viertägiger Kultivierung wurde die Proteinexpression für 24, 48 und 72 Stunden induziert. Zu dem jeweiligen Zeitpunkt wurden die Überstände abgenommen und die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Kammer bestimmt.

A549-Zellen wurden in 6 Napf-Platten ausgesät und infiziert (siehe 4.4.3). Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden die Überstände abgenommen und die Anzahl der ausgestoßenen Zellen mittels Neubauer-Kammer bestimmt.

Caspase-3/7-Assay (Promega)

Um eine Aktivität der Caspasen-3/7 nachzuweisen, wurden 2×10^5 A549, HEp-2, oder transgene MDCK-Zellen in 24-Napf-Platten ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Infektion der A549 und HEp-2 Zellen (4.4.3). Im Falle der transgenen MDCK-Zelllinien wurde die Expression der Transgene durch Zugabe von 10^{-9} M RU496 induziert. Nach Inkubation der Zellen für 40 Stunden in Anwesenheit oder Abwesenheit von Inhibitoren wurden die adhären Zellen trypsinisiert und mit den Zellen im Überstand auf eine Zellzahl von 2×10^4 Zellen/50 μ l gebracht und in eine weiße 96-Napf-Platte überführt. Zu dieser Zellsuspension wurden 50 μ l des Caspase-Glo-3/7 Substrates gegeben. Die Inkubation der Platte erfolgte bei RT im Dunkeln für 20 min. Daraufhin wurde die Intensität der Lumineszenz mit Hilfe des GeniusPro Microplate Readers (Tecan) gemessen.

CytoTox-ONE™ Homogenous Membrane integrity Assay (Promega)

Zum Nachweis eines Membranintegritätsverlustes wurden die Zellen wie oben beschrieben ausgesät und die Proteinexpression durch Zugabe des Induktors induziert. Nach 48 Stunden wurden 50 μ l des Zellkulturüberstandes in eine schwarze 96-Napf-Platte überführt. Nach Zugabe von 50 μ l des LDH-Substrates (*CytoTox-ONE™ Homogenous Membrane Integrity Assay-Substrate*) wurde die Fluoreszenz bei 560/590 nm gemessen.

DNA-Fragmentierung

Zur Detektion einer DNA-Fragmentierung wurden 2×10^5 Zellen auf Deckgläschen ausgesät. Die Expression des Transgens wurde durch Zugabe des Induktors für 24 und 48 Stunden induziert. Dieser Induktion folgten ein Waschschrift mit PBS und die Fixierung der Zellen mit 3% PFA (siehe 4.3.1). Die fixierten Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und mit 200 μ l DAPI-Lösung (4-6-Diamidino-2-Phenylindol-Di-Hydrochlorid) für 15 min bei 37°C gefärbt. Nach mehrmaligem Waschen der Zellen mit destilliertem Wasser wurden die Zellen mit Mowiol eingedeckelt und im Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

Zur Isolierung der DNA aus MDCK-Zellen wurden 10^5 Zellen/ml 48 Stunden nach Induktion der Expression des Transgens mit Hilfe des DNeasy Tissue Kits (Qiagen) isoliert. Die isolierte DNA wurde daraufhin in einem 1%igem Agarosegel aufgetrennt und durch anschließendes Färben mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

TUNEL-Reaktion

Zum Nachweis von DNA-Brüchen wurden 2×10^5 Zellen auf Deckgläschen ausgesät und die Proteinexpression von MDCK-(hF-GFP)- und MDCK-(hF-GFP)-Zellen am nächsten Tag für 40 h induziert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden diese für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 3%igem PFA fixiert. Zum Permeabilisieren der Zellen wurde

eine 0,2%ige Triton-X-100 Lösung mit 0,1% Citrat versetzt und die Zellen damit für 2 min auf Eis inkubiert. Die Inkubation der Zellen mit dem zuvor angesetzten TUNEL-Substrat, welches Tetramethylrhodamin-dUTPs und die terminale Deoxynucleotidyl Transferase (Roche Diagnostics) enthielt, erfolgte bei 37°C für eine Stunde. Zum Nachweis einer HRSV-Infektion, wurden die Zellen mit Hilfe eines FITC-konjugierten α -BRSV-Antiserums für eine Stunde bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und die DNA mit dem oben beschriebenen DAPI-Reagenz für 15 min bei 37°C gefärbt. Die Zellen wurden mit Mowiol eingedeckelt und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

4.4 Virologische Techniken

4.4.1 Anzucht von HRSV

Für die Vermehrung des HRSV A2-Stammes wurden HBE-Zellen verwendet. Die Zellen ($4,5 \times 10^6$) wurden in einer 25 cm² Zellkulturflasche ausgesät und gleichzeitig mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 1 PFU/Zelle infiziert. Die infizierten Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel und eine Kultivierung für zwei weitere Tage. Um das Virus zu ernten wurde der Zellkulturüberstand abgenommen, mit 0,1 M MgSO₄ und 0,05 M HEPES pH 7,4 (Endkonzentration) versetzt und für 5 min bei 4°C und 1559 x g zentrifugiert, um die Zelltrümmer abzutrennen. Die virushaltigen Zellkulturüberstände wurden aliquotiert (1ml), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und daraufhin bei -80°C gelagert.

4.4.2 Bestimmung des HRSV-Titers im Immunoplaquetest

Auf einer 24 Napf-Platte wurden Vero-Zellen mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen pro Vertiefung ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Zur Bestimmung des Virustiters wurde von der Virussuspension zwei serielle Verdünnungsreihen in 10er Stufen in DMEM angelegt (Doppelansätze). Jeweils 200 μ l der einzelnen Verdünnungsstufen wurden auf die zuvor mit DMEM gewaschenen Zellen gegeben und auf einem Schwenker bei 37°C für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. In jede Vertiefung wurden 1 ml Methylzellulose-Lösung (4g auf 500 ml DMEM + 2% FKS) gegeben. Nach einer dreitägigen Kultivierung wurde die Methylzellulose abgenommen, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für 20 min bei RT mit 3%igem Paraformaldehyd fixiert. Um Rest von Paraformaldehyd zu entfernen, wurden die Zellen noch zweimal mit 0,1 M Glycin gewaschen. Die Permeabilisierung der Zellen wurde mit 0,2% Triton-X-100 für 5 min bei RT durchgeführt und die Zellen anschließend mit einem Antikörper gegen das RSV Matrix-Protein (mAb 18G6) inkubiert. Dafür wurde der Antikörper 1:25 verdünnt und 200 μ l pro

Vertiefung eingesetzt. Nach der einstündigen Inkubation wurde die Antikörperlösung abgenommen und die Zellen mit PBSM gewaschen. Anschließend wurde der Sekundärantikörper (Kaninchen α -Maus-HRP) 1:500 verdünnt und mit den Zellen inkubiert für eine Stunde inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden 200 μ l AEC-Substrat zu den Zellen gegeben und 10-15 min inkubiert. Die Platten wurden zweimal mit Leitungswasser gewaschen und die Plaques unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Der Virustiter wurde in *plaque forming units* (Plaque-bildende Einheiten) pro ml (PFU/ml) angegeben.

5. Ergebnisse

5.1 Lokalisationsstudien der Tachykininrezeptoren 1-3 (TACR1-3)

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das aus dem bovinen RSV F-Protein freigesetzte Virokinin zu einer Aktivierung der Tachykininrezeptoren-1 und -3 führt (Zimmer *et al.*, 2003). Um nun eine Aussage darüber treffen zu können, ob das Virokinin in polarisierten Epithelzellen, den Zielzellen einer RSV-Infektion, autokrin oder parakrin wirken kann, sollte einerseits die Lokalisation der drei Rezeptorsubtypen und andererseits die Sekretion des Virokinins in polaren Epithelzellen analysiert werden. Für diese Untersuchungen wurden MDCK-II-Zellen verwendet, eine Nierenepithel-Zelllinie, die ein gut charakterisiertes und häufig verwendetes Modell für die Polarität von Epithelzellen darstellt. Die Plasmamembran von Epithelzellen ist in eine apikale und eine basolaterale Domäne gegliedert, die sich in ihrer Protein- und Lipidzusammensetzung unterscheiden. Die sogenannten „Tight junctions“ verhindern die laterale Diffusion und somit den Austausch von Molekülen der apikalen und basolaterale Plasmamembran. Wenn die Zellen auf porösen Filtersystemen kultiviert werden, sind sie in der Lage, Nährstoffe über die basolaterale Membran aufzunehmen, wie es auch unter physiologischen Bedingungen im Organismus der Fall ist. Um die Lokalisation der Tachykininrezeptoren in polaren MDCK-Zellen zu studieren, wurden transgene MDCK-Zelllinien hergestellt, die jeweils einen der Tachykininrezeptoren induzierbar exprimierten. Die transgenen MDCK-Zellklone wurden auf porösen Filtermembranen für vier Tage kultiviert, bis sie einen polarisierten Zellrasen mit einem hohen elektrischen Widerstand ausgebildet hatten. Dann erfolgte die Induktion der Expression der Proteine für 24 Stunden durch Zugabe des Induktors *RU486* (Mifepriston). Die Induktion erfolgte in Abwesenheit von fötalem Kälberserum (FKS), um eine Aktivierung der Rezeptoren durch zelluläre Tachykinine zu vermeiden. Die Verteilung der Rezeptoren in polaren Epithelzellen wurde mittels konfokaler Laser-Mikroskopie analysiert. Die Aufnahme durch die Zellmitte in der XY-Ebene wies bei allen Tachykininrezeptorsubtypen ein ähnliches Verteilungsmuster in der Zelle auf (Abbildung 7). Die Rezeptorsubtypen waren an der Plasmamembran lokalisiert, wobei die wabenförmige Verteilung der Rezeptoren auf eine basolaterale Lokalisation hindeutete. Der TACR-1-Subtyp wies zudem Vesikel in der Nähe der Plasmamembran auf, welche sowohl Synthese- als auch Endozytosevesikel darstellen könnten.

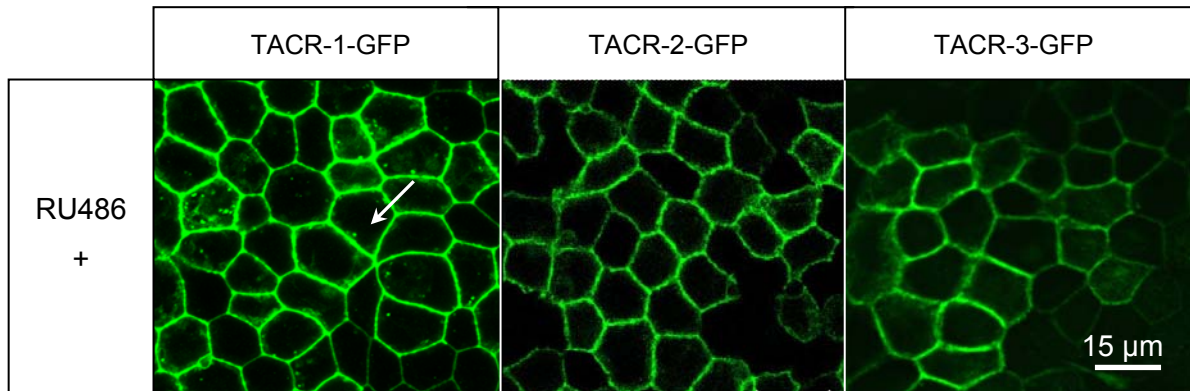


Abbildung 7: Verteilung der Tachykininrezeptoren in polaren MDCK-II-Zellen

Die Kultivierung der MDCK-(TACR1-GFP)-; MDCK-(TACR-2-GFP)- und MDCK-(TACR-3-GFP)-Zellen erfolgte auf porösen Filtersystemen. Nach 24-stündiger Induktion der Expression wurden die Rezeptoren mittels konfokaler Laser-Mikroskopie analysiert, wobei der GFP-Anteil als Nachweis verwendet wurde. (Aufsicht: XY-Ebene)

Um die Verteilung der Rezeptoren zwischen der apikalen und basolateralen Plasmamembran beurteilen zu können, wurden Querschnitte (XZ-Ebene) der jeweiligen Präparate mittels konfokaler Laser-Mikroskopie erstellt.

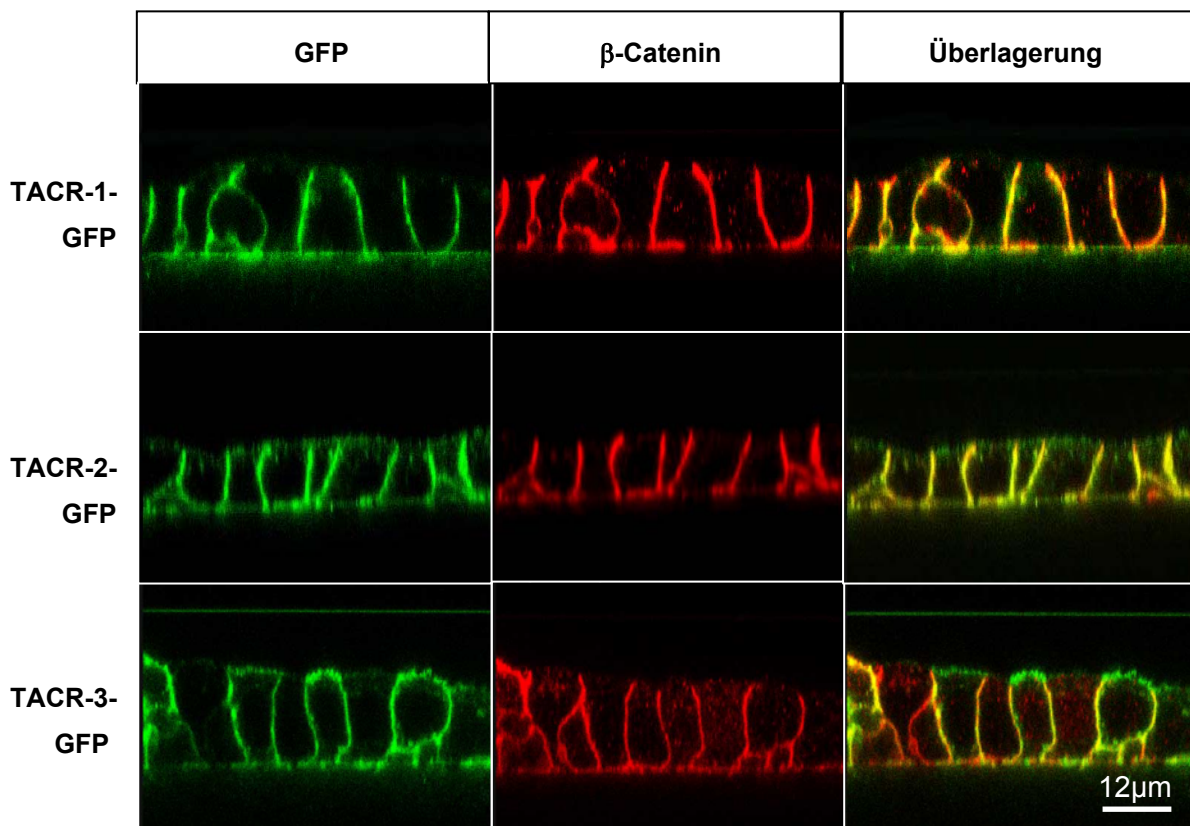


Abbildung 8: Verteilung der Tachykininrezeptorsubtypen zwischen der apikalen und basolateralen Plasmamembran polarisierter MDCK-Zellen.

Die Analyse der Tachykininrezeptorsubtypen in der XZ-Ebene zeigte eine vorwiegend basolaterale Verteilung der Rezeptoren (Abbildung 8). Zum Vergleich wurde das zelluläre Protein β -Catenin, welches mit der lateralen Membran assoziiert ist, mit einem monoklonalen Antikörper nachgewiesen (Hinck *et al.*, 1994a; Hinck *et al.*, 1994b). Im Gegensatz zu den Rezeptorsubtypen TACR-1 und -2, war der TACR-3 auch an der apikalen Plasmamembran nachweisbar.

5.2 Aktivierung der Tachykininrezeptoren durch basolaterale Zugabe der Tachykinine

Die Bindung eines Liganden führt zu einer Änderung in der subzellulären Lokalisation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und anderer, in der Signaltransduktion involvierter Proteine. Zunächst kommt es zu einer Aktivierung von cytosolischen G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen (GRKs), welche Aminosäure-Reste in der cytosolischen Domäne phosphorylieren. Daraufhin bindet β -Arrestin an den phosphorylierten Rezeptor und führt zu einer Entkopplung von Rezeptor und G-Proteinen (Ferguson *et al.*, 1996; Ferguson, 2001). Zudem veranlasst β -Arrestin die Rekrutierung von Clathrin und AP-2, woraufhin der Rezeptorkomplex internalisiert wird.

Um eine Aussage über die Aktivierbarkeit der Rezeptoren gegenüber einer basolateralen oder apikalen Zugabe des entsprechenden Tachykinins zu treffen, wurden die in 5.1 beschriebenen Zelllinien für ein Translokationsexperiment verwendet. Die Zellen wurden auf porösen Filtersystemen kultiviert und nach Expression des Rezeptors für 24 Stunden in Abwesenheit von FKS, für 15 Minuten mit dem entsprechenden Tachykinin inkubiert. Eine Translokation des Rezeptors konnte mit Hilfe des an den C-Terminus fusionierten GFPs im Laser-Mikroskop nachgewiesen werden (Abbildung 9). Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass nach Zugabe des entsprechenden Tachykinins zum basolateralen Medium der Rezeptor internalisiert wurde, also eine Aktivierung stattgefunden hatte (C, F, I). Nach Zugabe des Tachykinins zum apikalen Medium wurde ebenso wie bei unbehandelten Zellen keine Veränderung der Rezeptor-Lokalisation beobachtet (B, E, H; A, D, G). Diese Versuche verdeutlichen, dass – in Übereinstimmung mit der basolateralen Lokalisation der Tachykininrezeptoren – eine Aktivierung in polarisierten Epithelzellen nur von der basolateralen Plasmamembran möglich ist.

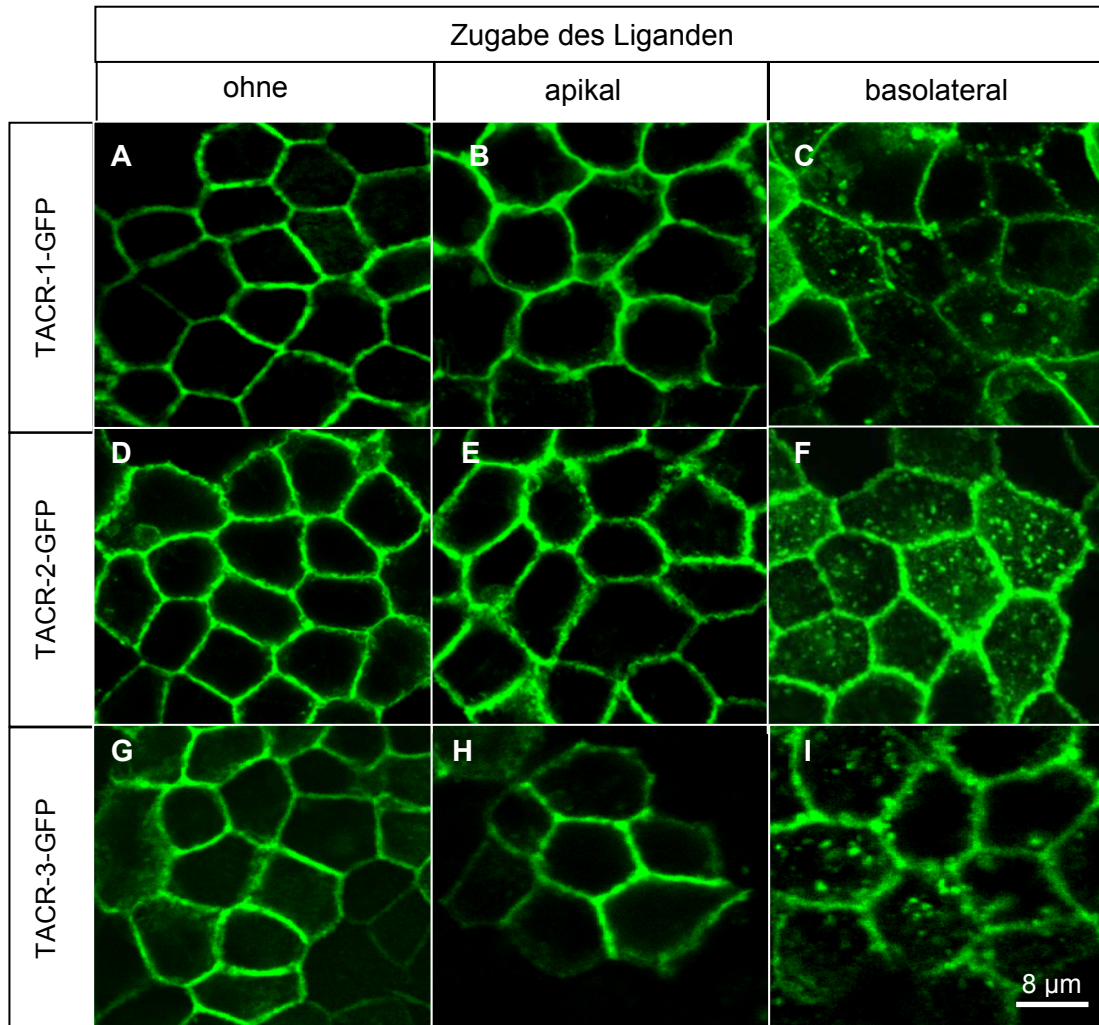


Abbildung 9: Basolaterale Aktivierung der Tachykininrezeptoren. Die auf porösen Filtersystemen kultivierten MDCK-(TACR-1-GFP)-, MDCK-(TACR-2-GFP) und MDCK-(TACR-3-GFP)-Zellen wurden für 24 Stunden mit dem Induktor RU486 inkubiert. Anschließend wurden die entsprechenden Liganden (10^{-9} M) zum apikalen (B, E und H) oder basolateralen (C, F und I) Medium gegeben und die Zellen nach 15 Minuten bei 37°C fixiert. Substanz P (B, C), Neurokinin A (E, F), Neurokinin B (H-I).

5.3 Expression des bovinen F-Proteins in polarisierten Epithelzellen

Virokinin ist ein proteolytisches Spaltprodukt, das während der Reifung des BRSV F-Proteins im Trans-Golgi-Netzwerk freigesetzt wird (Zimmer *et al.*, 2003). Um die Sekretion und Wirkungsweise von Virokinin in polarisierten Epithelzellen zu studieren, wurde eine transgene MDCK-Zelllinie hergestellt, welche das bovine RSV F-Protein induzierbar exprimiert. Zu diesem Zweck wurde ein synthetisches F-Gen verwendet, das an die Codonnutzung höherer Säugetiere angepasst war. Kryptische Spleißstellen wurden so deletiert und eine frühzeitige Termination verhindert. Wie im Falle der Tachykininrezeptoren wurde ein induzierbares Expressionssystem verwendet. Zur Überprüfung der induzierbaren

Expression wurden die MDCK-(bF-GFP)-Zellen für vier Tage auf porösen Filtersystemen kultiviert, bevor die Expression des BRSV F-Proteins mit Hilfe des Induktors angeschaltet und sowohl mittels Fluoreszenzmikroskopie als auch mittels Immunpräzipitation analysiert wurde. Die Markierung der Proteine an der Zelloberfläche mit Hilfe eines Biotinylierungsreagenzes zeigte, dass das F-Protein an die Plasmamembran transportiert worden war (Abbildung 10).

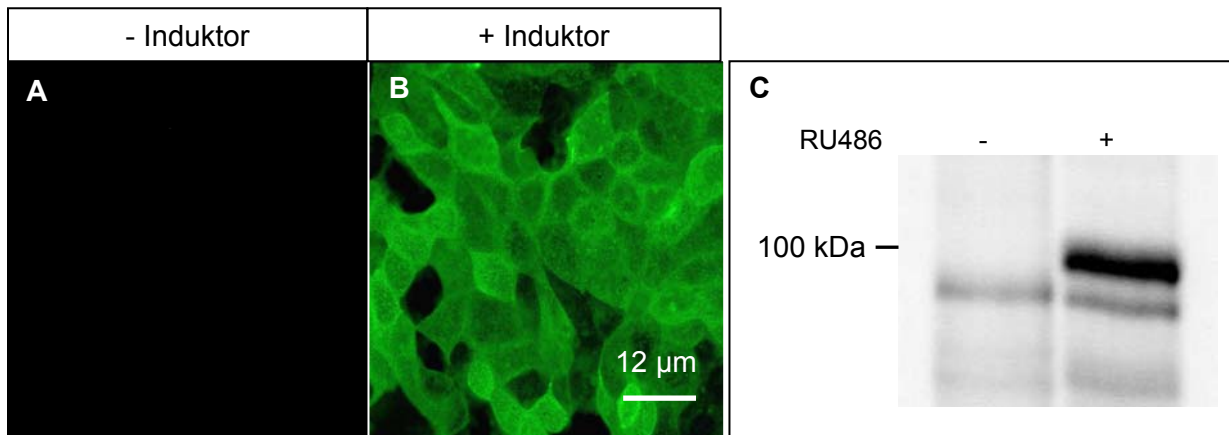


Abbildung 10: Induzierbare Expression des bovinen RSV F-Proteins in polarisierten MDCK-Zellen. Der Nachweis einer bF-GFP Expression erfolgte 24 Stunden nach Zugabe des Induktors RU486 mittels Fluoreszenzmikroskopie (B) und Oberflächenbiotinylierung (C). Die immunpräzipitierten F-Proteine wurden unter nicht reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde die Biotinylierung unter Verwendung von Streptavidin-Peroxidase nachgewiesen. Als Kontrolle dienten MDCK-(bF-GFP)-Zellen, die keinen Induktor erhalten hatten (A, C).

Die relative Größe unter nicht reduzierenden Bedingungen von 100 kDa entspricht der erwarteten Größe des chimären Proteins F-GFP mit dem F-Protein-Anteil von 72 kDa und dem GFP-Anteil von 27 kDa. In Abwesenheit des Induktors RU486 konnte das F-Protein nicht nachgewiesen werden, was sowohl in der Immunfluoreszenz (A), als auch in der Oberflächenbiotinylierung (C) deutlich wird. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Verwendung des pGene/pswitch Systems (Invitrogen) eine induzierbare Expression des F-Proteins ermöglicht, die in Abwesenheit des Induktors zu keiner Expression führt.

5.4 Sekretion von Virokinin in polarisierten MDCK-Zellen

Die MDCK-(bF-GFP)-Zelllinie konnte nun dazu verwendet werden, um die Sekretion von Virokinin zu untersuchen. Die Bestimmung der Menge an sezerniertem Virokinin im apikalen und basolateralen Überstand von polarisierten, auf filterkultivierten MDCK-(bF-GFP)-Zellen erfolgte mit Hilfe eines kompetitivem ELISA. Hierbei kompetitiert synthetisches, biotinyliertes Virokinin („Tracer“) mit dem, im Überstand vorhandenen, nativen Virokinin um die Bindung

an einen immobilisierten polyklonalen α -Virokinin-Antikörper. Dieser Antikörper erkennt nur die reife, biologisch aktive Form des Virokinins (Zimmer *et al.*, 2003).

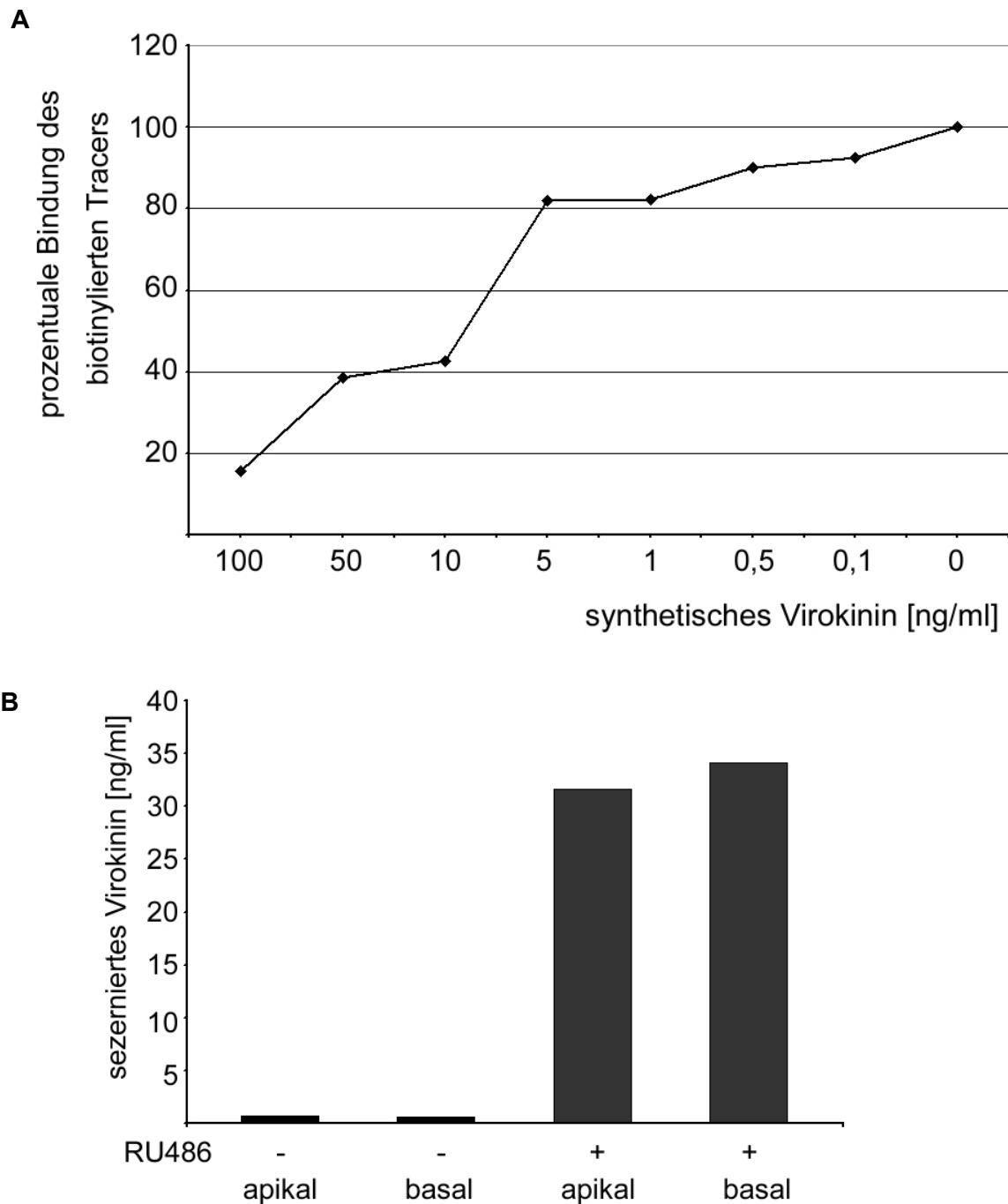


Abbildung 11: Ungerichtete Sekretion des Virokinin in MDCK-Zellen. ELISA-Platten wurden über Nacht (4°C) mit 10 μ g/ml α -Kaninchen Antikörper gekoppelt. Nach Blocken freier Stellen mit 1% BSA (4°C) folgte die Inkubation der Näpfe mit einem spezifischen, polyklonalen anti-Virokinin Antikörper (1:100; 4°C) für 1 Stunde. Die Generierung der Standardkurve erfolgte mit Hilfe unterschiedlichen Konzentrationen (100, 50, 10, 5, 1, 0,5, 0,1 ng/ml) des Tracers (A). Die verwendeten MDCK-(bF-GFP)-Überstände wurden konzentriert eingesetzt. Die Werte stellen Mittelwerte zweier unabhängiger Experimente dar (B).

Anhand der Standardkurve, die mit Hilfe von synthetischem Virokinin erstellt wurde (Abbildung 11 A), konnte die Konzentration an sezerniertem Virokinin im Überstand von MDCK-(bF-GFP)-Zellen ermittelt werden (Abbildung 11 B). Dabei stellte sich heraus, dass Virokinin zu etwa gleichen Anteilen im apikalen und im basolateralen Überstand vorhanden war. Diese Gleichverteilung deutet auf eine ungerichtete Sekretion von Virokinin hin. Allerdings müssen apikal lokalisierte, zelluläre Proteasen noch berücksichtigt werden, die Tachykinine spalten können. Aus dem durchgeführten kompetitiven ELISA wird ersichtlich, dass die ungerichtete Sekretion des Virokinins eine Aktivierung basolateral lokalisierter Tachykininrezeptoren in polaren Epithelzellen prinzipiell ermöglicht.

Um die biologische Aktivität des sezernierten Virokinins ebenfalls mit Hilfe des in 5.2 beschriebenen Translokationsversuches zu untersuchen, wurden MDCK-(TACR-1-GFP)-Zellen auf Filtersystemen kultiviert und 24 Stunden nach Induktion des Rezeptors basolateral mit den apikalen bzw. basolateralen Überständen von MDCK-(bF-GFP)-Zellen inkubiert. Die Internalisierung des Rezeptors wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht (Abbildung 12).

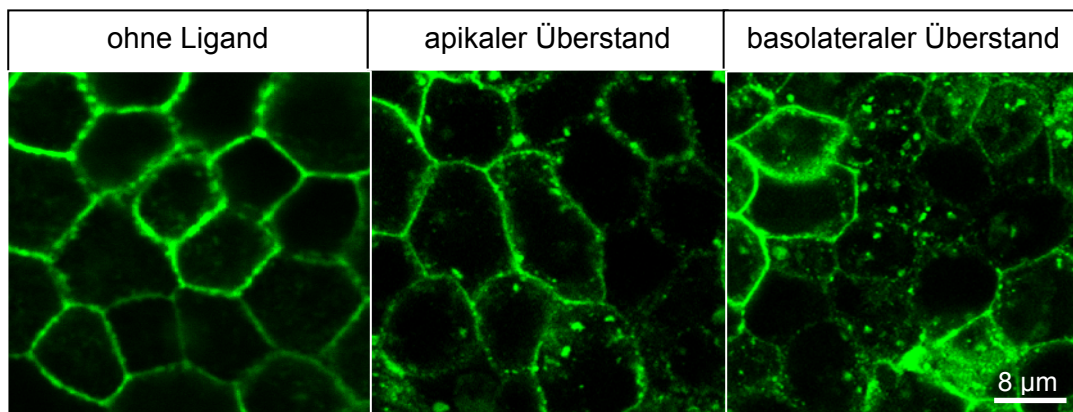


Abbildung 12: Nachweis von aktivem Virokinin im apikalen und basolateralen Medium polarisierter MDCK-(bF-GFP)-Zellen. Nach viertägiger Kultivierung von MDCK-(TACR-1-GFP)-Zellen wurden diese für 24 Stunden mit RU486 inkubiert. Daraufhin erfolgte die basolaterale Zugabe der apikalen (A) und basolateralen (B) Überstände, die von induzierten MDCK-(bF-GFP)-Zellen gewonnen worden waren. Nach fünfzehnminütiger Inkubation der Zellen bei 37°C erfolgten die Fixierung der Zellen mit 3 % PFA und der Nachweis der Translokation mittels Laser-Mikroskopie.

Die Zugabe sowohl von apikalem als auch von basolateralem konditioniertem Überstand zu MDCK-(TACR-1-GFP)-Zellen führte zur Internalisierung von TACR-1-GFP. In unbehandelten Zellen war keine Internalisierung des Rezeptors zu beobachten. Dieses Translokationsexperiment bestätigte, dass biologisch aktives Virokinin in polarisierten MDCK-Zellen ungerichtet sezerniert wird.

5.5 Transkriptionelle Aktivierung durch Virokinin

Die Bindung eines Liganden an Tachykininrezeptoren führt zur Aktivierung verschiedener Signalwege (DeFea *et al.*, 2000b; Dery *et al.*, 2001; Luttrell *et al.*, 1995). Hierbei spielen die, an den Rezeptor gekoppelten, heterotrimeren G-Proteine eine entscheidende Rolle. Bis heute sind verschiedene G-Protein-Subtypen bekannt. Die α -Untereinheiten können sowohl stimulierend (α_s) als auch inhibierend (α_i) auf ihre Effektorproteine wirken. Die α_s -Untereinheit führt zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase, die ATP zu cAMP umwandelt. Dieser „Second messenger“ führt wiederum zur Aktivierung der Proteinkinase A, eine Serin/Threonin-Proteinkinase, die im Zellkern den Transkriptionsfaktor CREB (*cAMP response element-binding protein*) phosphorylieren und aktivieren kann. Aktiviertes CREB bindet an die entsprechende Promotorregion (CRE; *cAMP response element*) und stimuliert so die Transkription bestimmter Gene.

Zur Analyse der durch das Virokinin aktivierten Signalwege wurden Reporterexperimente durchgeführt. Hierbei wurde das Gen der sezernierten alkalischen Phosphatase (SEAP) unter Kontrolle verschiedener cis-aktiver Elemente verwendet. Da MDCK-Zellen mit nur geringer Effizienz transfiziert werden konnten, wurden BHK-21-Zellen mit dem jeweiligen Reporter gen und dem aus der Ratte stammenden Tachykininrezeptorsubtyp-1 (rTACR-1) transfiziert. Am folgenden Tag wurden die Zellen für weitere 24 Stunden mit synthetischem Virokinin (10^{-9} M) inkubiert. Die Aktivität der SEAP im Überstand der transfizierten Zellen wurde mit Hilfe eines fluoreszierenden Substrates bestimmt (Abbildung 13).

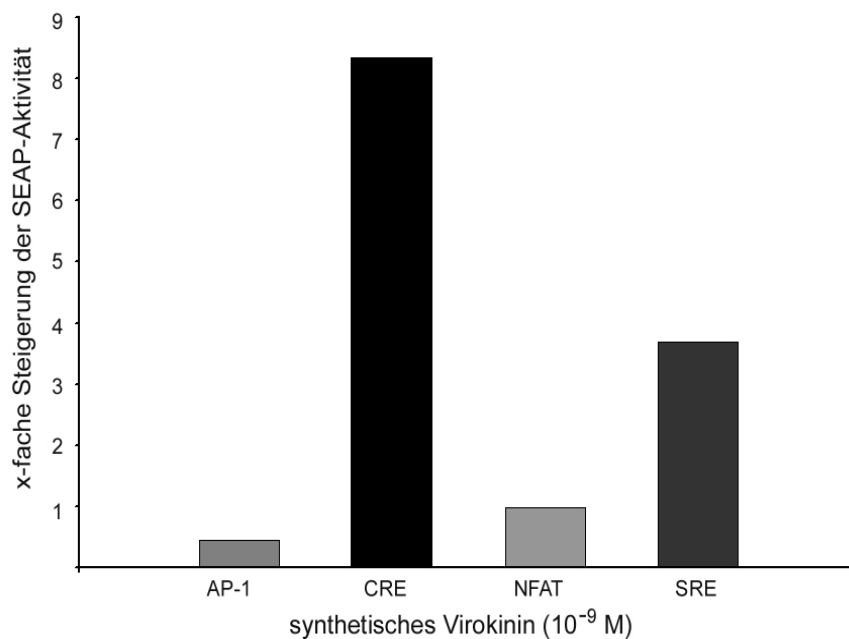


Abbildung 13: CRE-Reporter genaktivität nach Aktivierung des TACR-1 durch synthetisches Virokinin. Nach transienter Transfektion von BHK-21-Zellen mit rTACR-1 und dem Reporter gen SEAP unter der Kontrolle verschiedener *cis*-aktiver-Elemente (AP-1, CRE, NFAT, SRE) wurden die

Zellen gewaschen und mit 10^{-9} M synthetischem Virokinin bei 37°C inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die SEAP-Aktivität im Überstand der Zellen bestimmt und die Steigerung der Aktivität in Bezug auf unbehandelte Zellen ermittelt.

Das synthetisch hergestellte Peptidhormon ist im Unterschied zu nativem Virokinin, welches nach Infektion oder stabiler Expression des F-Proteins sezerniert wird, nicht glykosyliert. Um nun die Aktivität des, in den Überstand sezernierten Virokinins zu untersuchen, wurden BHK-21-Zellen mit rTACR-1 sowie dem CRE-Reportergen transfiziert und mit konditioniertem Zellkulturüberstand behandelt, der von induzierten MDCK-(bF-GFP)-Zellen gewonnen worden war. Als Kontrolle dienten Substanz P und synthetisches Virokinin in den Konzentrationen 10^{-8} , 10^{-10} und 10^{-12} M. Anschließend wurde die SEAP-Aktivität im Überstand der behandelten Zellen gemessen (Abbildung 14).

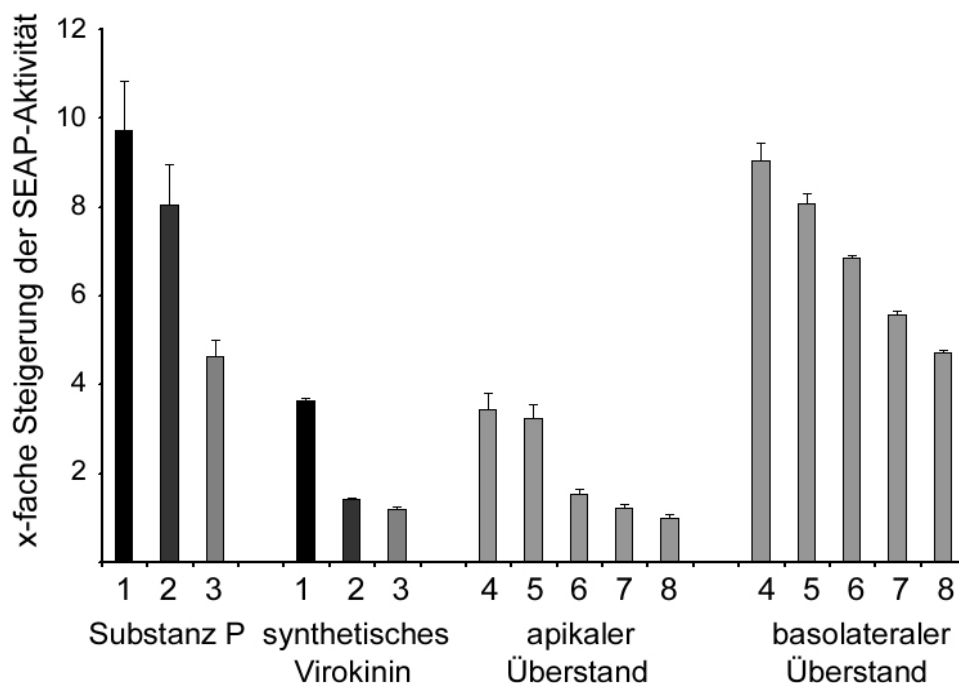


Abbildung 14: Transkriptionelle Aktivierung des „cAMP response element“ durch konditionierten Überstand von MDCK-(bF-GFP)-Zellen. BHK21-Zellen wurden mit dem Reportergen CRE-SEAP und dem rTACR1 transfiziert und für 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Tachykininen inkubiert. Die SEAP-Aktivität wurde mit Hilfe eines fluoreszierenden Substrates bestimmt. Die Mittelwerte von zwei unabhängigen Messungen sind dargestellt. 1 = 10^{-8} M, 2 = 10^{-10} M, 3 = 10^{-12} M, 4 = konzentriert, 5 = 1:10, Verdünnung, 6 = 1:100, 7 = 1:1000, 8 = 1:10000

Die CRE-abhängige Aktivierung des Reportergens zeigte eine Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration des jeweiligen Tachykinins. Bereits geringe Mengen führten zu einer deutlichen Steigerung der SEAP-Aktivität (10^{-12} M: etwa 4-fach). Eine Erhöhung der Konzentration um das 100fache führte jedoch nicht zu einer 100fachen Steigerung der SEAP-Aktivität, d.h. die Abhängigkeit folgte keinem linearen Verlauf. Ein ähnliches Ergebnis

zeigte sich nach der Behandlung von rTACR1-exprimierenden BHK-21-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an synthetischem Virokinin. Die Inkubation des Rezeptors mit apikalem MDCK-Überstand resultierte in einer vergleichbaren Aktivierung, wie sie mit synthetischem Virokinin erzielt wurden. Die Behandlung der Zellen mit konditioniertem, basalem Überstand zeigte dagegen eine verstärkte Aktivierung der CRE-abhängigen Transkription. Auch im Fall der konditionierten Überstände war die Konzentration an SEAP abhängig von der Verdünnung des konditionierten Überstandes. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Virokinin in polarisierten Epithelzellen bidirektional sezerniert wird. Allerdings scheint mit dem basolateralen Virokinin eine höhere biologische Aktivität verbunden zu sein.

5.6 Polare Verteilung des RSV F-Proteins in MDCK-Zellen

RSV infiziert das Lungenepithel über die apikale Domäne und wird zudem von der apikalen Plasmamembran in das Lumen freigesetzt (Brock *et al.*, 2003; Roberts *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2002). Um nicht nur die Sekretion von Virokinin zu untersuchen, sondern auch die Lokalisation des F-Proteins in polarisierten Epithelzellen in Abwesenheit anderer viraler Proteine zu analysieren wurde die Lokalisation sowohl des bovinen RSV F-Protein als auch des verwandten humanen RSV F-Protein in den transgenen MDCK-Zellen untersucht. Als Kontrolle diente das zelluläre gp40, ein Membranprotein vom Typ I, welches vorwiegend an der apikalen Plasmamembran polarisierter Epithelzellen vorliegt (Zimmer *et al.*, 1997). Um den Nachweis der drei Proteine zu erleichtern, wurde die jeweilige cytoplasmatische Domäne mit GFP modifiziert. Die Zellen wurden für vier Tage auf porösen Filtersystemen kultiviert und die Zellen 12, 24, 48 und 72 Stunden nach Zugabe des Induktors (RU486) fixiert. Daraufhin wurden die Zellen mit einem monoklonalen β -Catenin-Antikörper gefärbt und die Fluoreszenz im konfokalen Laser-Mikroskop analysiert (Abbildung 15). Das bovine RSV F-Protein (bF-GFP) wurde nach 12 und 24 Stunden hauptsächlich an der apikalen Plasmamembran nachgewiesen (A, B) werden. Jedoch lagen geringe Mengen des Proteins bereits zu diesen Zeitpunkten an der basolateralen Membran vor. Nach 48 Stunden war die Polarität der Zellen deutlich beeinträchtigt (C). Das bovine RSV F-Protein war nun auch in größeren Mengen an der basolateralen Membran nachweisbar, was zu einer Kollokalisierung mit dem lateralen Markerprotein β -Catenin führte. Zudem konnte beobachtet werden, dass Zellen aus dem Zellverband ausgestoßen wurden (Pfeil). Nach 72 Stunden waren die Zellen deutlich abgeflacht und hatten ihre Polarität verloren. Nur noch geringe Mengen an GFP-positiven Zellen konnten auf den Filter nachgewiesen werden (D). Das humane RSV F-Protein wies ebenfalls eine vorwiegend apikale Lokalisation nach 12 und 24 Stunden auf (E, F). Eine längere Expressionszeit führte aber auch hier zu einer deutlichen Veränderung der Zellmorphologie, obwohl dieser Effekt im Vergleich zum bovinen RSV F-Protein zeitlich

verzögert war (G, H). Die bei dem bovinen und humanen RSV F-Protein beobachteten cytopathischen Effekte konnten zu keinem Zeitpunkt in der Kontrollzelllinie MDCK-(gp40-GFP) festgestellt werden (I-L). Sowohl die apikale Lokalisation des Kontrollproteins als auch die laterale Verteilung des zellulären β -Catenins war auch noch 72 Stunden nach Zugabe des Induktors vorhanden. Die Expression des humanen RSV F-Proteins in humanen Lungenepithelzellen (Calu3) hatte im Gegensatz zu der transgenen MDCK-Zelllinie deutlich geringere cytopathogene Effekte zur Folge. Nur 48 Stunden nach Induktion der F-Expression konnte eine geringfügige Veränderung der Zellmorphologie beobachtet werden. Die apikale Lokalisation bestand jedoch auch zu diesem Zeitpunkt weiter. Die kurzzeitige Veränderung der Zellmorphologie konnte 72 Stunden nach Induktion der Expression nicht mehr nachgewiesen werden.

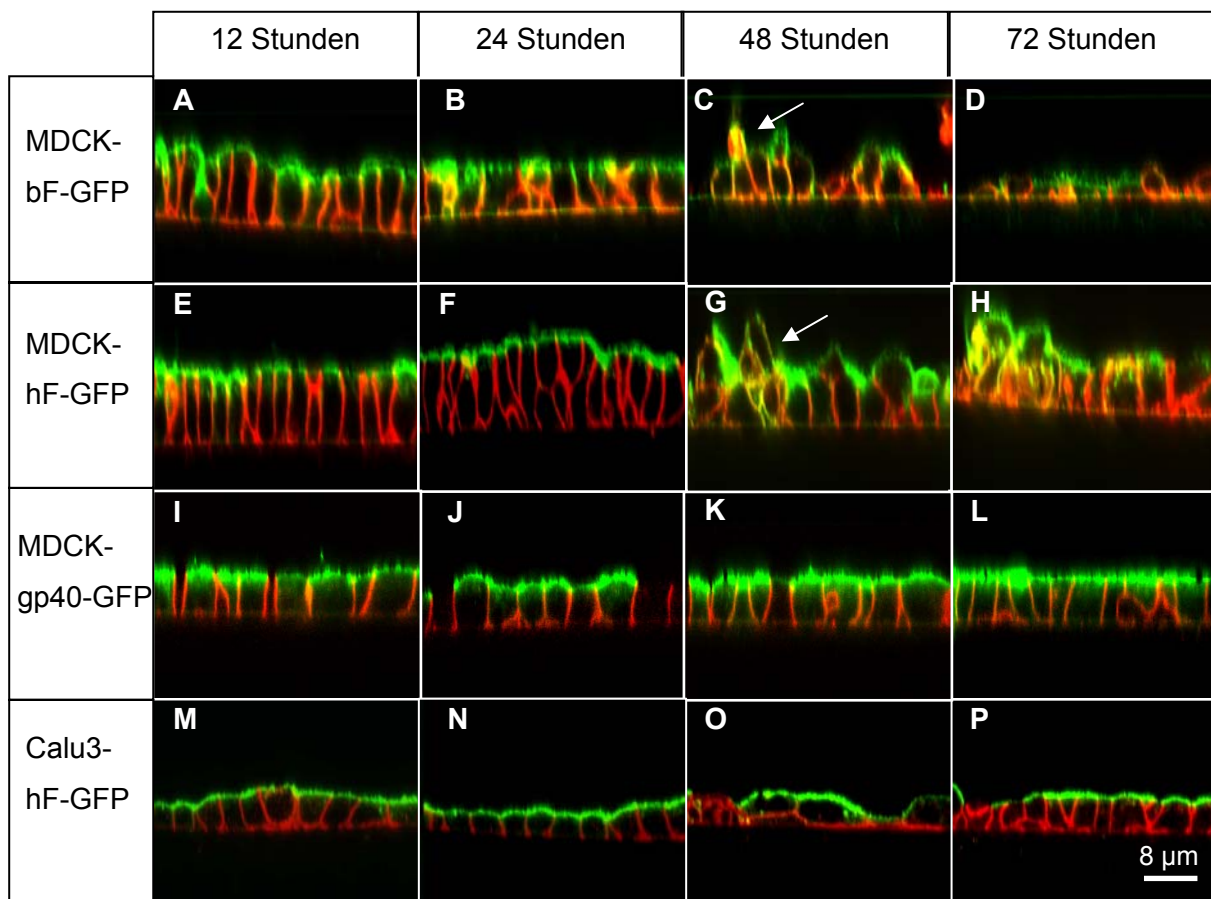


Abbildung 15: Verlust der Polarität nach anhaltender Expression des F-Proteins in polarisierten MDCK-Zellen. Die Kultivierung von MDCK-(bF-GFP)-, MDCK-(hF-GFP)-, MDCK-(gp40-GFP) und Calu3-(hF-GFP)-Zelllinien erfolgte für vier Tage auf porösen Filtersystemen. Nach Zugabe des Induktors RU486 (10^{-9} M) wurden die Filter jeweils nach 12, 24, 48 und 72 Stunden fixiert, permeabilisiert und mit einem monoklonalen anti- β -Catenin Antikörper gefärbt (rot). Der Nachweis der Transgene erfolgte mit Hilfe von GFP an der cytoplasmatischen Domäne der Membranproteine.

Um die überwiegend apikale Lokalisation des F-Proteins mit einem anderen experimentellen Ansatz zu bestätigen, wurde eine Oberflächenbiotinylierung der polarisierten MDCK-(bF-GFP)- und MDCK-(hF-GFP)-Zellen durchgeführt. Hierfür wurden die apikalen bzw. basolateralen Proteine der Zellschicht 12, 24, 48 und 72 Stunden nach Induktion mit einem membranimpermeablen Biotinderivat markiert. Anschließend wurde das F-Protein immunpräzipitiert und die Biotingruppen im Western Blot unter Verwendung eines Streptavidin-Peroxidase-Komplexes nachgewiesen (Abbildung 16). Die relative Verteilung des F-Proteins an der apikalen bzw. basolateralen Plasmamembran wurde mit Hilfe des QuantifyOne-Programms ermittelt.

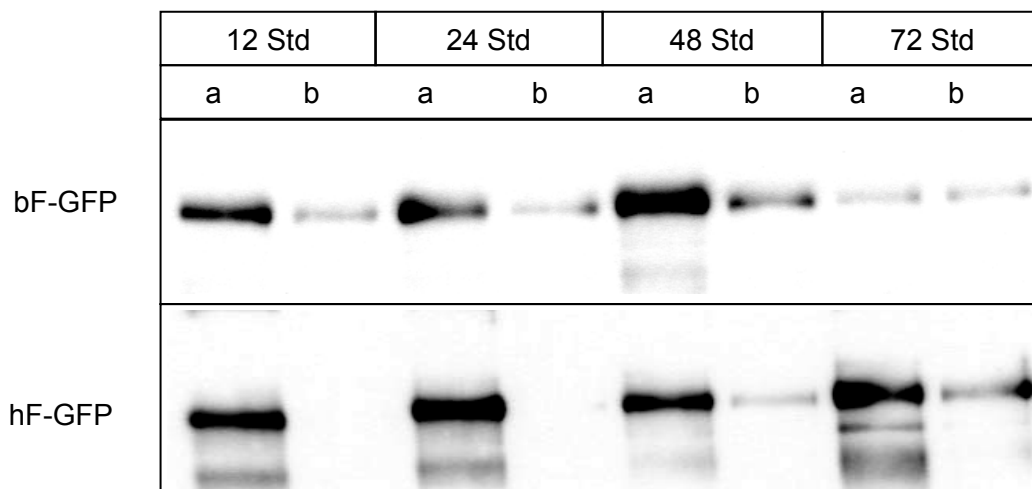


Abbildung 16: Oberflächenbiotinylierung und anschließende Immunpräzipitation der RSV F-Proteine. MDCK-(bF-GFP)- und MDCK-(hF-GFP)-Zellen wurden auf porösen Filtern für vier Tage kultiviert und die apikale Plasmamembran oder basolaterale Plasmamembran 12, 24, 48 und 72 Stunden nach Zugabe des Induktors biotinyliert. Nach Immunpräzipitation der biotinylierten F-Proteine mit Hilfe eines monoklonalem Antikörpers wurden die Proben im SDS-Gel aufgetrennt und die Biotingruppen mit einem Streptavidin-Peroxidase-Komplex im Western Blot nachgewiesen.

Sowohl das BRSV F-Protein, als auch das HRSV F-Protein konnten bereits 12 Stunden nach Induktion der Expression an der apikalen Plasmamembran nachgewiesen werden. Zudem waren geringe Mengen (10 Prozent) des BRSV F-Proteins ebenfalls an der basolateralen Membran lokalisiert. Nach 24 Stunden lag das BRSV F-Proteins bereits zu 13 Prozent an der basolateralen Plasmamembran vor. Das HRSV F-Protein war zu diesem Zeitpunkt ausschließlich an der apikalen Membran nachweisbar. Nach 48 Stunden lagen 32 Prozent des BRSV F-Proteins, sowie fünf Prozent des HRSV F-Proteins an der basolateralen Plasmamembran vor. Die Gesamtmenge an nachweisbarem BRSV F-Protein war nach 72 Stunden signifikant reduziert. Zudem war zu diesem Zeitpunkt das Protein zwischen der apikalen und basolateralen Plasmamembran gleich verteilt. Beim HRSV F-Protein lagen zu diesem Zeitpunkt 35 Prozent an der basolateralen Plasmamembran vor. Diese Ergebnisse

lassen mehrere Schlussfolgerungen zu. Das F-Protein wird autonom, d.h. ohne die Hilfe anderer viraler Proteine, zur apikalen Plasmamembran transportiert. Diese Eigenschaft ist bei dem BRSV F-Protein weniger stark ausgebildet, da bereits zu Beginn geringe Mengen an der basolateralen Membran nachweisbar waren. Die zunächst asymmetrische Verteilung der F-Proteine geht mit der Zeit verloren, was auf einen Polaritätsverlust hinweist. Die cytopathogenen Eigenschaften des F-Proteins sind nicht in allen Zelltypen so ausgeprägt wie in MDCK-Zellen, wie es die Calu3-Zelllinie zeigte.

5.7 Verlust des transepithelialen Widerstandes nach anhaltender F-Protein Expression

Ein polarisiertes Epithel zeichnet sich durch einen erhöhten transepithelialen elektrischen Widerstand (TER) zwischen der apikalen und basolateralen Kammer aus. Ein Polaritätsverlust sollte sich also in einer Veränderung des TER bemerkbar machen. Zur Untersuchung des TER wurden MDCK-(bF-GFP)-, MDCK-(hF-GFP)- und MDCK-(gp40-GFP)-Zellen auf porösen Filtersystemen ausgesät. Nach dem Aussäen der Zellen stieg der Widerstand kontinuierlich bis zum Erreichen eines konstanten Werts an (Abbildung 17). In Abwesenheit des Induktors und in der RU486-behandelten Kontrollzelllinie blieb der Widerstand über den gesamten Messzeitraum auf diesem Plateau. Nach Induktion der Expression der RSV F-Proteine stieg der Widerstand jedoch deutlich an und erreichte sein Maximum nach 24 Stunden. Daraufhin sank der Widerstand sehr schnell unter den vor der Induktion erreichten Wert ab und 72 Stunden nach Induktion wiesen die Zellen keinen signifikanten TER mehr auf, was auf einen vollständigen Verlust der Polarität hindeutete. Im weiteren Verlauf stieg dann der TER wieder und erreichte den vor der Induktion gemessenen Wert. Wenn die MDCK-(hF-GFP)-Zellen mit einem humanisierten monoklonalen Antikörper (Synagis) behandelt wurden, kam es zunächst ebenfalls zu einem Anstieg des TER. Daraufhin fiel der Widerstand jedoch wieder auf den vor Induktion erreichten Wert und sank nicht mehr weiter ab.

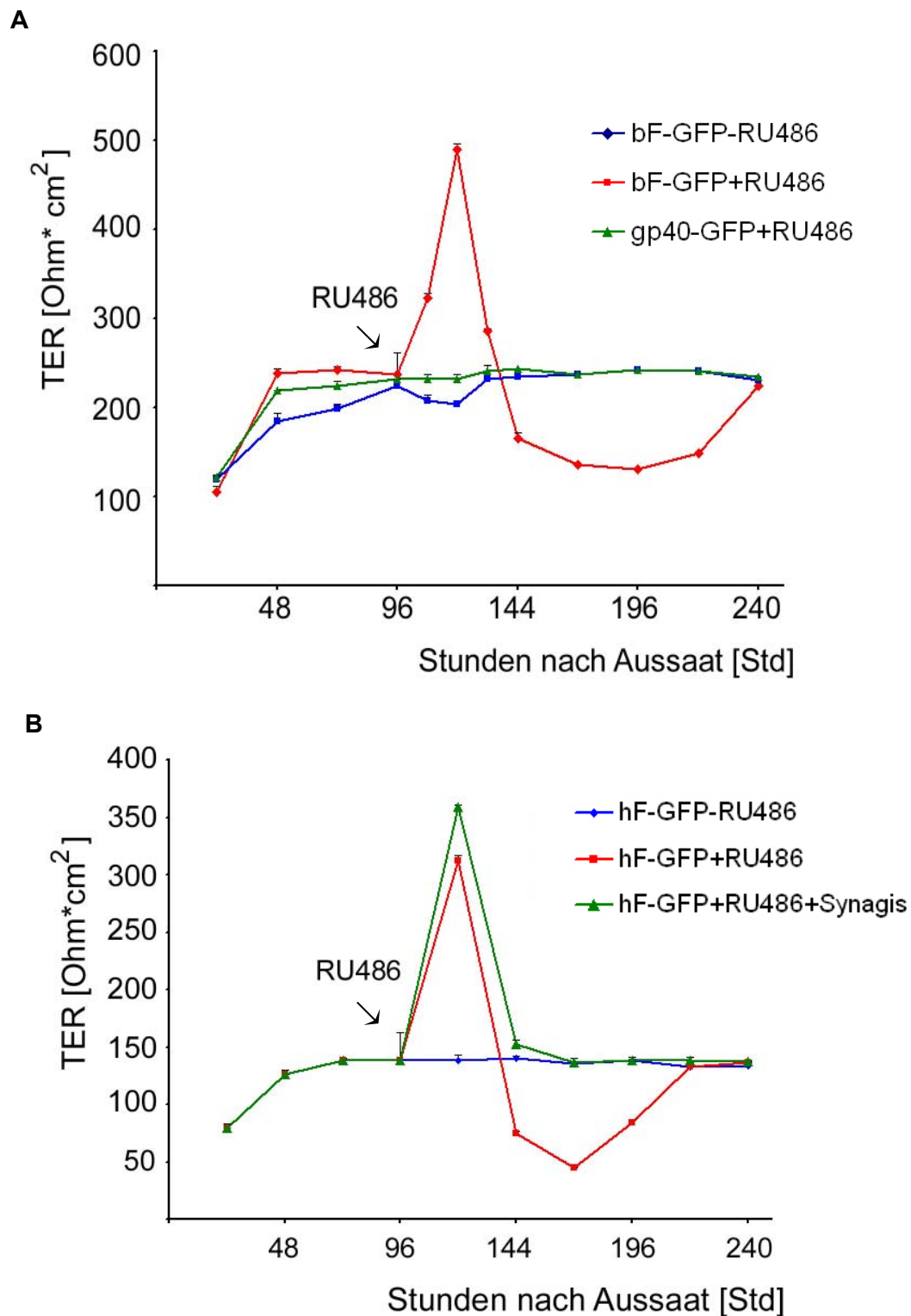


Abbildung 17: Veränderung des transepithelialen elektrischen Widerstandes nach Expression des F-Proteins. Nach viertägiger Kultivierung von MDCK-(bF-GFP)-, MDCK-(hF-GFP)- und MDCK-(gp40-GFP)-Zellen auf porösen Filtersystemen wurde die Expression der Proteine durch Zugabe von RU486 induziert bzw. nicht induziert. Zudem wurden MDCK-(hF-GFP)-Zellen mit dem humanisierten monoklonalen Antikörper Synagis behandelt (5 µg/ml). Der transepitheliale elektrische Widerstand zwischen der apikalen und basolateralen Kammer wurde alle 24 Stunden gemessen.

5.8 Die Expression des F-Proteins führt zu einem Verlust von Epithelzellen

In Abbildung 15 war zu erkennen, dass MDCK-Zellen, die F-GFP exprimierten aus dem Zellverband herausgestoßen wurden. Um dieses Phänomen näher zu untersuchen, wurden MDCK-(hF-GFP)-Zellen auf Deckgläschen ausgesät und die Expression für 24, 48 und 72 Stunden induziert. Nach Fixierung und Permeabilisierung folgte die Färbung der Zellen mit dem monoklonalen β -Catenin-Antikörper. Die Fluoreszenz wurde mit Hilfe der Fluoreszenz-Mikroskopie analysiert (Abbildung 18).

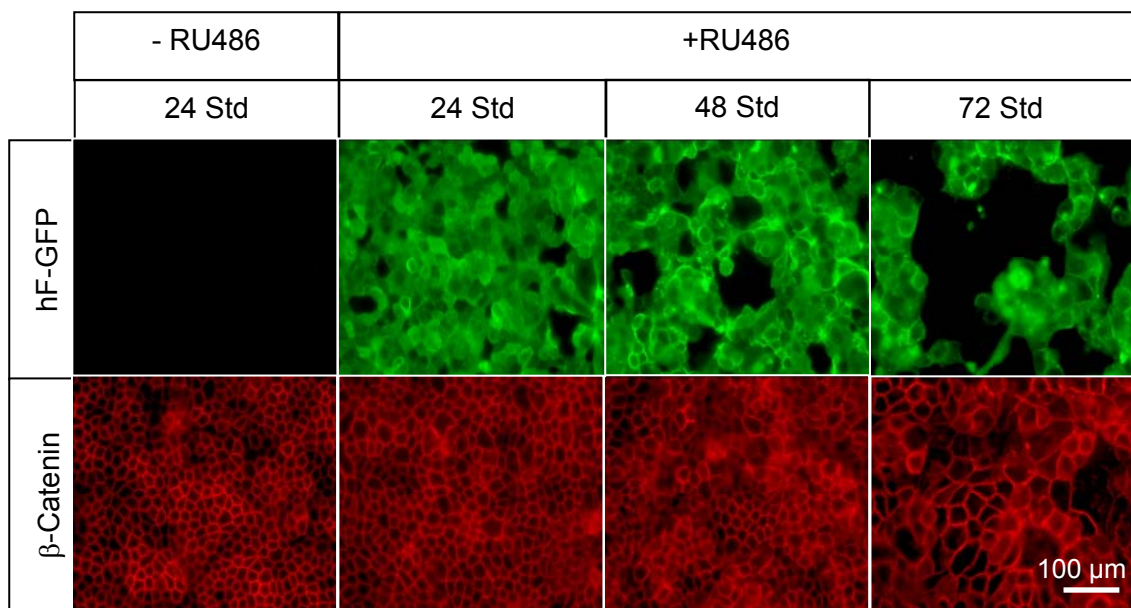


Abbildung 18: Abnahme von MDCK-(hF-GFP)-Zellen nach anhaltender Proteinexpression. MDCK-(hF-GFP)-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und am darauffolgenden Tag erfolgte die Induktion der Expression durch Zugabe von RU486. Die Fixierung der Zellen erfolgte 24, 48 und 72 Stunden nach Induktion. Zum Vergleich wurde das zelluläre Protein β -Catenin mit einem monoklonalem Antikörper (rot) gefärbt.

Etwa 90% der Zellen zeigte 24 Stunden nach Induktion eine hF-GFP-Expression. Das zelluläre β -Catenin war zu diesem Zeitpunkt wabenförmig verteilt, was auf seine Assoziation mit der lateralen Plasmamembran hindeutete. Nach Expression für 48 Stunden kamen größere Bereiche zum Vorschein, deren Zellen keine hF-GFP-Expression aufwiesen. Nach 72 Stunden war nur noch ein geringer Teil der Zellen positiv für F-GFP, die entstandenen Lücken hatten F-GFP-negative Zellen aufgefüllt, die die typische laterale β -Catenin-Färbung aufzeigten. Die Verteilung von β -Catenin in F-GFP positiven Zellen war hingegen diffus.

Um den Verlust an F-GFP-positiven Zellen zu quantifizieren wurden Zellen auf Filtern kultiviert und 24, 48, 72 Stunden nach Induktion durch eine Trypsinbehandlung abgelöst und suspendiert. Die Menge an GFP-positiven Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie

bestimmt (Abbildung 19). Als Kontrollzelllinie dienten MDCK-(SevF-GFP)-Zellen, die das Fusionsprotein des Sendaivirus exprimierten.

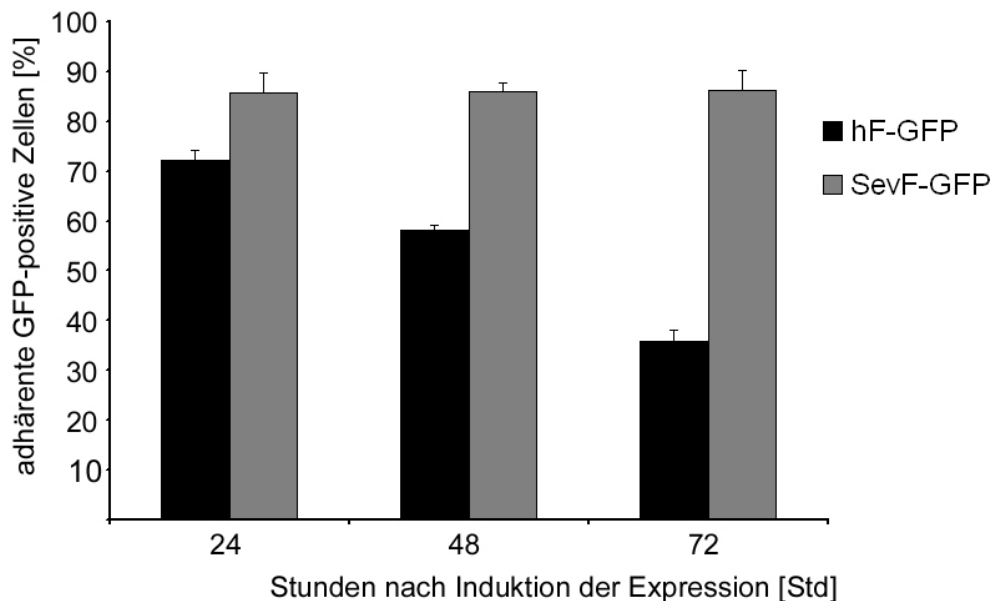


Abbildung 19: Verlust adhärenter GFP-positiver Zellen nach Induktion der F-GFP Expression.

Messung der GFP-exprimierenden Zellen nach Trypsinbehandlung im Durchflusscytometer (Beckman Coulter) 24, 48 und 72 Stunden nach RSV F-GFP- bzw. SevF-GFP- Expression.

Die Quantifizierung der GFP-positiven Zellen zeigte, dass mit andauernder Expression eine stetige Abnahme der RSV F-Protein-positiven Zellen auftrat. Zu Beginn der Expression waren 72 Prozent, nach 72 Stunden nur noch 36 Prozent der Zellen GFP-positiv. Die Kontrollzelllinie MDCK-(SevF-GFP) wies dagegen keine Reduktion der Anzahl an GFP-positiven Zellen auf. Die Werte blieben während des gesamten Zeitraums bei 85% SevF-GFP-positiver Zellen.

Die Abnahme F-GFP-positiver Zellen im Zellrasen ging mit einer Zunahme an flotierenden Zellen einher. Um dieses Phänomen zu quantifizieren wurden zu verschiedenen Zeitpunkten die Überstände von filtergewachsene Zellen abgenommen und die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt (Abbildung 20). Bereits 24 Stunden nach Induktion der Expression war eine erhöhte Anzahl flotierender Zellen im apikalen Zellkulturüberstand nachweisbar. Ein dramatischer Anstieg an flotierenden Zellen wurde nach 48 und 72 Stunden festgestellt. Der Verlust an MDCK-(hF-GFP)-Zellen war deutlicher ausgeprägt als bei den MDCK-(SevF-GFP)-Zellen. Die Kontrollzelllinie MDCK-(gp40-GFP) sowie die nicht induzierten MDCK-(F-GFP) Zelllinien zeigten hingegen keinen Zellverlust.

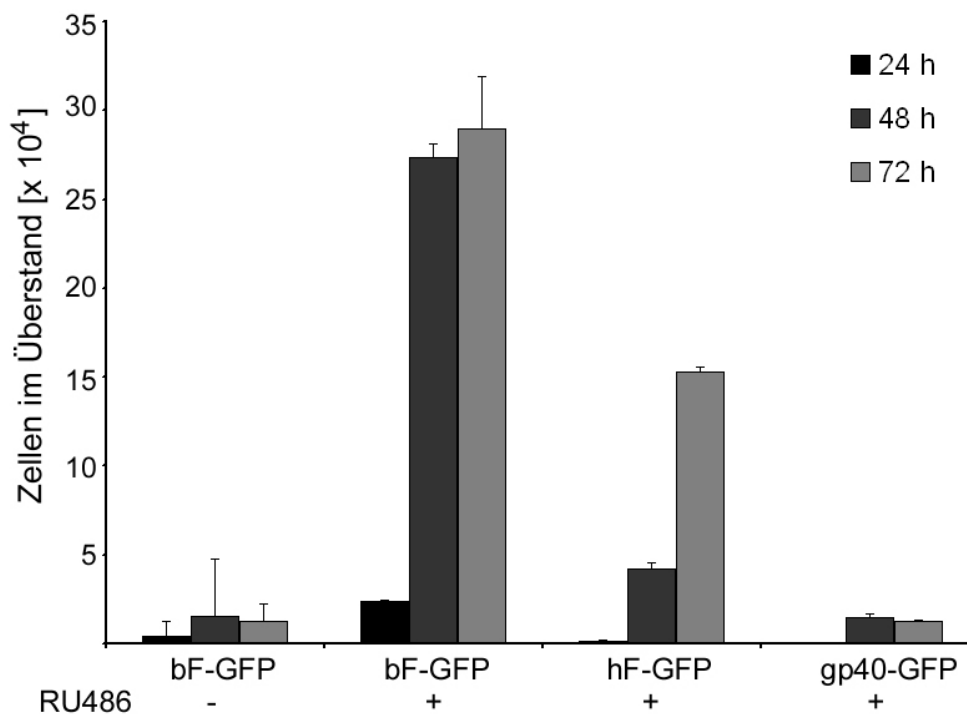


Abbildung 20: Nachweis flotierender Zellen im Überstand. Die Kultivierung der Zellen auf Filtersystemen erfolgte für vier Tage. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden die Überstände abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Die Zellzahl der apikalen Überstände wurde alle 24 Stunden mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

5.9 Ein Fusionsinhibitor und ein monoklonaler Antikörper hemmen den F-Protein-induzierten Zellverlust

Die wichtigste biologische Aktivität des RSV F-Proteins ist seine Fusionsaktivität. Um zu untersuchen, ob diese Aktivität für den Verlust von MDCK-(F-GFP)-Zellen verantwortlich ist, wurde ein kommerziell erhältlicher Fusionsinhibitor verwendet. Beim Masernvirus wurde gezeigt, dass das Peptid z-D-Phe-L-Phe-Gly (z-fFG) die Zellfusion im Stadium der Hemifusion verhindert (Weidmann *et al.*, 2000). In hohen Konzentrationen war das Peptid auch in der Lage, die Sendaivirus-vermittelte Fusion zu reduzieren. Um die inhibitorische Aktivität des Peptids zu testen, wurden MDCK-(bF-GFP)- bzw. MDCK-(hF-GFP)-Zellen auf porösen Filtersystemen kultiviert. Nach dem vierten Tag wurde die Proteinexpression mit RU486 induziert und die Zellen gleichzeitig mit unterschiedlichen Konzentrationen an z-fFG behandelt. Dies führte zu einer signifikanten Hemmung des Zellverlustes (Abbildung 21). Die Reduktion war hierbei abhängig von der verwendeten Konzentration des Peptids. Im Gegensatz zu MDCK-(bF-GFP)-Zellen hatte der Inhibitor auf den Zellverlust in MDCK-(hF-

GFP)-Zellen keine Einfluss (Daten nicht gezeigt), was möglicherweise auf eine nicht stattfindende Bindung des Peptids an das humane RSV F-Protein zurückzuführen ist.

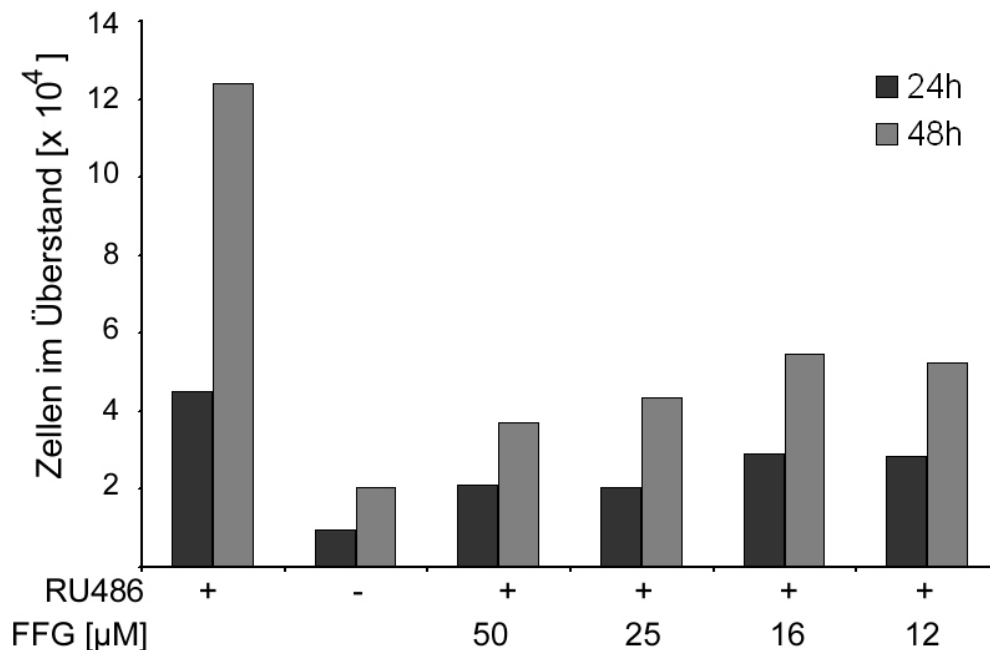


Abbildung 21: Inhibition der F-vermittelten Fusion vermindert Zellverlust. MDCK-(bF-GFP)-Zellen wurden auf porösen Filtersystemen kultiviert und nach vier Tagen mit RU486 behandelt. Simultan erfolgte die Zugabe des Inhibitors z-fFG in den angegebenen Konzentrationen. Bei jedem Mediumwechsel wurde auch der Inhibitor erneuert.

Der monoklonale, humanisierte Antikörper Synagis (Palivizumab) wird heutzutage in der prophylaktischen Therapie von Personen mit einem hohen Erkrankungsrisiko eingesetzt (Cardenas *et al.*, 2005). Der Antikörper ist gegen das humane RSV F-Protein gerichtet und besitzt virusneutralisierende Eigenschaften. Die genaue Wirkungsweise des Antikörpers ist jedoch nicht geklärt. Die Neutralisation des Virus könnte sowohl durch eine Hemmung der Fusion, als auch indirekt durch Inhibition der Rezeptorbindenden Eigenschaften des Proteins bedingt sein (Cardenas *et al.*, 2005). Die MDCK-(bF-GFP)- und MDCK-(hF-GFP)-Zellen wurden auf porösen Filtersystemen für vier Tage kultiviert und gleichzeitig mit dem Induktor RU486 und unterschiedlichen Konzentrationen an Synagis (5 und 10 μg/ml) behandelt (Abbildung 22). Der Antikörper führte zu einer deutlichen Reduktion des Zellverlustes. Bereits eine Konzentration von 5 μg/ml des Antikörpers reduzierte den cytotoxischen Effekt um 72 Prozent. Die Behandlung der MDCK-(bF-GFP)-Zellen führte dagegen zu einer nur geringen Reduktion des Zellverlustes (Daten nicht gezeigt), was möglicherweise auf die Spezifität des Antikörpers gegenüber dem humanen RSV F-Protein zurückzuführen ist. Dieses Ergebnis lässt erkennen, dass die Hemmung der Fusion bzw. Rezeptorbindung durch Bindung des Antikörpers an die Ektodomäne des F-Proteins zu einer stark

verminderten Cytopathogenität führt. Jedoch vermittelte die Verwendung des Antikörpers keinen vollständigen Schutz auch wenn höhere Synagis-Konzentrationen verwendet wurden. Dies ist möglicherweise auf eine auch intrazelluläre Wirkung des F-Proteins zurückzuführen.

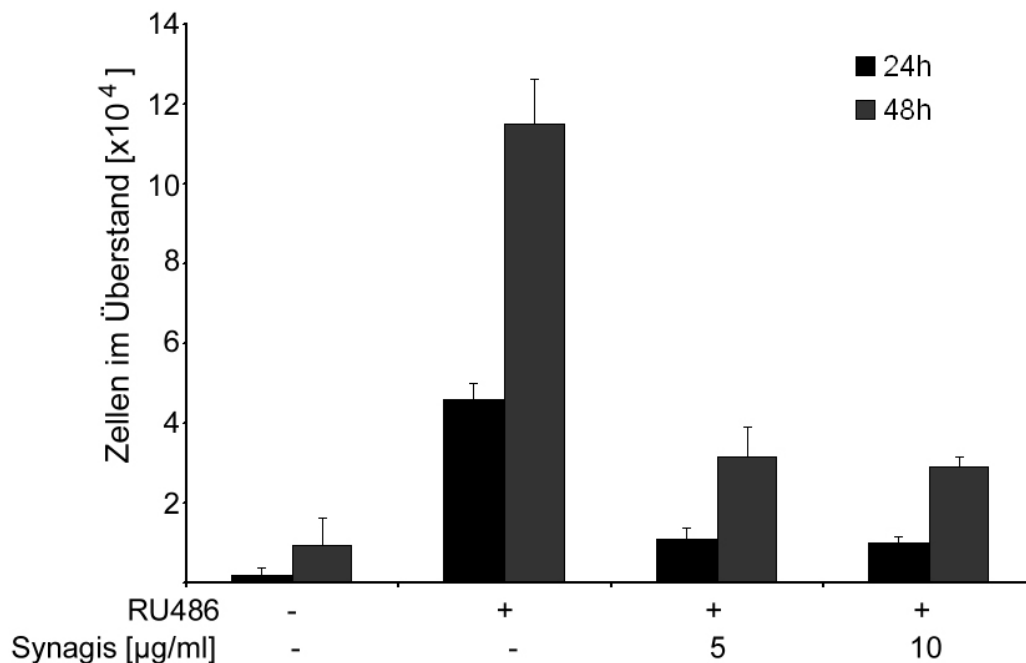


Abbildung 22: Inhibition der Fusionsaktivität durch den monoklonalen Antikörper reduziert den Zellverlust. MDCK-(hF-GFP)-Zellen wurden auf porösen Filtersystemen kultiviert und nach vier Tagen mit RU486 behandelt. Simultan erfolgte die Zugabe des monoklonalen Antikörpers (Synagis) in den dargestellten Konzentrationen. Nach jedem Mediumwechsel erfolgte eine erneute Zugabe des Antikörpers.

5.10 Das F-Protein induziert Caspase-abhängige Apoptose

Der Verlust von Epithelzellen in einem Zellverband kann auf einer Apoptose beruhen. Die proapoptotische Zellen werden aus dem Epithelverband durch einen Aktin-Myosin abhängigen Mechanismus ausgestoßen (Rosenblatt *et al.*, 2001). Andererseits ist es denkbar, dass die Zellen ihre Adhärenz verlieren und infolge dessen apoptotisch wurden, ein Prozess der als Anoikis bezeichnet wird (Frisch & Francis, 1994). Caspasen sind Cysteinproteasen, die entscheidend an der Apoptose beteiligt sind. Um festzustellen, worauf der Zellverlust nach F-Protein-Expression beruht, wurden MDCK-(hF-GFP)-Zellen auf porösen Filtersystemen kultiviert und simultan zur Induktion mit dem Pan-Caspase-Inhibitor (z-VAD-fmk) behandelt (Abbildung 23). Diese Behandlung führte zu einer drastischen Abnahme der Zahl flotierender Zellen. Dieses Ergebnis weist daraufhin, dass der Zellverlust auf einer F-vermittelten Apoptose basiert, was zu einer Verdrängung der apoptotischen Zellen aus dem Zellverband führte.

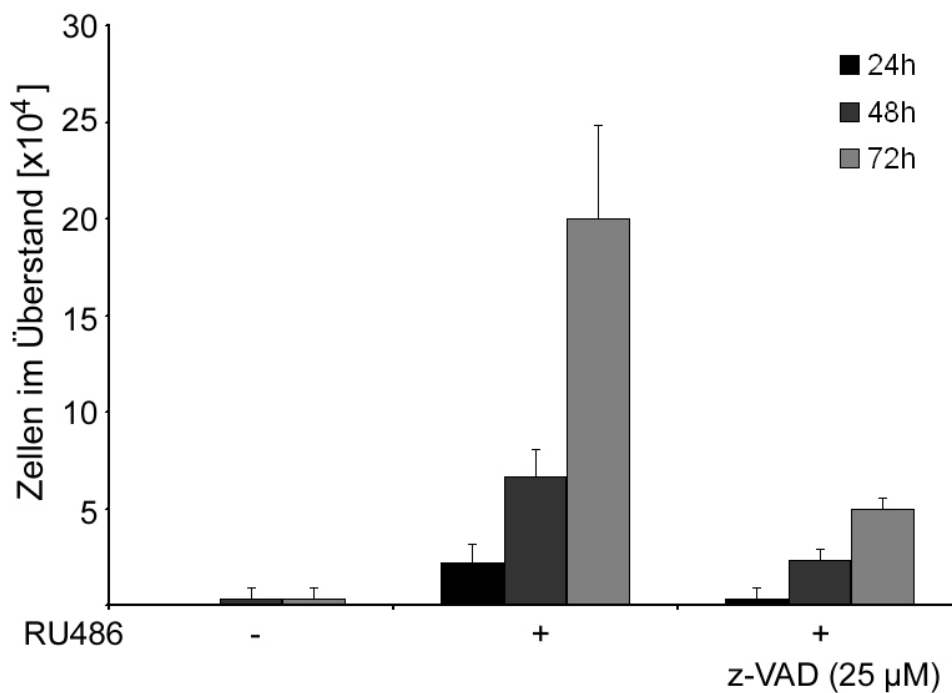


Abbildung 23: Der Pan-Caspase-Inhibitor (z-VAD-fmk) reduziert den F-Protein-induzierten Zellverlust. MDCK-(hF-GFP)-Zellen wurden vier Tage auf Filtern kultiviert. Die Zugabe des Induktors und des Pan-Caspase-Inhibitors (z-VAD-fmk) erfolgte gleichzeitig. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurde die Zellzahl im Überstand mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Um die RSV F-Protein-induzierte Apoptose näher zu charakterisieren wurden in weiteren Experimenten Inhibitoren gegen verschiedene Caspasen eingesetzt. Caspasen werden in Initiatorcaspasen (z.B. Caspase-2, -8 und -9) und Effektorcaspasen (z.B. Caspase-3 und -7) eingeteilt. Die Initiator-Procaspasen werden durch exogene oder endogene Signale aktiviert und durch einen autoproteolytischen Prozess in die aktive Form überführt, die dann in der Lage ist, weitere Caspasen zu spalten und zu aktivieren. Die aktivierten Effektorcaspasen spalten eine Vielzahl zellulärer Proteine was schließlich zum Zelltod führt. MDCK-(bF-GFP)-, MDCK-(hF-GFP)- und MDCK-(gp40-GFP)-Zellen wurden ausgesät und die Aktivität der Effektor-Caspase-3/7 24 Stunden (BRSV F-Protein) bzw. 40 Stunden (HRSV F-Protein) nach Induktion der Proteinexpression gemessen (Abbildung 24). Die Induktion der bovinen RSV F-Protein-Expression führte zu einer deutlichen Steigerung der Caspase-3/7-Aktivität in den Zellen. Die Kontrollzelllinie MDCK-(gp40-GFP)-Zellen sowie die nicht induzierten und z-VAD-behandelten MDCK-(bF-GFP)-Zellen wiesen lediglich geringe Caspase-Aktivitäten auf. Im Falle des humanen RSV F-Proteins konnte 40 Stunden nach Induktion der Expression ebenfalls eine signifikante Steigerung der Caspase-3/7-Aktivität beobachtet werden. Zellen, die mit z-VAD behandelt worden waren, wiesen dagegen eine nur geringfügige Aktivität auf.

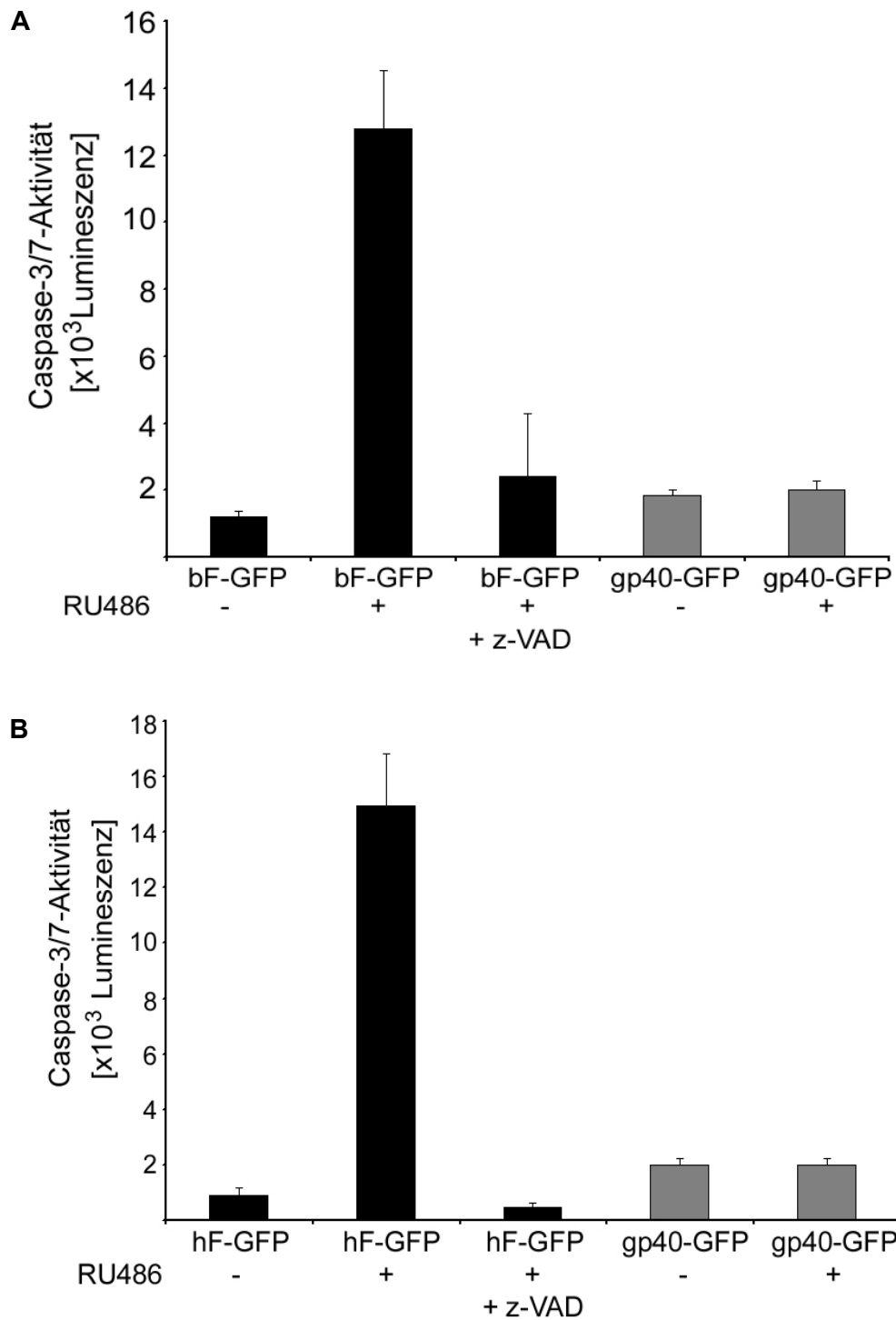


Abbildung 24: Steigerung der Caspase-3/7-Aktivität nach Expression des bovinen und humanen RSV F-Proteins. MDCK-(bF-GFP)-, MDCK-(hF-GFP)- und MDCK-(gp40-GFP)-Zellen wurden 24 Stunden (A) bzw. 40 Stunden (B) nach Induktion der Expression mit Trypsin behandelt, in Suspension gebracht und die Caspase-3/7-Aktivität von 4×10^4 Zellen gemessen.

Die aktivierte Effektorcaspase-3 führt unter anderem zu der Inaktivierung des inhibitorischen Proteins (ICAD) der Caspase-aktivierten DNase (CAD). Die proteolytische Inaktivierung von ICAD ermöglicht CAD den Abbau von DNA-Strängen, ein charakteristisches Merkmal der Apoptose (Wyllie *et al.*, 1984). Diese DNA-Fragmentierung kann durch DAPI-Färbung sichtbar gemacht werden. Zudem ist eine Markierung der auftretenden DNA-Brüche durch die sogenannte TUNEL-Färbung möglich. Hierbei füllt die terminale Deoxynukleotidyl-Transferase DNA-Brüche mit markierten dUTPs auf. Um diese Prozesse in MDCK-(RSV F-Protein)-Zellen nachzuweisen, wurden die Zellen auf Deckgläschen ausgesät und die Expression der Transgene für 48 Stunden induziert. Die TUNEL-Färbung und der Nachweis der genomischen DNA mittels DAPI-Färbung sind in Abbildung 25 dargestellt.

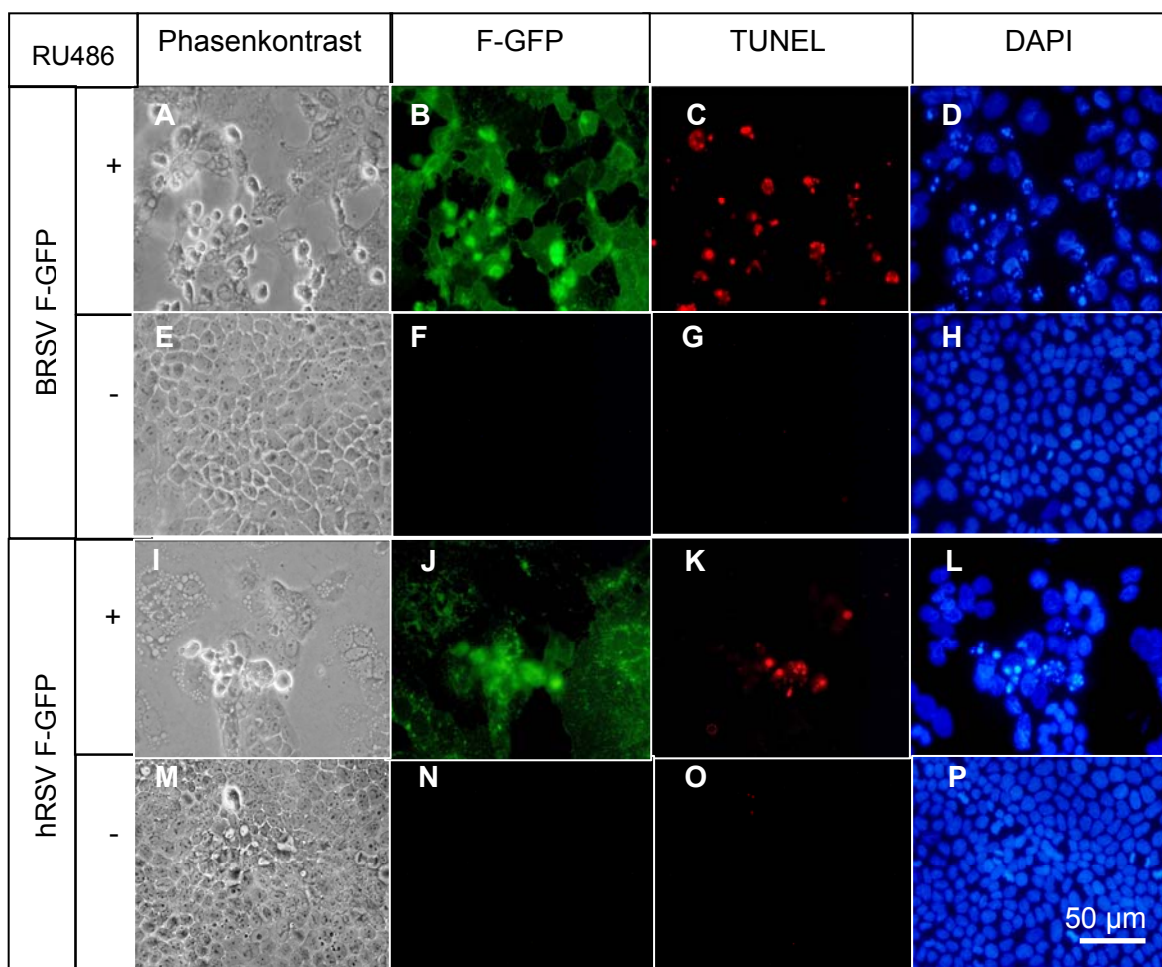


Abbildung 25: DNA-Fragmentierung nach 48stündiger Expression des F-Proteins. MDCK-(bF-GFP)- und MDCK-(hF-GFP)-Zellen wurden ausgesät und die Expression der F-Proteine für 48 Stunden induziert. Die Zellen wurden zunächst mit dem TUNEL-Reagenz (C, G, K, O) und anschließend mit dem DAPI-Reagenz (D, H, L, P) gefärbt.

Nach Expression des RSV F-Proteins für 48 Stunden zeigten sich im Phasenkontrast Zellen (A, I Pfeile), die außerhalb des Fokus lagen. Diese F-Protein-positiven Zellen (B, J) wiesen eine deutliche TUNEL-Färbung (C, K) und DNA-Fragmentierung (D, L) auf. In Abwesenheit

des Induktors konnte keine DNA-Fragmentierung sowohl in der MDCK-(bF-GFP)-Zelllinie als auch in der MDCK-(hF-GFP)-Zelllinie nachgewiesen werden (G, H). Auch die TUNEL-Reaktion war hier negativ.

Eine DNA-Fragmentierung kann auch nach Aufreinigung der genomischen DNA mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese dargestellt werden. Zum Nachweis dieses Merkmals wurde 48 Stunden nach Induktion der Transgen-Expression die Zellzahl der induzierten und nicht induzierten MDCK-(hF-GFP)-Zellen auf 10^5 Zellen/ml eingestellt und die DNA isoliert. Als Negativkontrolle dienten induzierte und nicht-induzierte MDCK-(gp40-GFP)-Zellen. Die isolierte genomische DNA von flotierenden MDCK-(hF-GFP)-Zellen wies nach elektrophoretischer Auftrennung ein leiterartiges Bandenmusters auf (Abbildung 26). Dieses Muster ist typisch für die Apoptose und entsteht durch die Spaltung der Nukleosomen. In adhärennten MDCK-(hF-GFP)-Zellen war dieses Bandenmuster nicht zu erkennen, obwohl sie induziert waren. Dieses Ergebnis weist daraufhin, dass späte Apoptosemerkmale erst in flotierenden Zellen nachweisbar sind. Die DNA von sowohl nicht induzierten als auch induzierten MDCK-(gp40-GFP)-Zellen wiesen ebenfalls kein DNA-Fragmentierungsmuster auf.

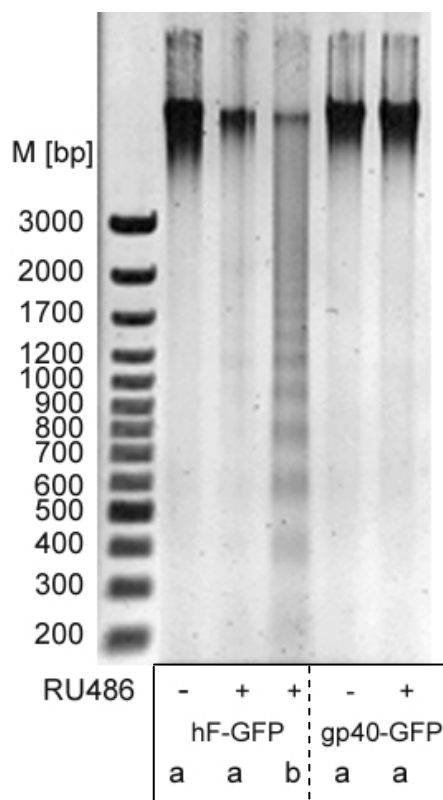


Abbildung 26: DNA-Fragmentierung ausgestoßener MDCK-(hF-GFP)-Zellen.

Aussaat der MDCK-(hF-GFP)-Zellen und Kontrollzellen MDCK-(gp40-GFP)-Zellen erfolgte auf 66 mm Schalen. Die Expression des jeweiligen Proteins wurde für 48 Stunden induziert. Daraufhin wurden die Zellen auf 10^5 Zellen/ml eingestellt und die genomische DNA isoliert. Die Auftrennung der DNA erfolgte in einem 1%igen TAE-Gel. Die DNA wurde mit Hilfe einer Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht. a= adhärennte Zellen, b= flotierende Zellen im Zellüberstand.

Ein weiteres Merkmal der Apoptose ist die Bildung von Ausstülpungen und Bläschen der Plasmamembran, was als „membrane blebbing“ bezeichnet wird. Dieses späte Apoptosemerkmale wurde beobachtet, wenn die F-Protein-Expression für 72 Stunden induziert worden war. Zellen, die diese Blasenbildung zeigten, waren auch stets positiv in der TUNEL-Reaktion und wiesen eine Fragmentierung der Zellkerne auf (Abbildung 27).

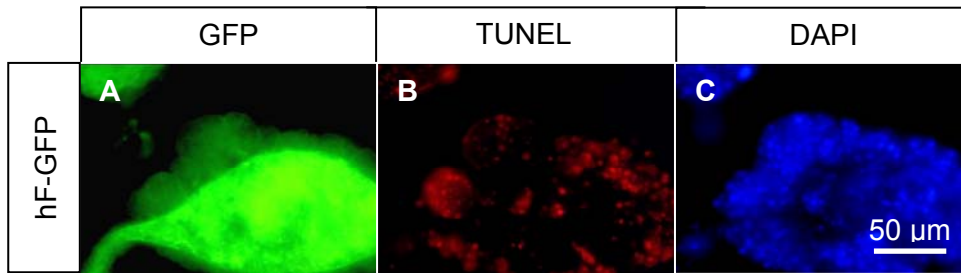


Abbildung 27: „Membrane blebbing“ nach anhaltender F-Expression. 72 Stunden nach Induktion der Expression erfolgte die TUNEL- und DAPI-Färbung der MDCK-(hF-GFP)-Zellen.

Proteine der Bcl-2 Familie stellen regulatorische Proteine dar, die entweder antiapoptotisch (z.B. Bcl-2) oder proapoptotisch (z.B. Bax) wirken können. Das Gleichgewicht zwischen pro- und antiapoptotischen Proteinen entscheidet, ob eine Zelle apoptotisch wird oder überlebt. Bax wird durch den Tumorsuppressor p53 induziert, wenn Zellschäden, insbesondere DNA-Schäden überhand nehmen. Das aktivierte Bax assoziiert mit der Mitochondrienmembran (Antonsson *et al.*, 2001; Desagher *et al.*, 1999; Hsu *et al.*, 1997; Wolter *et al.*, 1997) und lagert sich dort zu Homooligomeren zusammen, wodurch Kanäle entstehen. Die Folge ist ein Ausstrom von Cytochrom C in das Cytosol (Jurgensmeier *et al.*, 1998). Über die Initiatorcaspase-9 kommt es zur Aktivierung der Effektorcaspase-3 und schließlich zur Apoptose. Um nun zu klären, ob Bax an der F-Protein-vermittelten Apoptose beteiligt ist, wurden MDCK-(hF-GFP)-Zellen ausgesät und 48 Stunden nach Induktion mit dem α -Bax N20-Antikörper gefärbt, der mit dem N-Terminus des aktivierten Bax reagiert (Desagher *et al.*, 1999; Hsu *et al.*, 1997; Stankiewicz *et al.*, 2005). Die Lokalisationsstudien erfolgten mittels Fluoreszenzmikroskopie (Abbildung 28).

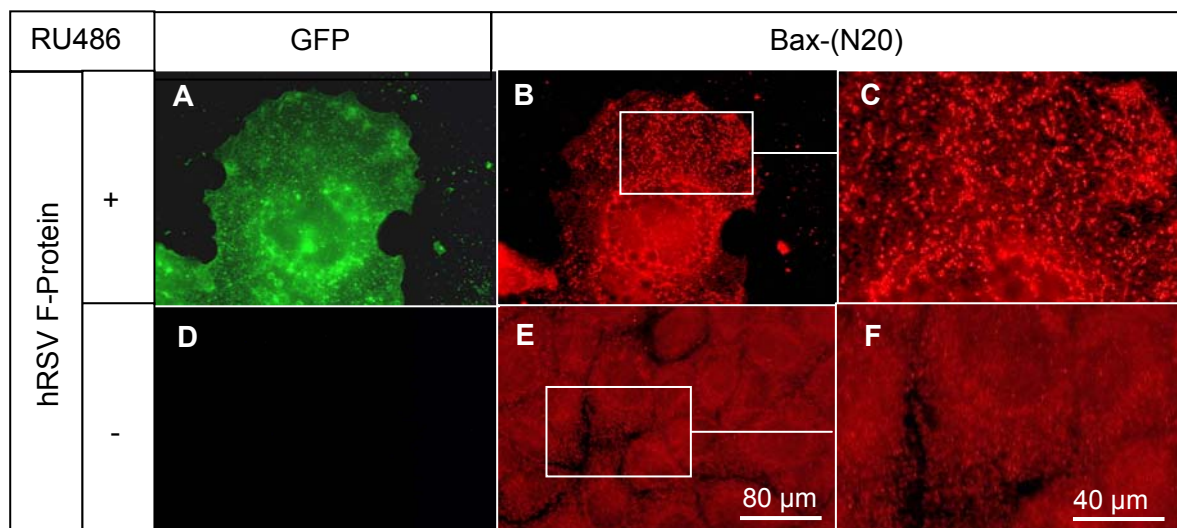


Abbildung 28: Nachweis des aktivierten, proapoptotischen Proteins Bax. Der intrazelluläre Nachweis von Bax wurde 40 Stunden nach Expression von HRSV F-GFP durchgeführt (A-C). Als Kontrolle dienten nicht induzierte MDCK-(hF-GFP)-Zellen (D-F). Nach Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen mit dem α -Bax (N20)-Antikörper gefärbt.

Die Immunfluoreszenzstudien ergaben, dass 40 Stunden nach Induktion der F-Protein-Expression Bax mit röhrenartigen Strukturen innerhalb des Cytoplasmas assoziiert vorlag, bei denen es sich wahrscheinlich um Mitochondrien handelt (C). In Abwesenheit des RSV F-Proteins (D) war dagegen Bax mehr oder weniger diffus innerhalb des Cytoplasma verteilt.

5.11 Beteiligung von RhoA-Kinase, MAP-Kinase p38 und der Caspasen-2, -8, -9 an der F-vermittelten Apoptose

Um die durch das RSV F-Protein aktivierten Signalwege näher zu charakterisieren, wurde das Caspase-Experiment mit den MDCK-(hF-GFP)-Zellen unter Verwendung verschiedener Inhibitoren durchgeführt (Abbildung 29).

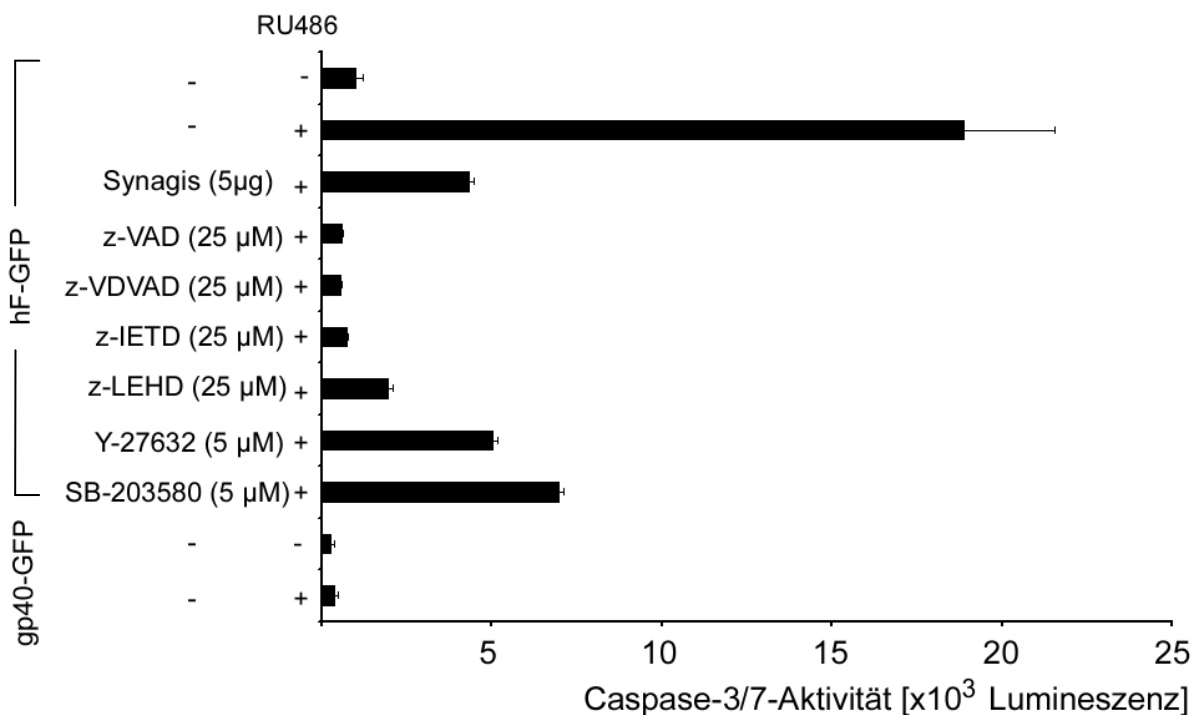


Abbildung 29: Inhibition der F-induzierten Caspase 3/7-Aktivität. MDCK-(hF-GFP)-Zellen wurden in 24 Napf-Platten ausgesät und die Expression des Proteins am folgenden Tag induziert. Gleichzeitig wurden die Zellen mit verschiedenen Inhibitoren in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Die Messung der Caspase-3/7-Aktivität erfolgte 48 h nach Induktion der F-Expression.

Die Behandlung der Zellen mit dem monoklonalen Antikörper (Synagis) führte zu einer signifikanten Reduktion der F-vermittelten Caspase-Aktivität. Nach Inhibition der Caspase-2- (z-VDVAD-fmk), Caspase-8- (z-IETD-fmk) und Caspase-9-Aktivität (z-LEHD) konnte die Caspase-3/7-Aktivität auf Werte gesenkt werden, die zum Teil noch unter den von nicht-induzierten Zellen lagen. Der RhoA-Kinase Inhibitor Y-27632 ermöglichte ebenso wie der Inhibitor SB203580 der Stress-aktivierten MAP-Kinase p38 eine signifikante Senkung der Caspase-3-Aktivität. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass die F-vermittelte Apoptose im

Zusammenhang mit der Aktivierung der Initiator-Caspasen-2, -8, und -9, der RhoA-Kinase und der MAPK p38 steht.

5.12 Die Expression des F-Proteins führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53

Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob die durch das F-Protein ausgelöste Apoptose transkriptioneller Aktivität bedarf, wurde das Gen für die „firefly“-Luziferase unter Kontrolle verschiedener cis-aktiver Elemente (AP1-luc, ISRE-luc, NF- κ B-luc, p53-luc, pTARE-luc) in MDCK-(hF-GFP)-Zellen transfiziert und die Expression des F-Proteins für 24 Stunden induziert. Anschließend wurde die Luziferase-Aktivität in den Zelllysaten bestimmt (Abbildung 30).

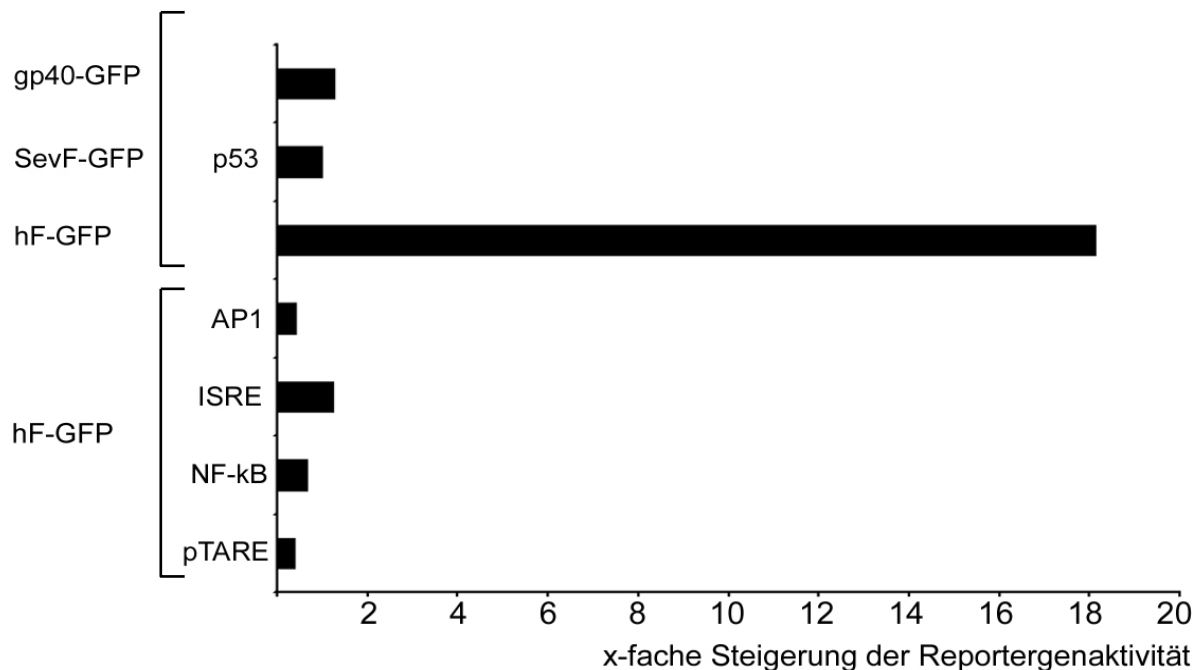


Abbildung 30: Transkriptionelle Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53. MDCK-(hF-GFP)-Zellen, MDCK-(gp40-GFP) und MDCK-(SevF-GFP)-Zellen wurden mit dem Gen für die „firefly“-Luziferase unter Kontrolle der angegebenen cis-aktiven Elemente transfiziert und die Expression der Transgene für 24 Stunden induziert. Die Reporterogenaktivität wurde in den Zelllysaten mit Hilfe eines lumineszierenden Substrates bestimmt und in Bezug zu den in nicht induzierten Zellen ermittelten Werten gesetzt.

Nach Induktion der HRSV F-GFP-Expression für 24 Stunden konnte eine signifikante Steigerung der transkriptionellen p53-Aktivität nachgewiesen werden. Die anderen cis-aktiven Elemente (AP1, ISRE, NF- κ B und pTARE) wiesen dagegen keine Änderung ihrer transkriptionellen Aktivität auf. Die Kontrollzelllinien MDCK-(gp40-GFP) und MDCK-(SevF-GFP) zeigten keine Steigerung der p53-Aktivität nach Induktion der Kontrollproteine.

Die Aktivierung und/oder Stabilität des Transkriptionsfaktors p53 wird durch die Phosphorylierung des Proteins durch verschiedene Proteinkinasen reguliert. Obwohl zwischen dem *caninen* und *humanen* p53 eine hohe Sequenzhomologie besteht, existieren auch einige wichtige Unterschiede. So fehlen dem *caninen* p53 die Serine 9 und 46, deren Phosphorylierung bei der Induktion der p53-abhängigen Apoptose in *humanen* Zellen eine Rolle spielen (Oda *et al.*, 2000). Das Serin 15 und die flankierenden Aminosäuren sind dagegen im *caninen* und *humanen* p53 konserviert, was die Verwendung des phosphospezifischen Antikörpers (α -p53 [Ser 15]), auch in MDCK-Zellen ermöglichte (Abbildung 31). Eine Phosphorylierung von Serin 15 findet in der Regel nach DNA-Schädigung statt (Bean & Stark, 2001; Burma *et al.*, 1999).

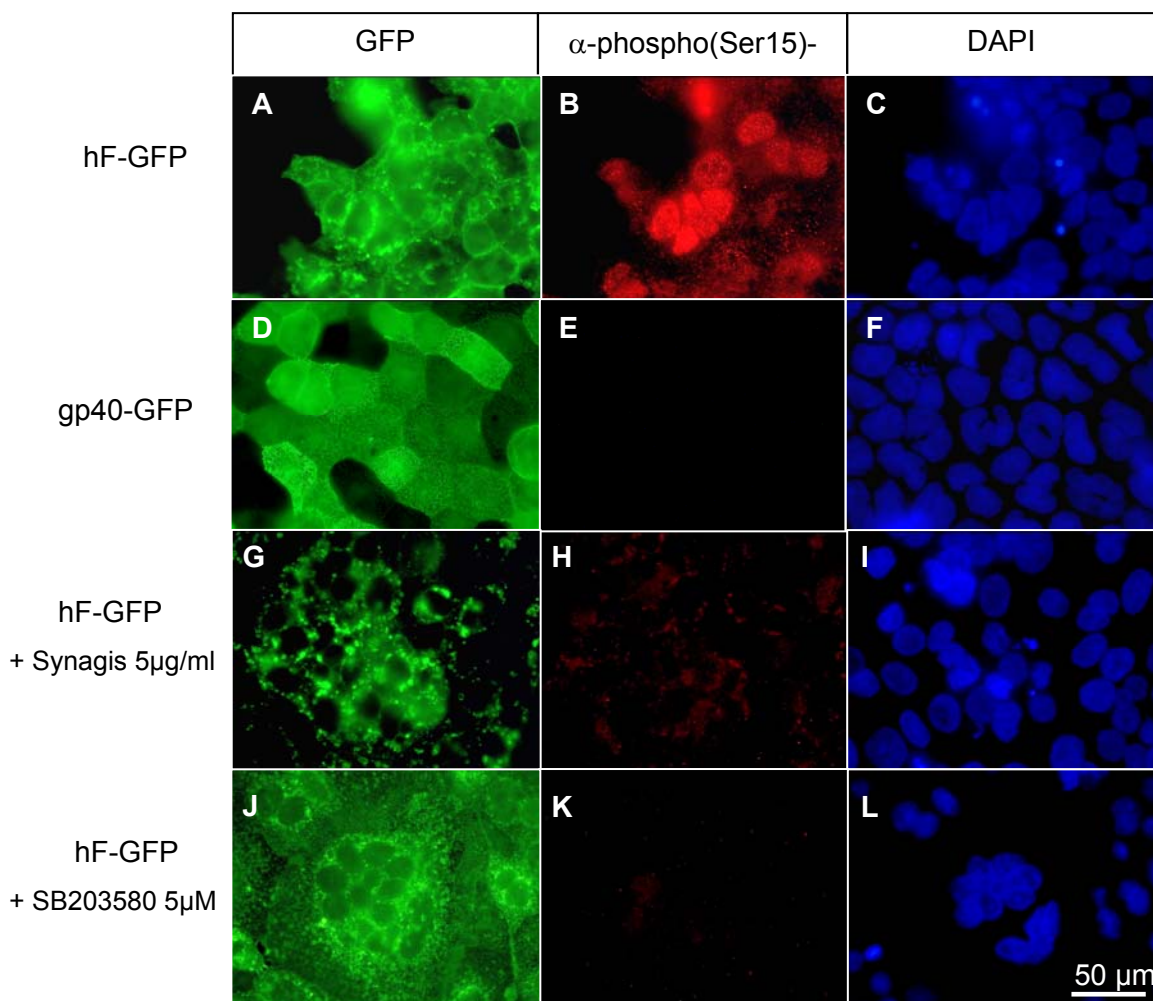


Abbildung 31: Nachweis von phosphoryliertem p53 (Serin 15) in MDCK-(hF-GFP)-Zellen. MDCK-(hF-GFP)- (A-C) und MDCK-(gp40-GFP)- Zellen (D-F) wurden auf Deckgläschen ausgesät und die Expression der Transgene für 40 Stunden induziert. Einige Ansätze wurden gleichzeitig mit (5 μ g/ml) oder dem p38-MAP-Kinase Inhibitor (SB203580; 10 μ M) behandelt. Der Nachweis von aktiviertem p53 erfolgte mit einem Antikörper, der für phosphoryliertes Serin 15 spezifisch ist.

Die Expression des F-Proteins für 40 Stunden führte zu einer ausgeprägten Synzytienbildung in MDCK-Zellen (C). Die Zellkerne innerhalb dieser Synzytien reagierten

deutlich mit α -p53 [Ser 15] (B). Im Gegensatz dazu konnte phosphoryliertes p53 (Ser15) in induzierten MDCK-(gp40-GFP)-Zellen nicht nachgewiesen werden (E). Die mit dem monoklonalen Antikörper Synagis behandelten Zellen zeigten im Vergleich zu den unbehandelten Zellen eine verminderte Synzytienbildung (I). Phosphoryliertes p53 konnte hier nur in wenigen Zellen nachgewiesen werden (H). MDCK-(hF-GFP)-Zellen, die mit dem MAP-Kinase p38-Inhibitor (SB-203580) inkubiert worden waren, wiesen eine deutliche Synzytienbildung auf (L), reagierten jedoch nicht mit dem phosphospezifischen Antikörper (K). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die F-vermittelte Fusion von Zellen zu einer Phosphorylierung und Aktivierung von p53 führt, die durch die Behandlung der Zellen mit Synagis gehemmt werden kann. Zudem scheint die MAP-Kinase p38 an der Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53 durch das F-Protein beteiligt zu sein.

Um die Frage zu beantworten, ob die transkriptionelle Aktivierung des p53 eine Rolle in der F-vermittelten Apoptose spielt, wurde eine MDCK-(hF-GFP)-p53-DN-Zelllinie hergestellt, die konstitutiv, eine dominant-negative Mutante von p53 (p53-DN; R273H) exprimiert. Diese Mutation verhindert zwar die transkriptionelle Aktivität von p53, nicht aber andere transkriptionell-unabhängige Aktivitäten. Als Kontrolle diente die MDCK-(hF-GFP)-pIRESneo-Zelllinie (Abbildung 32).

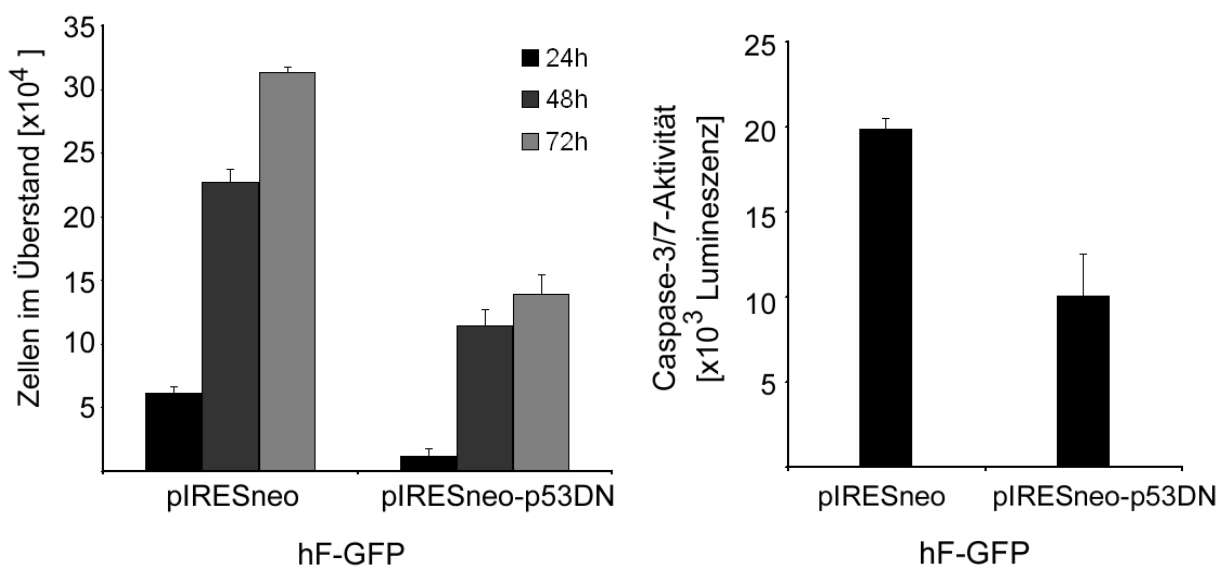


Abbildung 32: Hemmung der transkriptionellen Aktivität des p53 senkt die F-Protein-vermittelte Cytopathogenität. Die hF-GFP-Expression wurde in MDCK-(hF-GFP)-p53-DN und MDCK-(hF-GFP)-pIRESneo-Zellen für 24, 48 und 72 Stunden induziert. Die Zellkulturüberstände wurden täglich abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Die Anzahl flotierender Zellen wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Die Expression der p53-DN Mutante reduzierte den F-Protein-induzierten Zellverlust um ca. 50% gegenüber der Kontrollzelllinie, die mit dem leeren Plasmid pIRESneo transfiziert

worden war. Die Hemmung der transkriptionellen Aktivität des p53 führte außerdem zu einer signifikanten Verminderung der durch das F-induzierten Caspase-3/7-Aktivität.

5.13 Sekundäre Nekrose nach anhaltender RSV F-Proteinexpression

In Abwesenheit von phagozytierenden Zellen, welche apoptotische Zellen entfernen können, kann es zu einer sekundären Nekrose apoptotischer Zellen kommen (Bonfoco *et al.*, 1995). Die Nekrose ist mit einem Verlust der Membranintegrität und dem Ausschütten cytosolischer Faktoren verbunden, was im Körper zu Entzündungsreaktionen führen kann (McConkey, 1998). Die Freisetzung des cytoplasmatischen Enzyms Laktose-Dehydrogenase (LDH) weist auf eine Veränderung der Membranintegrität hin und wird häufig als Kennzeichen einer Nekrose herangezogen. Zum Nachweis eines Membranintegritätsverlustes wurden Überstände von MDCK-(hF-GFP)-Zellen 48 Stunden nach Induktion der F-Expression auf LDH-Aktivität untersucht. Gleichzeitig wurde der Einfluss verschiedener Inhibitoren in diesem Experiment untersucht. Als Positivkontrolle dienten Überstände lysierter MDCK-(hF-GFP)-Zellen (Abbildung 33).

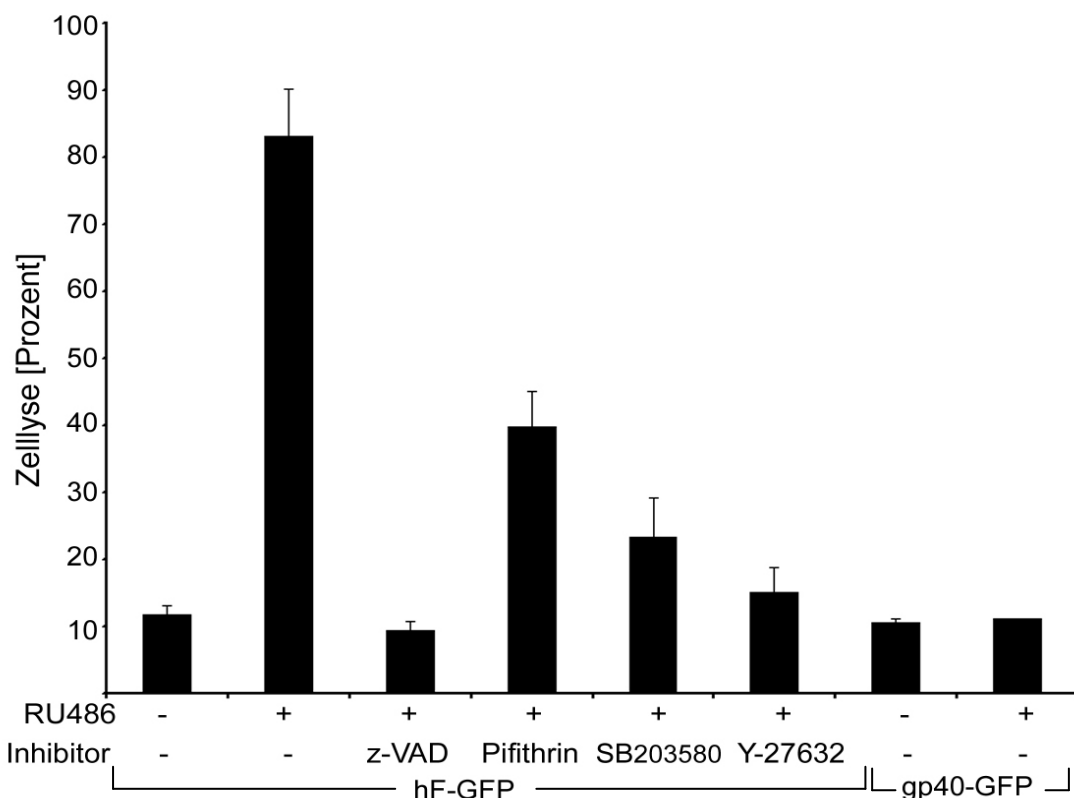


Abbildung 33: Auftreten sekundärer Nekrose nach anhaltender F-Expression.

MDCK-(hF-GFP)- oder MDCK-(gp40-GFP)-Zellen wurden ausgesät und die Expression des Transgens für 48 Stunden induziert. Einige Ansätze wurden zudem mit den angegebenen Inhibitoren behandelt (z-VAD: 25 μ M; Pifithrin- α : 10 μ M; SB203580: 5 μ M; Y-27632: 5 μ M). Die freigesetzte LDH-Aktivität wurde im Überstand der MDCK-Zellen bestimmt und in Bezug zu der LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand Detergenz-lysierten Zellen (100%) gesetzt.

Die LDH-Aktivität war 48 Stunden nach Expression des F-Proteins deutlich erhöht. Der Pan-Caspase-Inhibitor z-VAD inhibierte die Freisetzung von LDH vollständig, was darauf hinweist, dass der LDH-Freisetzung Apoptose vorausging. Sowohl die Hemmung der transkriptionellen p53-Aktivität durch Pifithrin- α als auch die Inhibition der MAP-Kinase p38 mit SB-203580 führten zu einer signifikanten Verringerung des LDH-Austrittes. Dieser protektive Effekt war jedoch weniger deutlich ausgeprägt als bei der z-VAD-Behandlung. Die Inhibition der RhoA-Kinase (Y-27632) bewirkte ebenfalls die Reduktion der F-vermittelten Zelllyse. Die Kontrollzelllinie MDCK-(gp40-GFP) setzte 48 Stunden nach Induktion der gp40-Expression keine LDH vermehrt frei. Diese Ergebnisse zeigen, dass die hF-GFP-Expression die Membranintegrität deutlich beeinträchtigt, was auf eine sekundäre Nekrose zurückzuführen ist.

5.14 Die F-Protein-vermittelte Apoptose ist unabhängig von dem Fas-Rezeptor und dem FADD-Adapterprotein

In 5.12 konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der Caspase-8 an der F-vermittelten Apoptose beteiligt ist. Die Initiator-Caspase-8 kann sowohl über den externen, als auch über einen internen Signalweg aktiviert werden. Die Aktivierung über den externen Signalweg erfolgt über Rezeptoren, die eine Todesdomäne besitzen. Hierzu gehören der Fas-Rezeptor (Fas-R), der TNF- α -Rezeptor und der TRAIL-Rezeptor. Im Fall des Fas-R kommt es nach Aktivierung des Rezeptors zu einer Aktivierung eines intrazellulären Komplexes, der aus den Adapterproteinen FADD, FLASH und der Procaspase-8 besteht. Diese Bindung führt zur Rekrutierung mehrerer Procaspasen-8 und resultiert in einer gegenseitigen Spaltung und Aktivierung. Um die Rolle dieses Signalweges für die F-vermittelte Apoptose zu untersuchen, wurden dominant-negative Mutanten des Fas-R und des Adapterproteins FADD hergestellt, indem die Todesdomäne deletiert und durch Flag-Epitope ersetzt wurden. Diese Konstrukte wurden stabil in MDCK-(hF-GFP)-Zellen exprimiert. Die Expression des F-Proteins wurde für 48 Stunden induziert und das Flag-Epitop des Rezeptors bzw. des Adapterproteins FADD mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers nachgewiesen (Abbildung 34). In der Immunfluoreszenz zeigte der Fas-R in Abwesenheit des F-Proteins eine wabenförmige Verteilung. Diese Verteilung weist auf eine, für den Rezeptor bereits beschriebene laterale Lokalisation hin (Tan & Hunziker, 2003). Nach Induktion der hF-GFP-Expression konnte eine Hemmung der Apoptose aufgrund der konstitutiven Expression der Fas-R-DN-Mutante nicht festgestellt werden (F). Vielmehr schien die Expression des F-Proteins zu einem Abbau des Rezeptors zu führen (E). FADD wurde in Abwesenheit des F-Proteins im Cytoplasma nachgewiesen (H). Die Expression des hF-GFP führte trotz Expression der FADD-DN Mutante zu einem signifikanten Verlust an MDCK-(hF-GFP)-Zellen (J) und einer deutlichen

DNA-Fragmentierung (L). Dieses Ergebnis weist daraufhin, dass der Fas-R und das Adapterprotein FADD in der F-Protein-vermittelten Apoptose keine Rolle spielen.

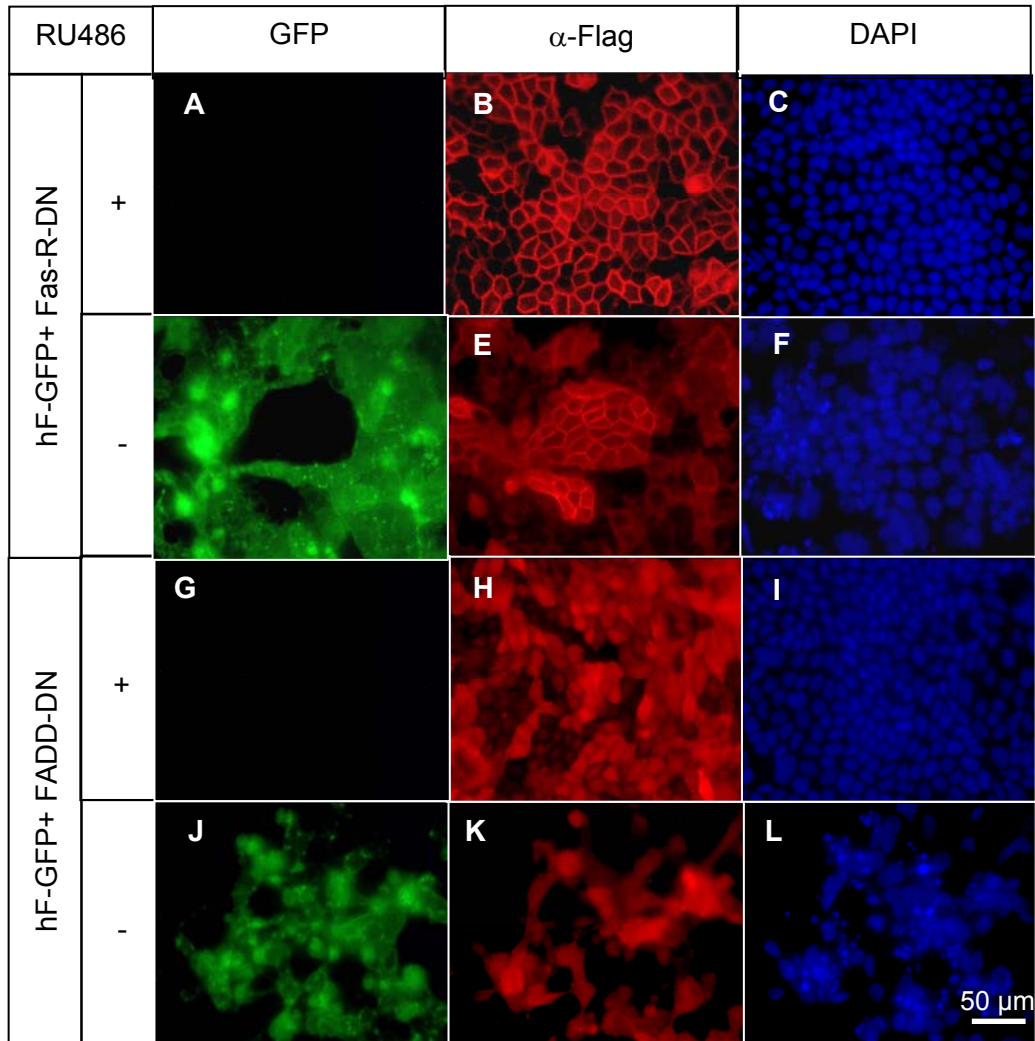


Abbildung 34: Stabile Expression der DN-Mutanten des Fas-R und des FADD in MDCK-(hF-GFP)-Zellen. Die mit einem Flag-Epitop versehenen Proteine wurden mit Hilfe eines α -Flag-Antikörpers 48 Stunden nach Zugabe des Induktors RU486 gefärbt. Die Kontrollzellen erhielten keinen Induktor.

5.15 Synagis hemmt die Apoptose nach Infektion mit RSV

Die Einzelexpressionsstudien des RSV F-Proteins zeigten, dass in Abwesenheit weiterer viraler Proteine Apoptose induziert wird, welches durch Synagis inhibiert werden kann. Nun sollte untersucht werden, ob das F-Protein im Kontext einer RSV-Infektion ebenfalls zur Apoptose der infizierten Zellen beiträgt. Die Infektionsstudien wurden mit der humanen Lungenkarzinomzelllinie A549 durchgeführt. Diese Zelllinie wird bereits seit längerem zur Untersuchung RSV-induzierter Signalwege verwendet (Bitko & Barik, 2001; Fleming *et al.*, 2006; Kotelkin *et al.*, 2003; O'Donnell D *et al.*, 1999; Takeuchi *et al.*, 1998; Thomas *et al.*,

2000). Die A549-Zellen wurden mit RSV (Stamm A2) mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 3 Plaque-bildenden Einheiten (Pfu/Zelle) inokuliert, was zu einer Infektion von mehr als 90 % der Zellen führte (Abbildung 35 A). Im Gegensatz zu nicht-infizierten A549-Zellen konnte bereits 24 Stunden nach Infektion eine größere Anzahl an flotierenden Zellen im Kulturüberstand nachgewiesen werden, die 48 und 72 Stunden nach Infektion drastisch anstieg (B). Die Behandlung der Zellen mit den Caspase-Inhibitoren z-VAD (Pan-Caspase-Inhibitor), z-IETD (Caspase-8-Inhibitor) und z-LEHD (Caspase-9-Inhibitor) reduzierte die Zahl flotierender Zellen im Überstand, wobei der Pan-Caspase-Inhibitor die stärkste Wirkung aufwies. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass auch im Kontext einer RSV-Infektion ein Zellverlust stattfindet, der auf einen apoptotischen Prozess zurückzuführen ist.

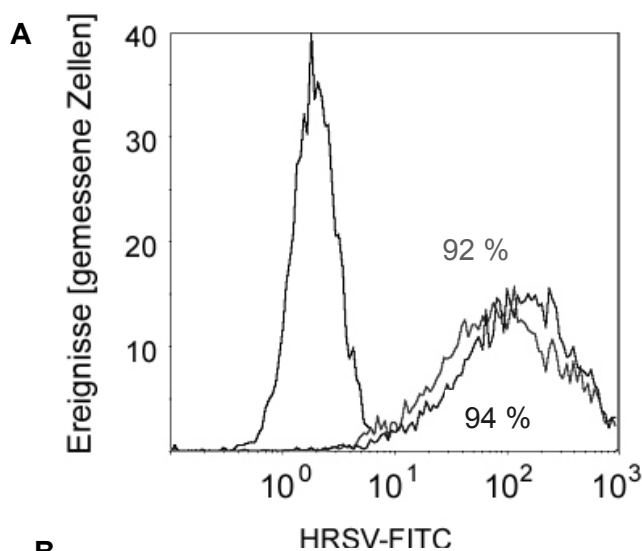
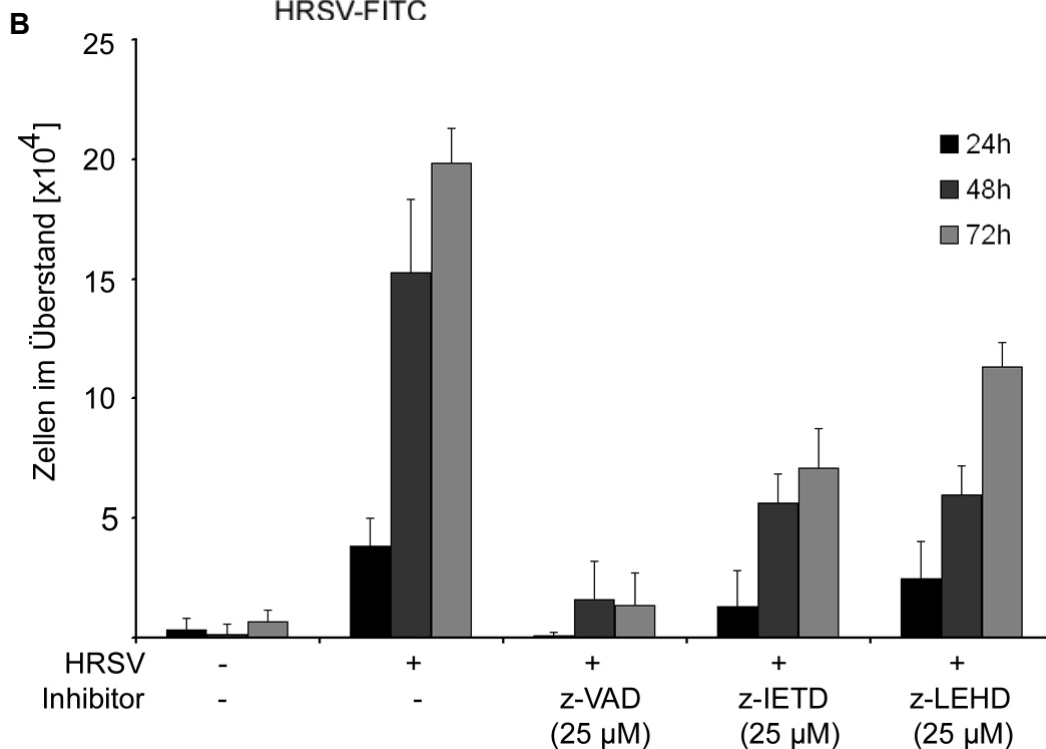


Abbildung 35: Caspase-Inhibitoren hemmen den Zellverlust nach RSV-Infektion. A549-Zellen wurden mit einer MOI von 3 infiziert. Zusätzlich erfolgte die Zugabe von unterschiedlichen Inhibitoren in der angegebenen Konzentration, acht Stunden nach Infektion. Jeweils 24, 48 und 72 Stunden nach Infektion wurde das Medium abgenommen und die darin enthaltenen flotierenden Zellen mit der Neubauer-Kammer gezählt (B).



Einen weiteren Hinweis auf eine HRSV-vermittelte Apoptose ergab die Färbung der A549-Zellen 48 Stunden nach Infektion, mit dem TUNEL- und DAPI-Reagenz (Abbildung 36).

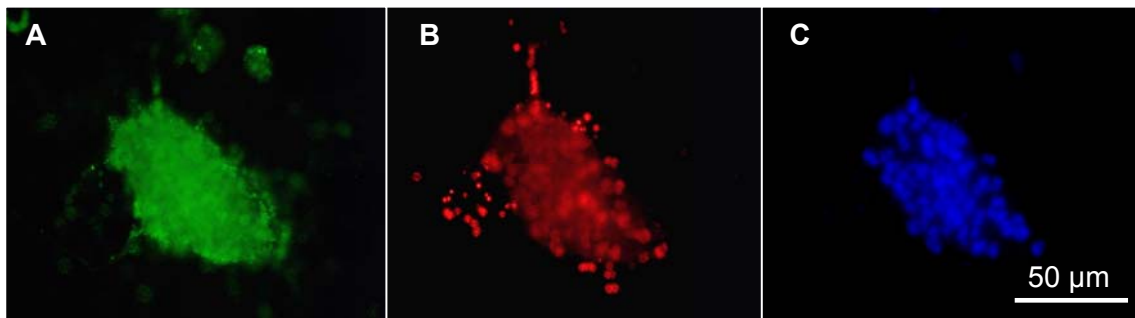


Abbildung 36: DNA-Fragmentierung 40 Stunden nach HRSV-Infektion. A549-Zellen wurden mit einer MOI von 3 für drei Stunden infiziert. Nach 40 Stunden wurden die Zellen mit dem TUNEL- und DAPI-Reagenz gefärbt. Der Nachweis der Infektion erfolgte mit einem polyklonalen α -RSV-FITC Antikörper.

Im Falle einer Influenza A-Virus-Infektion konnte gezeigt werden, dass die Apoptose essentiell für die Replikation des Virus ist (Wurzer *et al.*, 2003). Daher sollte auch hier untersucht werden, ob die Apoptose für RSV von Vorteil ist. Dazu wurden A549-Zellen mit RSV (MOI von 3) für drei Stunden infiziert und der *Pan*-Caspase-Inhibitor z-VAD acht Stunden nach Infektion zugegeben. Die Virustiter im Zellkulturüberstand wurden 48 Stunden später ermittelt (Abbildung 37). Die erhaltenen Virustiter ergaben, dass der Caspase-Inhibitor keinen Einfluss auf die Virus-Replikation hatte.

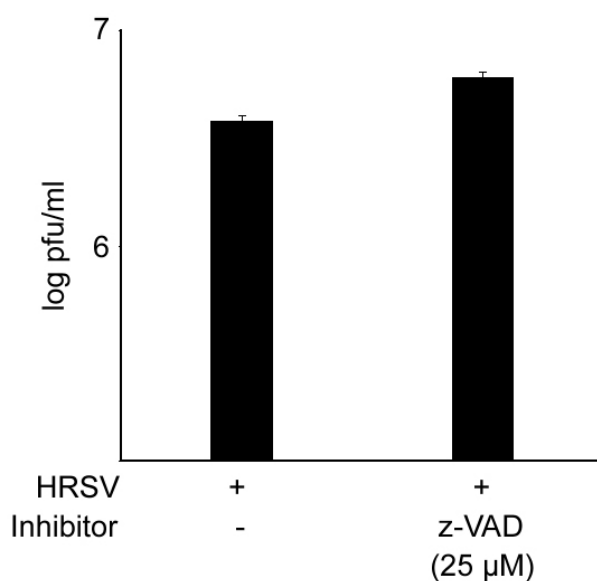


Abbildung 37: Die Apoptose hat keinen Einfluss auf die RSV-Replikation. A549-Zellen wurden mit RSV infiziert (MOI von 3) und acht Stunden nach Infektion mit z-VAD in der angegebenen Konzentration behandelt. Die Bestimmung der Virustiter erfolgte 48 Stunden nach Infektion.

Um die Bedeutung des F-Proteins für die Apoptose infizierter A549-Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen acht Stunden nach der Infektion (MOI von 3) mit dem monoklonalen Antikörper Synagis oder dem RhoA-Kinase Inhibitor Y-27632 behandelt. Durch die zeitlich versetzte Zugabe des monoklonalen Antikörpers wurde sichergestellt, dass die Infektion der Zellen nicht beeinträchtigt wurde (Abbildung 35 A). Die Anzahl der flotierenden Zellen im Zellkulturüberstand wurde 24, 48 und 72 Stunden nach Infektion mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt (Abbildung 38). Die Behandlung mit Synagis als auch mit dem RhoA-Kinase Inhibitor Y-27632 führte zu einer Reduktion der flotierenden Zellen im Überstand, wobei die cytoprotektive Wirkung von Synagis deutlich besser war als die von Y-27632.

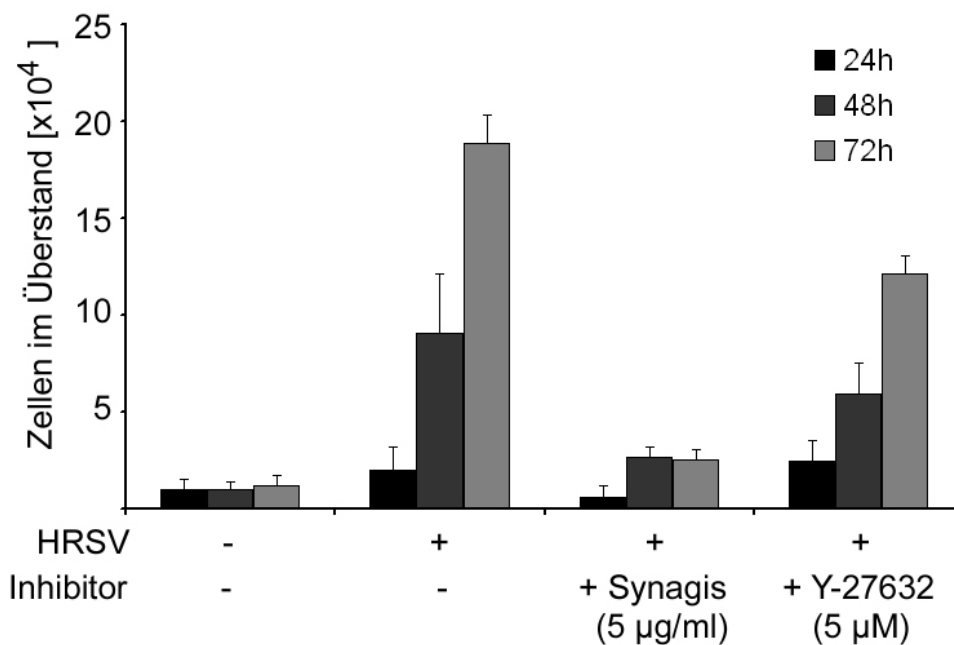


Abbildung 38: Synagis hemmt den Verlust infizierten Zellen. Die Infektion der A549-Zellen erfolgte mit einer MOI von 3. Acht Stunden nach Infektion wurde der Antikörper Synagis oder der RhoA-Kinase Inhibitor (Y-27632) in der angegebenen Konzentration zugegeben. Flotierende Zellen wurden 24, 48 und 72 Stunden nach Infektion im Zellkulturüberstand mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt.

Wenn die Caspase-3/7-Aktivität 40 Stunden nach der Infektion gemessen wurde, so konnte eine erhebliche Steigung der Aktivität im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollzellen nachgewiesen werden. Die Caspase-Inhibitoren (z-VAD, z-IETD, z-LEHD) konnten diesen vollständig unterbinden. Synagis und Y-27632 unterdrückten ebenfalls die Caspase-3-Aktivität jedoch nicht so wirkungsvoll wie die Caspase-Inhibitoren (Abbildung 39).

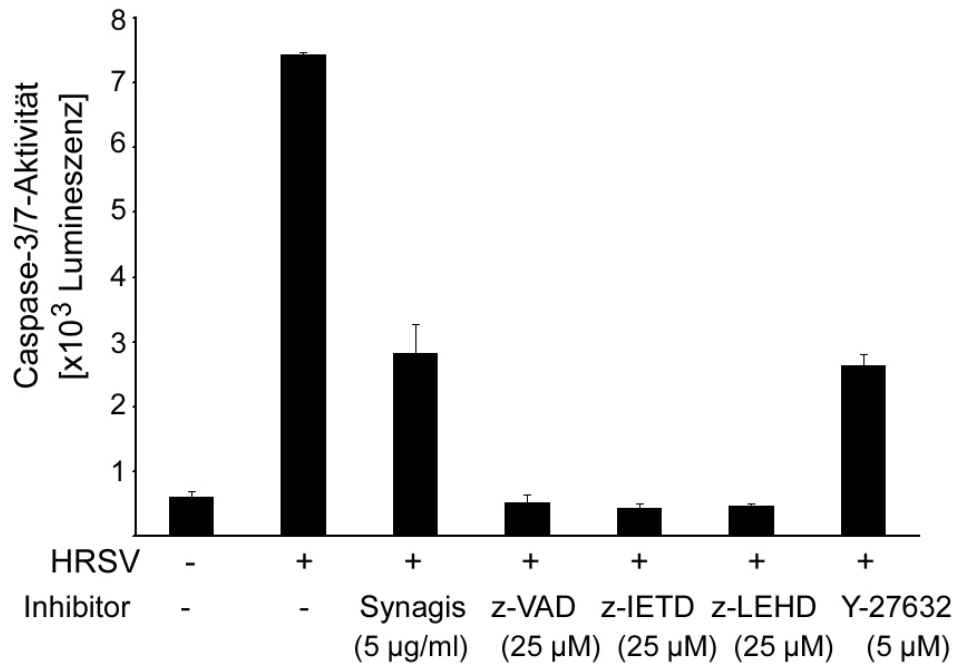


Abbildung 39: Aktivierung der Caspase-3/7-Aktivität nach HRSV-Infektion. A549-Zellen wurden mit einer MOI von 3 für drei Stunden inokuliert. Acht Stunden nach Infektion wurden einige Ansätze zudem mit verschiedenen Inhibitoren in den angegebenen Konzentrationen versetzt. Die Messung der Caspase-3/7-Aktivität erfolgte 40 Stunden nach der Infektion.

Diese Ergebnisse sind ein deutlicher Hinweis darauf, dass die RSV-vermittelte Apoptose vor allem durch das F-Protein induziert wird.

5.16 Steigerung der transkriptionellen Aktivität des Transkriptionsfaktors p53 nach Infektion von A549-Zellen

Die nach Einzelexpression des F-Proteins beobachtete transkriptionelle Aktivität des p53 sollte auch im Kontext einer Infektion untersucht werden. A549-Zellen wurden hierfür mit dem Gen für die „firefly“-Luziferase unter Kontrolle verschiedener cis-aktiver-Elemente transfiziert und 24 Stunden später mit RSV infiziert. Die Messung der Luziferaseaktivität erfolgte 24 Stunden nach Infektion (Abbildung 40). Die Infektion von A549-Zellen führte zu einer signifikanten Steigerung der transkriptionellen p53-Aktivität. Die anderen Promotorelemente zeigten hingegen keine wesentliche Änderung ihrer transkriptionellen Aktivität. Dieses Ergebnis zeigt, dass die transkriptionelle Aktivität des Transkriptionsfaktors p53 sowohl in Zellen, die das F-Protein exprimierten, als auch in RSV-infizierten Zellen gesteigert ist.

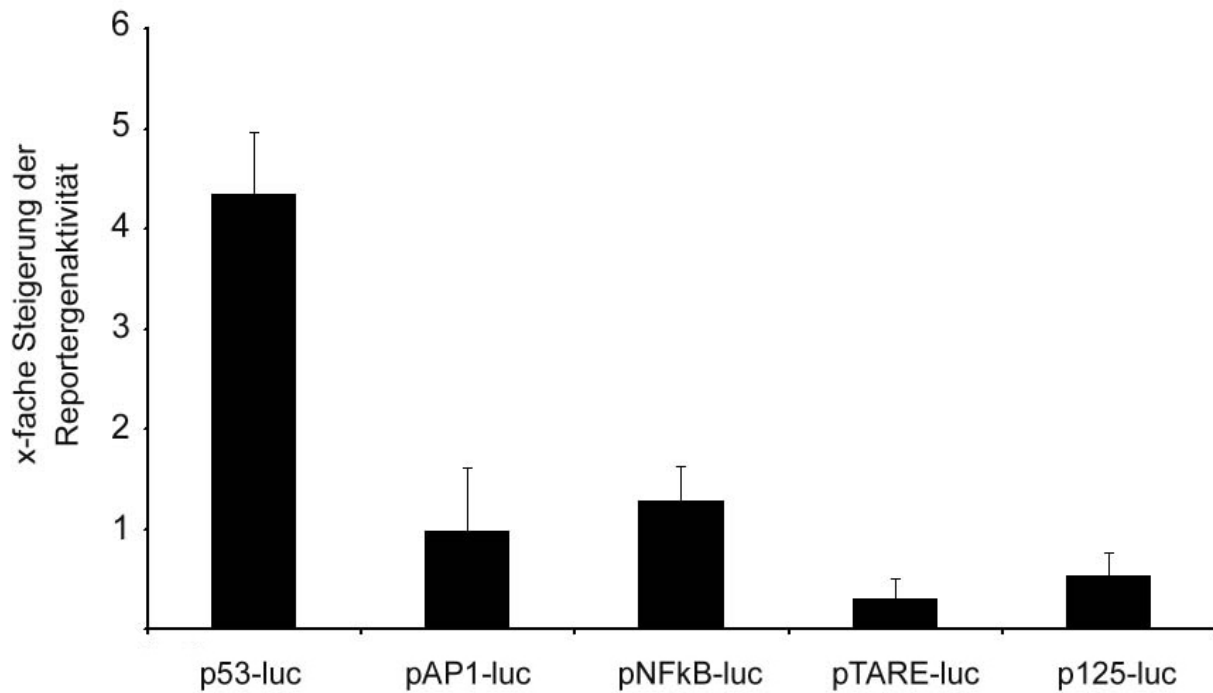


Abbildung 40: Transkriptionelle Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53 nach Infektion.

Nach Transfektion von A549-Zellen mit verschiedenen cis-aktiven Elementen (p53-luc, pAP1-luc, pNF- κ B-luc, pTARE-luc und p125-luc) erfolgte nach 24 Stunden eine dreistündige Inokulation der Zellen mit RSV (MOI von 3). 24 Stunden nach Infektion wurde die Luziferase-Aktivität gemessen. Die x-fache Steigerung der transkriptionellen Aktivität bezieht sich auf die Werte nicht infizierter Zellen.

Um einen Hinweis auf die funktionelle Bedeutung von p53 für die RSV-vermittelte Apoptose zu erhalten, wurden transgene A549-Zelllinien hergestellt, die eine dominant-negative Mutante des p53 (p53-DN) oder p53-spezifische „small hairpin“ RNA (siRNA-p53sh) konstitutiv exprimierten. Die Expression der p53-DN-Mutante sollte zu einer Hemmung der transkriptionellen Aktivität des endogenen p53 führen, die Expression der gegen das p53 gerichteten shRNA sollte dagegen die Ubiquitylierung und Degradation des p53 veranlassen. Als Kontrolle dienten transgene A549-Zelllinien, die die entsprechenden Kontrollplasmide konstitutiv exprimierten. Die Zelllinien wurden mit HRSV (MOI von 3) für 3 Stunden inokuliert. Nach 40 Stunden erfolgte die Messung der Caspase-3/7-Aktivität (Abbildung 41). In Zellen, die mit den Kontrollplasmiden pIRESneo und psiRNA-luc transfiziert worden waren konnte eine erhebliche Steigerung der Caspase-3/7-Aktivität nachgewiesen werden. In Zellen, die mit p53-DN worden waren, war dagegen die Caspase-3/7-Aktivität um mehr als 50% reduziert (Abbildung 41 A). Die Verwendung von shRNA hatte ebenfalls eine signifikante Reduktion der Caspase-3/7-Aktivität zur Folge (Abbildung 41 B).

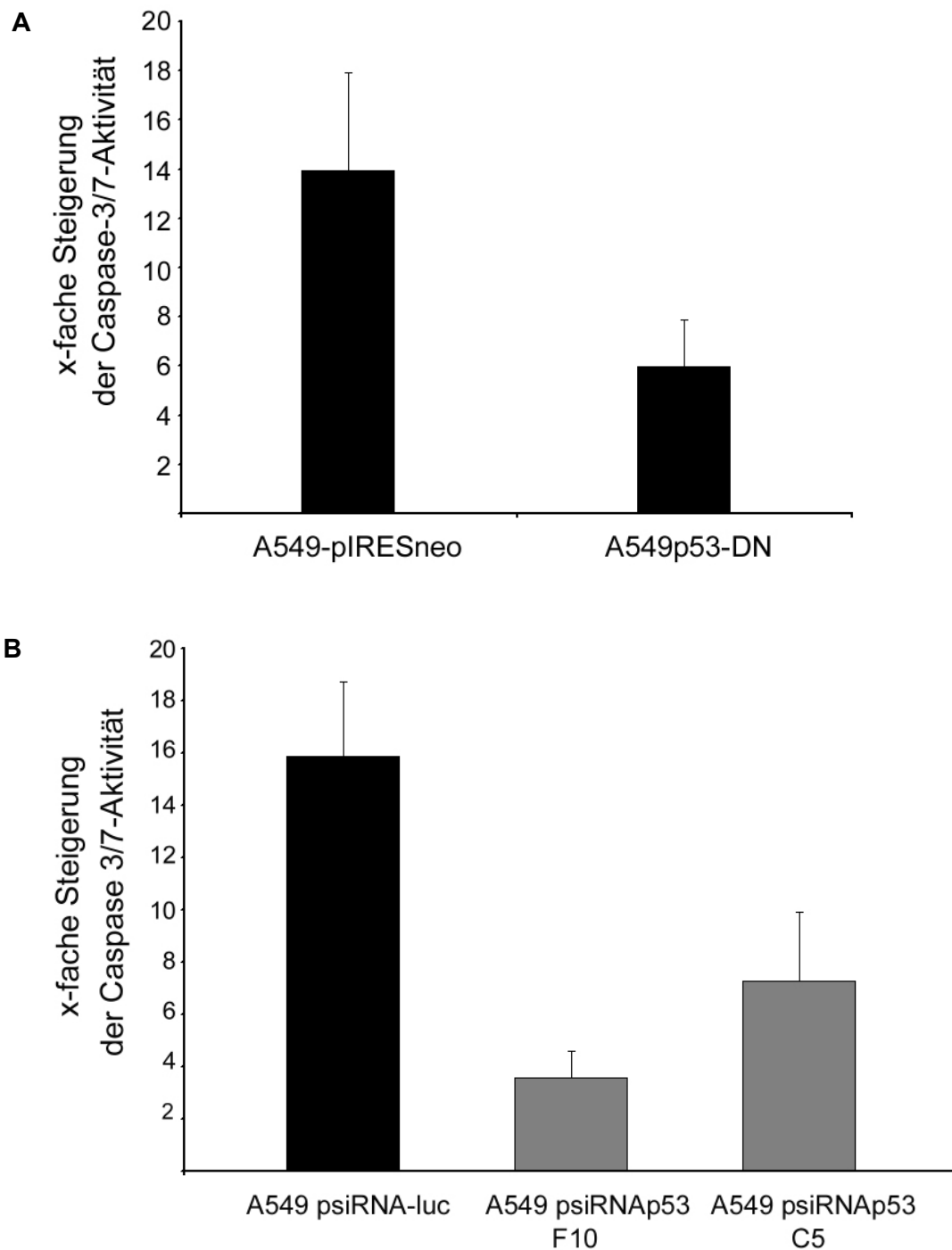


Abbildung 41: Verminderte Caspase-3/7-Aktivität nach Infektion transgener A549-(p53-DN)- und A549-(sh-p53)-Zellen. Die transgenen Zelllinien wurden für 5 Stunden mit HRSV (MOI von 3) infiziert und die Caspase-3/7-Aktivität 40 Stunden nach Infektion bestimmt und in Bezug zu den ermittelten Werte der nicht infizierten Zellen gesetzt.

Viele Tumorzellen besitzen meist eine mutierte Form des p53. Bei HEP-2-Zellen führt die Transformation mit dem E6-Protein des humanen Papillomavirus 18 zu einer Ubiquitylierung und Degradation des p53 (Thomas *et al.*, 1996a; Thomas *et al.*, 1996b).

Diese Zelllinie stellt also eine gute Möglichkeit dar, die Rolle des p53 in der RSV-vermittelten Apoptose zu untersuchen. Tatsächlich konnte nach Infektion dieser Zelllinie mit HRSV (MOI von 3) nur eine geringe Steigerung der Caspase-Aktivität beobachtet werden, obwohl nahezu alle Zellen infiziert worden waren (Abbildung 42).

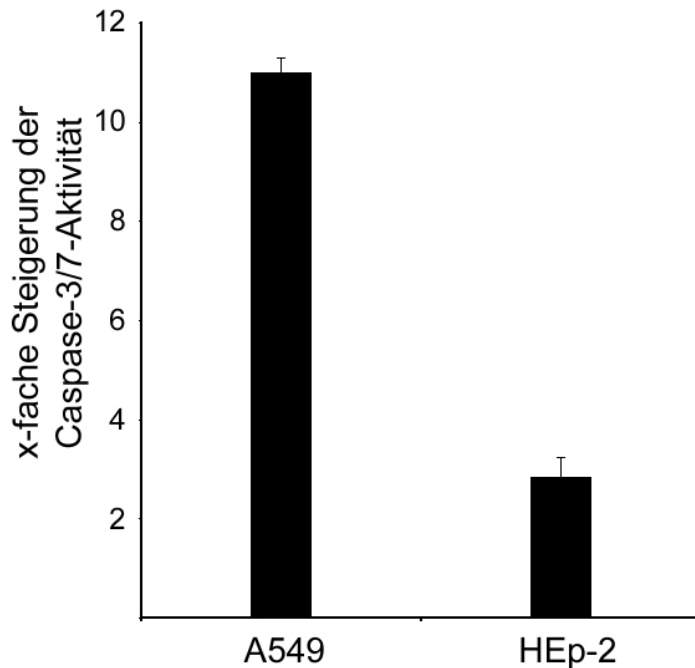


Abbildung 42: Infektion der HEp-2-Zellen weist nur geringe Caspase-Aktivität auf.

Die Zelllinien HEp-2 und A549 wurden für drei Stunden mit einer MOI von 3 mit HRSV (A2-Stamm) infiziert und die Caspase-3/7-Aktivität 40 Stunden später im Zelllysat bestimmt. Die Steigung wurde in Bezug auf die Werte nicht infizierter Zellen ermittelt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass p53 in die RSV-vermittelte Apoptose involviert ist, die maßgeblich durch das F-Protein ausgelöst wird.

6. Diskussion

6.1 Verteilung von Virokinin und seiner Rezeptoren in polarisierten Epithelzellen

In polarisierten Epithelzellen wird RSV durch einen Knospungsprozess an der apikalen Membran freigesetzt (Brock *et al.*, 2003; Roberts *et al.*, 1995). Sollte das Virokinin als proteolytisches Produkt des F-Proteins ebenfalls apikal sezerniert werden könnte es seine Wirkung nur entfalten, wenn entsprechende Rezeptoren ebenfalls an der apikalen Membran vorhanden wären. Um die Wirkung des Virokinins auf seine Rezeptoren in polarisierten Epithelzellen zu untersuchen, wurden transgene MDCK-Zelllinien hergestellt, die das bovine RSV F-Protein oder einen der drei Tachykininrezeptorsubtypen induzierbar exprimierten. Hierbei konnte gezeigt werden, dass das Virokinin ungerichtet sezerniert wird, während die drei Tachykininrezeptoren an der basolateralen Membran exprimiert werden, so dass eine autokrine Wirkung möglich ist. Darüber hinaus könnte Virokinin auch parakrin auf andere unterhalb des Epithels liegenden Zellen, z.B. auf neuronale Zellen wirken, wobei es über einen cholinergen Signalweg zur Bronchokonstriktion und Husten führen könnte.

Die Untersuchung des RSV F-Proteins in polarisierten Epithelzellen zeigte, dass das Protein hauptsächlich zur apikalen Membran transportiert wird. Dieser Befund steht im Einklang mit früheren Berichten (Brock *et al.*, 2005) und stimmt mit der beschriebenen apikalen Freisetzung von RSV aus Epithelzellen überein (Brock *et al.*, 2003). Polarisierte Zellen, z.B. Neuronen und Epithelzellen, besitzen Sortiermechanismen, die gewährleisten, dass die Oberflächenproteine an die jeweilige Plasmamembrandomäne transportiert werden. Der Transport von Membranproteinen vom Typ I ist heute am besten untersucht. Die Sortierungssignale für einen basolateralen Transport liegen meist in der cytoplasmatischen Domäne und sind gut charakterisiert (Folsch *et al.*, 1999; Hunziker *et al.*, 1991; Matter *et al.*, 1992; Matter *et al.*, 1994). Für den apikalen Transport sind dagegen sehr unterschiedliche Signale beschrieben worden, die der Ektodomäne, dem Membrananker oder der cytoplasmatischen Domäne zugeordnet wurden (Matter *et al.*, 1992; Matter *et al.*, 1994). Für das RSV F-Protein wurde mit Hilfe von chimären Proteinen gezeigt, dass die Transmembrandomäne ein apikales Sortierungssignal darstellt, das unabhängig von der Ektodomäne zu einem apikalen Transport des Proteins in polarisierten Epithelzellen führt (Brock *et al.*, 2005). Das bovine RSV F-Protein wurde in dieser Arbeit im Unterschied zum humanen RSV F-Protein in geringen Mengen auch an der basolateralen Plasmamembran nachgewiesen. Dies ist möglicherweise auf die Unterschiede innerhalb der Transmembrandomäne beider Proteine zurückzuführen.

Das F-Protein wird am Cystein 550 durch Acylierung posttranslational modifiziert (Arumugham *et al.*, 1989). Interessanterweise fehlt dem verwendeten bovinen RSV F-Protein (Stamm Stormond) im Gegensatz zum humanen RSV F-Protein, das für die Acylierung benötigte Cystein. Mehrere in der cytoplasmatischen Domäne des aviären Influenzavirus HA-Proteins lokalisierte Acylierungen spielen bei der Assoziation des Proteins mit „Lipid rafts“ eine große Rolle (Wagner *et al.*, 2005). Diese Mikrodomänen sind auch am apikalen Transport von Membranproteinen beteiligt (Simons & Ikonen, 1997). Für das HRSV F-Protein ist eine Assoziation mit diesen Membrandomänen bereits beschrieben worden (Fleming *et al.*, 2006). Ein Fehlen der Acylierung könnte also bei dem verwendeten bovinen RSV F-Protein zu einer nicht so strengen apikalen Sortierung führen. Weitere Studien unter Verwendung von chimären Proteinen sind notwendig um die Ursache der unterschiedlichen Verteilung der beiden RSV F-Proteine zu klären.

Mit Hilfe eines kompetitiven ELISAs und Translokationsstudien konnte gezeigt werden, dass Virokinin offenbar ungerichtet sezerniert wird, sich also anders verhält als das Membranprotein, aus welchem es durch proteolytische Spaltung freigesetzt wurde. Hieraus muss man folgern, dass die Prozessierung des Vorläufers F₀ im Trans-Golgi-Netzwerk noch vor der Sortierung in die apikalen und basolateralen Vesikeln erfolgen muss. Im Gegensatz zu zellulären Tachykininen wird das Virokinin N-glykosyliert (Zimmer *et al.*, 2001a). In einer früheren Arbeit wurde postuliert, dass die N-Glykosylierung ein apikales Transportsignal sezernierter Proteine darstellt (Scheiffele *et al.*, 1995). In diesen Studien wurde gezeigt, dass das glykosylierte Protein über die apikale Plasmamembran sezerniert wurde, die Sekretion des nicht-glykosylierten Proteins jedoch ungerichtet stattfand. Demnach hätte die N-Glykosylierung des Virokinins ebenfalls zu einer apikalen Sekretion führen müssen. Eine mögliche Erklärung für das vorliegende Ergebnis liegt in dem Vorhandensein von apikal lokalisierten, zellulären Endoproteasen wie z.B. der Neutralen Endopeptidase oder dem „angiotensin-converting-enzyme“ (ACE), die zu einem Abbau von Tachykininen führen können (Joos *et al.*, 2000). Falls dies tatsächlich der Fall ist, würde der Abbau von apikal sezerniertem Virokinin zu dem Eindruck führen, dass das Virokinin ungerichtet sezerniert wird. Zukünftige Studien mit spezifischen Inhibitoren sollten Aufschluss über die Funktion einzelner Endoproteasen im Abbau von Virokinin geben.

Mit Hilfe der transgenen MDCK-Zelllinien, die induzierbar jeweils einen der drei Tachykininrezeptorsubtypen exprimierten, konnte zum ersten Mal die vorwiegend basolaterale Lokalisation der Rezeptoren in polarisierten Epithelzellen gezeigt werden. Die Sortierung von Proteinen mit mehreren Transmembrandomänen ist, im Gegensatz zu der Sortierung von Membranproteinen des Typ I, nur wenig verstanden. Für die G-Proteingekoppelten Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen sind sowohl Beispiele für apikalen als auch basolateralen Transport bekannt. So wird der Rhodopsin-Rezeptor in

polarisierten MDCK-II-Zellen apikal transportiert, nach Deletion des C-terminalen Domäne ist er dagegen gleich verteilt (Chuang & Sung, 1998). Bei dem Follikel-stimulierenden-Hormonrezeptor (FSH-Rezeptor) führt ein einfaches Tyrosin-haltiges Motiv zu einer hauptsächlich basolateralen Expression des Rezeptors (Beau *et al.*, 1998). Bei dem alpha-adrenergen Rezeptor sind mehrere transmembrane Regionen für den basolateralen Transport verantwortlich (Saunders *et al.*, 1998). Weiterhin wurde eine Dominanz basolateralen gegenüber apikalen Sortiersignalen beschrieben (Brown & Stow, 1996). Beim Tachykininrezeptor-1 liegen in der cytoplasmatischen Domäne verschiedene Tyrosin-Motive vor. Ihre Bedeutung für den basolateralen Transport soll in zukünftigen Studien untersucht werden.

6.2 Virokinin führt zur transkriptionellen Aktivität

Die Bindung eines Liganden an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren führt zur Aktivierung unterschiedlicher Signalwege. Die durch die Bindung ausgelöste Konformationsänderung des Rezeptors resultiert in einem Austausch von GDP gegen GTP in der mit dem Rezeptor assoziierten $G\alpha$ -Untereinheit. Daraufhin dissoziiert die $G\alpha$ -Untereinheit vom Rezeptor und führt – abhängig vom Typ der $G\alpha$ -Untereinheit - zu einer Aktivierung bzw. Inhibierung unterschiedlicher Effektorproteine und nachfolgender Signalwege. Hierbei spielen G-Protein-Rezeptor Kinasen (GRK) und β -Arrestine eine entscheidende Rolle (Lefkowitz *et al.*, 1992).

Die Zugabe von konditioniertem Überstand zu MDCK-(TACR-1-GFP)-Zellen führte zu einer Internalisierung des Rezeptors, wie sie auch für zelluläre Tachykinine beschrieben wurde (Barak *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1999). Die Endozytose fand jedoch nur nach Behandlung der basolateralen Plasmamembran mit dem entsprechenden Tachykinin statt, nicht aber nach apikaler Zugabe des Peptidhormons. Für das zelluläre Tachykinin Substanz P konnte gezeigt werden, dass die Bindung an den Tachykininrezeptor-1 eine Translokation von β -Arrestin an die Plasmamembran zur Folge hat und zur Endozytose des Rezeptors führt (McConalogue *et al.*, 1999; Schmidlin *et al.*, 2002). β -Arrestin besitzt hierbei unterschiedliche Funktionen. Einerseits stellt es ein Adapterprotein für Clathrin und AP-2 dar, und kann so zu einer Clathrin-vermittelten Endozytose führen (Goodman *et al.*, 1996; Goodman *et al.*, 1997). Andererseits stellen β -Arrestine ein molekulares Gerüst dar, das Komponenten der Mitogen-aktivierten-Proteinkinase-Kaskade, wie z.B. Src und Raf-1 zu dem internalisierten Rezeptorkomplex rekrutiert und so die subzelluläre Lokalisation und Funktion von aktivierten ERK1/2 (*extrazellular signal regulated kinase 1 and 2*) beeinflusst (Defea *et al.*, 2000; Ferguson *et al.*, 1996; Ferguson *et al.*, 1998; Ferguson, 2001; Krupnick & Benovic, 1998). Die Aktivierung weiterer Signalwege kann zudem über die heterotrimeren G-Proteine erfolgen. Bis heute sind zahlreiche unterschiedliche trimere G-Proteine bekannt, die nach

Entkopplung von dem jeweiligen G-Protein-gekoppelten Rezeptor auf verschiedene Effektorproteine, wie z.B. der Adenylat-Zyklase, der Phospholipase C β und Ionenkanälen, wirken können (Tabelle 5).

	Effektorprotein	<i>second messenger</i>
G α_s	stimuliert Adenylatzyklase	cAMP
G α_i	hemmt Adenylatzyklase Öffnung von Kaliumkanälen	keine cAMP-Bildung Änderung des Membranpotenzials
G $\alpha_{q/o}$	stimuliert Phospholipase C	Inositol-1,4,5-triphosphat; 1,2-Diacylglycerin
G α_{12}	Stimuliert RasGAP (GTPase aktivierendes Protein)	
G α_{13}	Stimuliert die RhoGEF-Aktivität	

Tabelle 5: Eigenschaften der unterschiedlichen G α -Untereinheiten.

(abgeändert aus Gomperts, Kramer, Tatham, Signal transduction, 2004.)

Die Messung der transkriptionellen Aktivität von BHK-21-(rTACR1)-Zellen nach Behandlung mit synthetischem Virokinin wies eine Aktivierung des „cAMP-response“- (CRE) und des „Serum-response“-Elementes (SRE) auf. Die Aktivierung von CRE kann darauf zurückgeführt werden, dass TACR-1 in diesen Zellen mit einer G α_s -Untereinheit assoziiert ist, was zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase und zur Bildung von cAMP führt. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass Substanz P abhängig von dem jeweiligen Gewebe die Bildung von cAMP stimuliert (Hunter & Picton, 1999; Narumi & Maki, 1978; Yamashita *et al.*, 1983) oder inhibiert (Laniyonu *et al.*, 1988). Diese Studien weisen daraufhin, dass das Virokinin abhängig von dem jeweiligen Gewebe zu einer Aktivierung unterschiedlicher G α -Untereinheiten führen kann. Der Nachweis einer transkriptionellen Aktivität des SRE nach Behandlung der Zellen mit Virokinin könnte auf verschiedenen Mechanismen beruhen. Es könnte auf die G $\beta\gamma$ -Untereinheiten zurückzuführen sein, die eine Aktivierung des MAPK-Signalweges bewirken können (Gudermann, 2001; Hawes *et al.*, 1995; Lallemand *et al.*, 2003; van Biesen *et al.*, 1996). Weiterhin kann die Aktivierung des Rezeptors über β -Arrestin auch zur Aktivierung der ERK1/2 führen (DeFea *et al.*, 2000a). Zudem ist eine Transaktivierung des EGF-Rezeptors („epidermal growth factor“) durch Substanz P beschrieben worden, was ebenfalls zu einer Aktivierung des MAPK-Signalweges führen kann (Koon *et al.*, 2004).

Die Rolle des Virokinins im Kontext einer RSV-Infektion ist bis heute nicht geklärt. Die in der Folge einer BRSV-Infektion beobachteten pathogenen Phänomene wie Bronchokonstriktion, Ödembildung, Histaminfreisetzung, vermehrte Schleimbildung und Lymphozyteninfiltration

des Gewebes können durch Tachykinine wie Substanz P ausgelöst werden (Joos, 2001; Joos & Pauwels, 2001), so dass es wahrscheinlich ist, dass Virokinin bei der Pathologie der RSV-Infektion eine Rolle spielt (Valarcher & Taylor, 2007; Zimmer *et al.*, 2003). Diese Hypothese wird durch Infektionsstudien im Rind unterstützt, wonach eine Infektion mit BRSV dessen pep27 deletiert war, zu einer verminderten Pathologie führte (Valarcher *et al.*, 2006). Tachykinine wirken aber auch antiapoptotisch und proliferativ (Bockmann *et al.*, 2001; DeFea *et al.*, 2000a; Dimri *et al.*, 2000). Die Wirkung des Virokinins könnte somit der RSV-vermittelten Apoptose entgegenwirken, zumindest in Zellen, die über die Tachykininrezeptoren verfügen. Weiterhin wurden Tachykinine mit dem Auftreten von Husten in Verbindung gebracht (Chapman *et al.*, 1998; El-Hashim & Amine, 2005; O'Connor *et al.*, 2004; Sekizawa *et al.*, 1995; Widdicombe, 1995). Sollte Virokinin während einer RSV-Infektion einen Hustenreflex auslösen, wie für das zelluläre Tachykinin Substanz P beschrieben (El-Hashim & Amine, 2005; Sekizawa *et al.*, 1995; Sekizawa *et al.*, 1996), würde dies vermutlich die Verbreitung des Virus unterstützen.

6.3 Das F-Protein induziert Apoptose

Frühere Studien haben gezeigt, dass nach einer Infektion mit HRSV sowohl humane primäre Epithelzellen als auch die humane Lungenkarzinom-Zelllinie A549 an Apoptose zugrunde gehen (Bitko & Barik, 2001; Kotelkin *et al.*, 2003). Die HRSV-vermittelte Apoptose konnte durch die Behandlung der infizierten A549-Zellen mit einem monoklonalen humanisierten Antikörper (Synagis, Palivizumab) gehemmt werden. Dies deutet darauf hin, dass das F-Protein eine dominierende Rolle bei der HRSV-vermittelten Apoptose spielt. Tatsächlich führte auch die Expression des F-Proteins in Abwesenheit anderer viraler Proteine zu einer fulminanten Apoptose der Epithelzellen, die ebenfalls mit Synagis unterdrückt werden konnte. Ob dies auf einer Hemmung der rezeptorbindenden Aktivität oder direkt auf der Hemmung der Fusionsaktivität des Proteins beruht, ist bis heute unklar. Eine Interaktion des RSV F-Proteins mit zellulären Apoptose-induzierenden Signalmolekülen ist durchaus möglich. Das F-Protein ist mit „Lipid rafts“ der Plasmamembran assoziiert (Fleming *et al.*, 2006), die als Plattform verschiedener Signalwege dienen (Simons & Toomre, 2000), möglicherweise auch solchen, die zur Apoptose führen.

Die Infektion von A549-Zellen führte rasch zur Akkumulation von flotierenden, fusionierten Zellen. In den Einzeldominanzstudien konnte ebenfalls die F-Protein-induzierte Bildung von Synzytien beobachtet werden, die relativ rasch apoptotisch wurden. Vor allem in den mehrkernigen Riesenzellen wurde eine Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors und Tumorsuppressors p53 an Serin 15 beobachtet werden. Die Verwendung eines Reportergenexperiments zeigte eine erhebliche Steigung der transkriptionellen Aktivität von p53. Die Hemmung der transkriptionellen Aktivität mittels einer dominant-negativen p53-

Mutante, sowie die Reduktion der p53-Expression durch „small hairpin“ RNA, führte in Infektionsstudien zu einer Hemmung der Apoptose in A549-Zellen. Ein weiterer Beleg für die Bedeutung des Tumorsuppressors für die RSV-vermittelte Apoptose konnte durch die Verwendung der HEP-2-Zelllinie erbracht werden. Diese Zelllinie ist mit dem E6-Protein des Papillomavirus HPV 18 transformiert, das zur Ubiquitinylierung und Abbau von p53 führt (Thomas *et al.*, 1996a; Thomas *et al.*, 1996b). Tatsächlich trat nach der Infektion dieser Zelllinie mit HRSV kaum Apoptose auf. Die Expression des humanen RSV F-Proteins in transgenen Calu3-Zellen, die wie viele permanente Zelllinien eine mutierte Form des p53 aufweisen (Polizzi *et al.*, 1999), führte ebenfalls nicht zur Apoptose.

Die Hemmung der RhoA-Kinase mit Hilfe des Inhibitors Y-27632 führte in MDCK-(hF-GFP)-Zellen zu einer signifikanten Reduktion der F-induzierten Apoptose. Die Bedeutung des RhoA-Signalweges als auch der RhoA-Kinase-Aktivität für die Bildung von Synzytien wurde bereits in früheren Studien beschrieben (Gower *et al.*, 2005; Pastey *et al.*, 1999). Die Fusion von Zellen durch das HIV-1 Glykoprotein Env führt ebenfalls zur Apoptose. Durch die konstitutive Expression einer dominant-negativen Mutante von RhoA (RhoN19) konnte die HIV-1 Env-Protein-vermittelte Fusion gehemmt werden (Pontow *et al.*, 2004). Die Wirkung des RhoA-Inhibitors Y-27632 könnte auch die Induktion der Apoptose selbst beeinflussen. So wurde berichtet, dass die RhoA/RhoKinase-Aktivitäten im Zusammenhang mit einer verstärkten Expression des proapoptotischen Proteins Bax stehen, welches nach Translokation zur Mitochondrienmembran eine Aktivierung proapoptotischer Signalwege in Cardiomyocyten induziert (Del Re *et al.*, 2007). Weiterhin wurde gezeigt, dass in MDCK-II-Zellen die Hemmung von RhoA-Kinase durch Y-27632 das Ausstoßen von proapoptotischen Zellen durch den Zellverband verhindert (Rosenblatt *et al.*, 2001). Darüber hinaus hat der RhoA-Signalweg einen Einfluss auf den Zellzyklus, indem er durch Suppression des CDK-inhibierenden Proteins p21^{waf/cip} die Aktivierung von Cyclinen bewirkt (Knight-Krajewski *et al.*, 2004; Olson *et al.*, 1998). Die Aktivierung von RhoA in F-induzierten Synzytien könnte zum Eintritt der Zellen in die Mitose und daraufhin in eine mitotische Katastrophe führen (Castedo & Kroemer, 2004; Castedo *et al.*, 2004b). Die Reduktion der F-vermittelten Apoptose durch den Inhibitor Y-27632 könnte somit auf verschiedene RhoA/Rho-Kinase Funktionen zurückzuführen sein.

Eine deutliche Reduktion der F-induzierten Apoptose konnte auch durch die Hemmung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) p38 mit dem spezifischen Inhibitor SB203580 erreicht werden. Hierbei führte der Inhibitor zu einer verminderten Phosphorylierung und zu einer reduzierten transkriptionellen Aktivität des p53. Diese p38-vermittelte Phosphorylierung des p53 spielt im Zusammenhang der HIV-1 Env-induzierten Apoptose ebenfalls eine entscheidende Rolle (Perfettini *et al.*, 2005a). Überhaupt bestehen zwischen der F-Protein-vermittelten Apoptose und der durch das HIV-1 Glykoprotein Env hervorgerufenen Apoptose

auffallende Ähnlichkeiten (Ferri *et al.*, 2000a; Ferri *et al.*, 2000b; Perfettini *et al.*, 2005b). Die Fusion von HIV-1 Env-exprimierenden Zellen mit Zellen, die sowohl den CD4-Rezeptor als auch den CXCR4 Rezeptor exprimieren, führt zur Bildung von Synzytien und zur Verschmelzung der Zellkerne (Karyogamie). Aufgrund dieser Karyogamie findet ein abortiver Eintritt in die Prophase der Mitose statt, welcher in einer transienten Aktivierung der Cyclin-abhängigen Kinase 1 (CDK1) und der darauffolgenden Permeabilisierung der Kernhülle resultiert (Castedo *et al.*, 2003; Castedo *et al.*, 2004a; Castedo *et al.*, 2004b). Zudem wurde eine Akkumulation des „mammalian target of Rapamycin“ (mTOR) beschrieben (Castedo *et al.*, 2002), welches zusammen mit der MAPK p38 zu einer Phosphorylierung und Aktivierung von p53 führt. Die p53-abhängige Aktivierung verschiedener proapoptotischer Proteine wie Bax und Puma führt dann zur Aktivierung des mitochondrialen Apoptoseweges (Abbildung 43). Tatsächlich konnte die aktive Form des proapoptotischen Proteins Bax auch nach Induktion der F-Protein-Expression in MDCK-Zellen nachgewiesen werden.

Die sowohl in Infektionsstudien als auch nach Einzelexpression des F-Proteins erhöhte Caspase-3/7-Aktivität konnte durch Verwendung des Pan-Caspase-Inhibitors z-VAD-fmk vollständig unterbunden werden. In gleicher Weise führte die spezifische Hemmung der Caspasen-8, -9 und -2 zu einer deutlichen Inhibition der Effektorcaspase-3. Interessanterweise wurde von anderen eine Verbindung zwischen der Caspase-2 und dem Tumorsuppressor p53 hergestellt. Danach kann p53 eine Aktivierung des „p53-induced protein with a death domain“ (PIDD) herbeiführen, welches wiederum einen Komplex mit dem Adapterprotein RAIDD und Caspase-2 bildet. Diese Komplexbildung resultiert in einer enzymatisch aktiven Caspase-2 (Cuenin *et al.*, 2007; Tinel & Tschopp, 2004; Tinel *et al.*, 2007), die wiederum Caspase-8 aktivieren kann. Diese führt über den mitochondrialen Apoptoseweg (Lin *et al.*, 2004) zum Cytochrom C-Ausstrom und zur Aktivierung der Caspase-9, welches auch die Aktivierung der Effektorcaspase-3 zur Folge hat (Abbildung 43).

Der Fas-Rezeptor, der ebenfalls eine Rolle in der Caspase-8-vermittelten Apoptose spielt, hatte keinen Einfluss auf die F-vermittelten Apoptose. Die Expression einer dominant-negativen Mutante des Fas-Rezeptors als auch einer dominant-negativen Variante des Fas-Adapterproteins FADD (Fas associated protein with death domain) in MDCK-(hF-GFP)-Zellen konnten die F-induzierte Apoptose nicht hemmen. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen führte die Expression einer dominant-negativen Mutante des FADD, in Infektionsstudien, zu keiner Reduktion der HRSV-induzierten Caspase-3-Aktivität (Bitko & Barik, 2001).

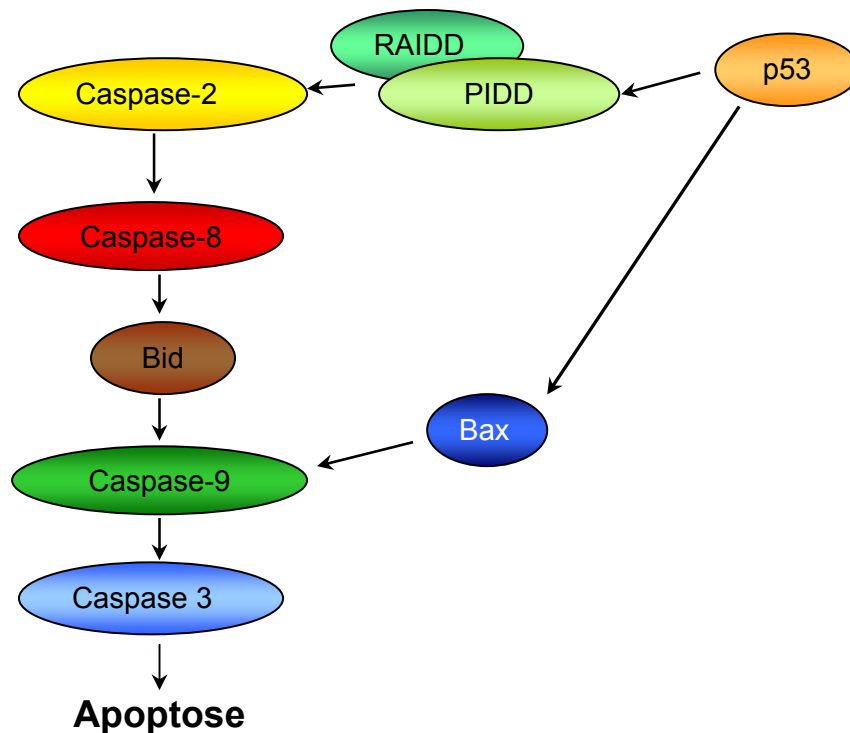


Abbildung 43: Schematische Darstellung einer möglichen Aktivierung der Apoptose-Mediatoren.

6.4 Regulation der Apoptose

Eine verfrühte Apoptose würde im Falle einer RSV-Infektion die Virusreplikation negativ beeinflussen. In früheren Studien wurden jedoch verschiedene RSV-induzierte antiapoptotische Mechanismen beschrieben, die die Apoptose verzögern können (Bitko *et al.*, 2007; Groskreutz *et al.*, 2007; Kotelkin *et al.*, 2003; Monick *et al.*, 2004). Die Sekretion des oben beschriebenen Virokinins ist möglicherweise ein weiterer antiapoptotischer Mechanismus des RSV, wobei zukünftige Studien diese Wirkung belegen müssen.

Der hauptsächlich apikale Transport des F-Proteins stellt eine weitere Möglichkeit dar, die Fusion und damit möglicherweise die Induktion der Apoptose hinauszuzögern, da das apikal lokalisierte F-Protein nicht mit dem entsprechenden Rezeptor der Nachbarzellen interagieren und so die Fusion induzieren könnte. Diese Hypothese könnte die stärkere proapoptotische Eigenschaft des bovinen RSV F-Proteins erklären, wonach das bovine RSV F-Protein im Gegensatz zu dem humanen RSV F-Protein bereits zu Beginn der Expression in geringen Mengen an der basolateralen Membran nachweisbar war. Jedoch auch im Falle des humanen RSV F-Proteins wurde später ein Verlust der Polarität und schließlich Apoptose beobachtet. Der Polaritätsverlust ist möglicherweise auf eine Aktivierung von RhoA durch das F-Protein zurückzuführen (Gower *et al.*, 2001; Pastey *et al.*, 1999). RhoA, ein kleines G-Protein, ist unter anderem an der Modulation des Aktinskeletts beteiligt (Bruewer *et al.*, 2004;

Bryan *et al.*, 2005; Jou *et al.*, 1998) und könnte so die F-Protein vermittelte Zell-Zell-Fusion unterstützen.

Neben dem Nachteil einer verfrühten Apoptose könnte diese zu einem späteren Zeitpunkt im Replikationszyklus Vorteile für das Virus haben. RSV-infizierte Zellen setzen nur wenig Virus frei, der größere Teil des Virus liegt zellassoziiert vor (Wechsler *et al.*, 1985). Das Ausstoßen proapoptotischer, infizierter Zellen in das Atemwegslumen könnte eine Verbreitung des zellassoziierten Virus verbessern. Der durch die Infektion hervorgerufene Verlust der epithelialen Polarität und damit der Verlust der Schutzfunktion würde zudem die vor kurzem beschriebene Ausbreitung des Virus in extrapulmonales Gewebe ermöglichen (Eisenhut, 2006). Schließlich ist es denkbar, dass RSV, das mit ausgestoßenen Zellen im Lumen der Atemwege assoziiert ist, durch Zellen des Immunsystems nur unzureichend bekämpft werden kann.

6.5 Bedeutung für die Pathologie

Histopathologische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Infektion mit RSV zu einer Verstopfung (Obstruktion) der Atemwege mit abgesondertem Schleim, Fibrin, sowie inflammatorischen- und abgelösten RSV- infizierten Zellen führen kann, einer bei Kleinkindern häufig auftretenden Komplikation nach RSV-Infektion (Aherne *et al.*, 1970; Johnson *et al.*, 2007).

Die Einzelexpression des F-Proteins als auch die Infektionsstudien in dieser Arbeit haben gezeigt, dass das Fusionsprotein Apoptose induziert, und die apoptotischen Zellen aus dem Zellverband ausgestoßen werden. Sollte dies in ähnlicher Weise in den Epithelien der Atemwege geschehen, so ist vermutlich dieser Prozess maßgeblich an der Obstruktion der Atemwege beteiligt. Das Ausstoßen von proapoptotischen Epithelzellen ist ein Aktin- und Myosin- vermittelter Mechanismus (Rosenblatt *et al.*, 2001). Die Verdrängung von apoptotischen Zellen aus dem Epithel bietet eine Erklärung dafür, dass in früheren Studien mit primären Epithelzellen keine offensichtliche Cytopathogenität von RSV beobachtet werden konnte (Zhang *et al.*, 2002).

RSV infiziert bevorzugt die Cilien-tragenden Epithelzellen (Zhang *et al.*, 2002). Der F-induzierte programmierte Zelltod dieser Zellen könnte zu einer verminderten „pulmonary clearance“ führen, die wiederum die Wahrscheinlichkeit für bakterielle Sekundärinfektion erhöht. Für die chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (COPD) wurde beschrieben, dass aufgrund einer ausgeprägten Apoptose, phagozytierende Zellen die apoptotischen Zellen nicht beseitigen können und diese daraufhin nekrotisch werden (Vandivier *et al.*, 2006). Diese sekundäre Nekrose führt zu der Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren. Es ist möglich, dass die F-induzierte Apoptose in ähnlicher Weise in eine sekundäre Nekrose

übergeht, die dann die für RSV-Infektionen typische Entzündung der Atemwege erklären könnte (Abbildung 44).

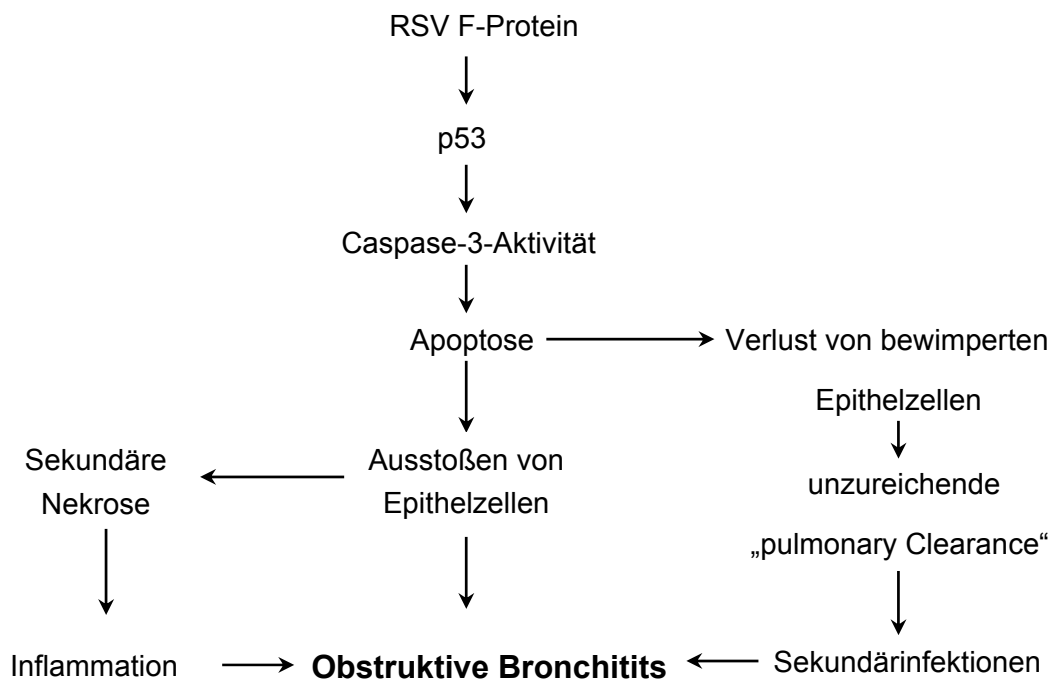


Abbildung 44: Schematische Darstellung der möglichen F-Protein-vermittelten Pathogenität.

6.6 Therapie

Der gegen das RSV F-Protein gerichtete monoklonale humanisierte Antikörper Synagis (Palivizumab) wird Kleinkindern und Risikogruppen präventiv verabreicht, um schweren RSV-Infektionen vorzubeugen (Cardenas *et al.*, 2005; Fuller & Del Mar, 2006). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der Zellen mit Synagis die F-Protein-vermittelten cytopathischen Effekte signifikant reduzierte. Diese Reduktion konnte sowohl nach Behandlung der polarisierten MDCK-(hF-GFP)-Zellen als auch nach HRSV-Infektion von A549-Zellen beobachtet werden. Jedoch war der Antikörper auch bei höheren Konzentrationen nicht in der Lage die Apoptose vollständig zu hemmen. Zum einen könnte dies auf eine mögliche intrazelluläre cytotoxische Aktivität des F-Proteins zurückzuführen sein. Zum anderen könnten durch die Expression des F-Proteins weitere interne Signalwege ausgelöst werden, wie z.B. ER-Stress, welche nicht durch exogene Gabe des Antikörpers gehemmt werden könnte. Tierstudien haben gezeigt, dass die Applikation von neutralisierenden, gegen das F-Protein gerichteten Antikörpern zwar zu einer Reduktion des Virustiters, nicht aber zu einer Verbesserung des klinischen Verlaufs führte (Haynes *et al.*, 2002; Mejias *et al.*, 2005). Diese Beobachtung könnte damit erklärt werden, dass wenn die Apoptose erst einmal induziert wurde, der Krankheitsverlauf durch Behandlung mit neutralisierenden Antikörpern nicht mehr zu beeinflussen ist.

Die Hemmung der Fusion und damit eine eventuelle neue Therapiemöglichkeit einer akuten RSV-Infektion könnte auch mit Hilfe von Fusionsinhibitoren erreicht werden. Dies konnte in dieser Arbeit zudem bereits nach Gabe des Peptides, des für das Masernvirus beschriebenen fusionsinhibitorischen Peptid z-fFg gezeigt werden. Weiter kleine Moleküle wurden beschrieben, die die Fusion inhibieren und die Infektion und die virale Ausbreitung reduzieren (Cianci *et al.*, 2004a; Cianci *et al.*, 2004b; Cianci *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2007). Die Problematik mit solchen Fusionsinhibitoren ist vermutlich ähnlich der der therapeutischen Antikörper. Der Einsatz müsste zu einem sehr frühen Zeitpunkt während der Infektion erfolgen, um noch einen therapeutischen Nutzen zu erzielen.

Trotz vieler Anstrengungen ist bis heute kein protektiver Impfstoff gegen HRSV erhältlich. Ein in den 60er Jahren eingesetzter Impfstoff aus Formalin-inaktiviertem RSV bot keinen Schutz vor einer anschließenden natürlichen HRSV-Infektion, vielmehr traten sogar verstärkte Krankheitssymptome auf, die zum Tod einiger Kinder führten (Kim *et al.*, 1969). Der Impfstoff induzierte zwar die Bildung von Antikörpern, diese vermochten jedoch das Virus nicht zu neutralisieren (Murphy *et al.*, 1989). In den darauf folgenden Jahren wurden verschiedene Ansätze für die Entwicklung eines HRSV-Impfstoffes verfolgt. So wurden unter anderem Protein-Impfstoffe auf Basis des F-Proteins (Groothuis *et al.*, 1998; Hancock *et al.*, 1995) oder auf Basis des G-Proteins (Power *et al.*, 2001a; Power *et al.*, 2001b), attenuierte Lebendimpfstoffe (Bermingham & Collins, 1999; Jin *et al.*, 2003; Karron *et al.*, 1997b; Kim *et al.*, 1973; Teng *et al.*, 2000; Wright *et al.*, 2007) und rekombinante BRSV/HRSV-Chimären (Buchholz *et al.*, 2000) experimentell eingesetzt. Hierbei stellte sich aber heraus, dass diese Impfstoffe entweder zu attenuiert oder noch zu pathogen waren und daher für die Immunisierung von Neugeborenen nicht in Frage kamen. Diese Problematik könnte mit dem F-Protein in Zusammenhang stehen. Das Glykoprotein ist essentiell für die Virusreplikation, besitzt andererseits aber proapoptische Eigenschaften. Eine Attenuierung von RSV ist wahrscheinlich nur auf Kosten der Fusionsaktivität zu erreichen, die aber mit einer verringerten Replikation und Immunogenität verbunden ist.

Eine weitere Therapiemöglichkeit stellt die Gabe von Caspase-Inhibitoren während einer akuten RSV-Infektion dar. So haben tierexperimentelle Studien gezeigt, dass der Einsatz des Pan-Caspase-Inhibitors z-VAD-fmk zu einer Reduktion der Symptome bei einer akuten bakteriellen Meningitis führte (Braun *et al.*, 1999; Hara *et al.*, 1997).

Diese Arbeit hat gezeigt, dass das F-Protein eine Schlüsselrolle bei der Cytopathogenität von RSV einnimmt. Neue Therapien, die das F-Protein zum Ziel haben, stellen eine vielversprechende Option dar, um diesen weit verbreiteten Erreger von respiratorischen Erkrankungen zu bekämpfen.

Literaturverzeichnis

- Aherne, W., Bird, T., Court, S. D., Gardner, P. S. & McQuillin, J. (1970).** Pathological changes in virus infections of the lower respiratory tract in children. *J Clin Pathol* **23**, 7-18.
- Alonso, A., Andres, J. M., Garmendia, J. R., Diez, I., Gil, J. M. & Ardura, J. (2007).** Bronchiolitis due to respiratory syncytial virus in hospitalized children: a study of seasonal rhythm. *Acta Paediatr* **96**, 731-735.
- Antonsson, B., Montessuit, S., Sanchez, B. & Martinou, J. C. (2001).** Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem* **276**, 11615-11623.
- Arumugham, R. G., Seid, R. C., Jr., Doyle, S., Hildreth, S. W. & Paradiso, P. R. (1989).** Fatty acid acylation of the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *J Biol Chem* **264**, 10339-10342.
- Atreya, P. L., Peeples, M. E. & Collins, P. L. (1998).** The NS1 protein of human respiratory syncytial virus is a potent inhibitor of minigenome transcription and RNA replication. *J Virol* **72**, 1452-1461.
- Attramadal, H., Arriza, J. L., Aoki, C., Dawson, T. M., Codina, J., Kwatra, M. M., Snyder, S. H., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1992).** Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family. *J Biol Chem* **267**, 17882-17890.
- Bae, S. J., Matsunaga, Y., Takenaka, M., Tanaka, Y., Hamazaki, Y., Shimizu, K. & Katayama, I. (2002).** Substance P induced preprotachykinin-a mRNA, neutral endopeptidase mRNA and substance P in cultured normal fibroblasts. *Int Arch Allergy Immunol* **127**, 316-321.
- Barak, L. S., Ferguson, S. S., Zhang, J., Martenson, C., Meyer, T. & Caron, M. G. (1997).** Internal trafficking and surface mobility of a functionally intact beta2-adrenergic receptor-green fluorescent protein conjugate. *Mol Pharmacol* **51**, 177-184.
- Bean, L. J. & Stark, G. R. (2001).** Phosphorylation of serines 15 and 37 is necessary for efficient accumulation of p53 following irradiation with UV. *Oncogene* **20**, 1076-1084.
- Beau, I., Groyer-Picard, M. T., Le Bivic, A., Vannier, B., Loosfelt, H., Milgrom, E. & Misrahi, M. (1998).** The basolateral localization signal of the follicle-stimulating hormone receptor. *J Biol Chem* **273**, 18610-18616.
- Bermingham, A. & Collins, P. L. (1999).** The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11259-11264.
- Bitko, V. & Barik, S. (2001).** An endoplasmic reticulum-specific stress-activated caspase (caspase-12) is implicated in the apoptosis of A549 epithelial cells by respiratory syncytial virus. *J Cell Biochem* **80**, 441-454.
- Bitko, V., Shulyayeva, O., Mazumder, B., Musiyenko, A., Ramaswamy, M., Look, D. C. & Barik, S. (2007).** Nonstructural proteins of respiratory syncytial virus suppress premature apoptosis by an NF-kappaB-dependent, interferon-independent mechanism and facilitate virus growth. *J Virol* **81**, 1786-1795.

- Blount, R. E., Jr., Morris, J. A. & Savage, R. E. (1956).** Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc Soc Exp Biol Med* **92**, 544-549.
- Bockmann, S., Seep, J. & Jonas, L. (2001).** Delay of neutrophil apoptosis by the neuropeptide substance P: involvement of caspase cascade. *Peptides* **22**, 661-670.
- Bonfoco, E., Krainc, D., Ankarcrona, M., Nicotera, P. & Lipton, S. A. (1995).** Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7162-7166.
- Bourgeois, C., Bour, J. B., Lidholt, K., Gauthray, C. & Pothier, P. (1998).** Heparin-like structures on respiratory syncytial virus are involved in its infectivity in vitro. *J Virol* **72**, 7221-7227.
- Braciale, T. J. (2005).** Respiratory syncytial virus and T cells: interplay between the virus and the host adaptive immune system. *Proc Am Thorac Soc* **2**, 141-146.
- Braun, J. S., Novak, R., Herzog, K. H., Bodner, S. M., Cleveland, J. L. & Tuomanen, E. I. (1999).** Neuroprotection by a caspase inhibitor in acute bacterial meningitis. *Nat Med* **5**, 298-302.
- Brock, S. C., Goldenring, J. R. & Crowe, J. E., Jr. (2003).** Apical recycling systems regulate directional budding of respiratory syncytial virus from polarized epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15143-15148.
- Brock, S. C., Heck, J. M., McGraw, P. A. & Crowe, J. E., Jr. (2005).** The transmembrane domain of the respiratory syncytial virus F protein is an orientation-independent apical plasma membrane sorting sequence. *J Virol* **79**, 12528-12535.
- Brown, D. & Stow, J. L. (1996).** Protein trafficking and polarity in kidney epithelium: from cell biology to physiology. *Physiol Rev* **76**, 245-297.
- Bruewer, M., Hopkins, A. M., Hobert, M. E., Nusrat, A. & Madara, J. L. (2004).** RhoA, Rac1, and Cdc42 exert distinct effects on epithelial barrier via selective structural and biochemical modulation of junctional proteins and F-actin. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**, C327-335.
- Bryan, B. A., Li, D., Wu, X. & Liu, M. (2005).** The Rho family of small GTPases: crucial regulators of skeletal myogenesis. *Cell Mol Life Sci* **62**, 1547-1555.
- Buchholz, U. J., Granzow, H., Schuldt, K., Whitehead, S. S., Murphy, B. R. & Collins, P. L. (2000).** Chimeric bovine respiratory syncytial virus with glycoprotein gene substitutions from human respiratory syncytial virus (HRSV): effects on host range and evaluation as a live-attenuated HRSV vaccine. *J Virol* **74**, 1187-1199.
- Bukreyev, A., Whitehead, S. S., Murphy, B. R. & Collins, P. L. (1997).** Recombinant respiratory syncytial virus from which the entire SH gene has been deleted grows efficiently in cell culture and exhibits site-specific attenuation in the respiratory tract of the mouse. *J Virol* **71**, 8973-8982.
- Burma, S., Kurimasa, A., Xie, G. & other authors (1999).** DNA-dependent protein kinase-independent activation of p53 in response to DNA damage. *J Biol Chem* **274**, 17139-17143.

- Cardenas, S., Auais, A. & Piedimonte, G. (2005).** Palivizumab in the prophylaxis of respiratory syncytial virus infection. *Expert Rev Anti Infect Ther* **3**, 719-726.
- Castedo, M., Roumier, T., Blanco, J. & other authors (2002).** Sequential involvement of Cdk1, mTOR and p53 in apoptosis induced by the HIV-1 envelope. *Embo J* **21**, 4070-4080.
- Castedo, M., Perfettini, J. L., Andreau, K., Roumier, T., Piacentini, M. & Kroemer, G. (2003).** Mitochondrial apoptosis induced by the HIV-1 envelope. *Ann N Y Acad Sci* **1010**, 19-28.
- Castedo, M. & Kroemer, G. (2004).** [Mitotic catastrophe: a special case of apoptosis]. *J Soc Biol* **198**, 97-103.
- Castedo, M., Perfettini, J. L., Roumier, T., Andreau, K., Medema, R. & Kroemer, G. (2004a).** Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* **23**, 2825-2837.
- Castedo, M., Perfettini, J. L., Roumier, T. & other authors (2004b).** Mitotic catastrophe constitutes a special case of apoptosis whose suppression entails aneuploidy. *Oncogene* **23**, 4362-4370.
- Chambers, P., Pringle, C. R. & Easton, A. J. (1990).** Heptad repeat sequences are located adjacent to hydrophobic regions in several types of virus fusion glycoproteins. *J Gen Virol* **71** (Pt 12), 3075-3080.
- Chang, J. & Braciale, T. J. (2002).** Respiratory syncytial virus infection suppresses lung CD8+ T-cell effector activity and peripheral CD8+ T-cell memory in the respiratory tract. *Nat Med* **8**, 54-60.
- Chanock, R. & Finberg, L. (1957).** Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). II. Epidemiologic aspects of infection in infants and young children. *Am J Hyg* **66**, 291-300.
- Chapman, R. W., Hey, J. A., McLeod, R., Minnicozzi, M. & Rizzo, C. (1998).** Tachykinins in the lungs. *Drug News Perspect* **11**, 480-489.
- Chu, H. W., Kraft, M., Krause, J. E., Rex, M. D. & Martin, R. J. (2000).** Substance P and its receptor neurokinin 1 expression in asthmatic airways. *J Allergy Clin Immunol* **106**, 713-722.
- Chuang, J. Z. & Sung, C. H. (1998).** The cytoplasmic tail of rhodopsin acts as a novel apical sorting signal in polarized MDCK cells. *J Cell Biol* **142**, 1245-1256.
- Cianci, C., Genovesi, E. V., Lamb, L. & other authors (2004a).** Oral efficacy of a respiratory syncytial virus inhibitor in rodent models of infection. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 2448-2454.
- Cianci, C., Langley, D. R., Dischino, D. D. & other authors (2004b).** Targeting a binding pocket within the trimer-of-hairpins: small-molecule inhibition of viral fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15046-15051.
- Cianci, C., Meanwell, N. & Krystal, M. (2005).** Antiviral activity and molecular mechanism of an orally active respiratory syncytial virus fusion inhibitor. *J Antimicrob Chemother* **55**, 289-292.
- Collins, P. L. & Wertz, G. W. (1983).** cDNA cloning and transcriptional mapping of nine polyadenylylated RNAs encoded by the genome of human respiratory syncytial virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 3208-3212.

- Collins, P. L., Hill, M. G. & Johnson, P. R. (1990).** The two open reading frames of the 22K mRNA of human respiratory syncytial virus: sequence comparison of antigenic subgroups A and B and expression in vitro. *J Gen Virol* **71** (Pt 12), 3015-3020.
- Collins, P. L., Camargo, E. & Hill, M. G. (1999).** Support plasmids and support proteins required for recovery of recombinant respiratory syncytial virus. *Virology* **259**, 251-255.
- Cowton, V. M. & Fearn, R. (2005).** Evidence that the respiratory syncytial virus polymerase is recruited to nucleotides 1 to 11 at the 3' end of the nucleocapsid and can scan to access internal signals. *J Virol* **79**, 11311-11322.
- Cuenin, S., Tinel, A., Janssens, S. & Tschopp, J. (2007).** p53-induced protein with a death domain (PIDD) isoforms differentially activate nuclear factor-kappaB and caspase-2 in response to genotoxic stress. *Oncogene*.
- de Graaff, P. M., de Jong, E. C., van Capel, T. M., van Dijk, M. E., Roholl, P. J., Boes, J., Luytjes, W., Kimpen, J. L. & van Bleek, G. M. (2005).** Respiratory syncytial virus infection of monocyte-derived dendritic cells decreases their capacity to activate CD4 T cells. *J Immunol* **175**, 5904-5911.
- Defea, K., Schmidlin, F., Dery, O., Grady, E. F. & Bunnett, N. W. (2000).** Mechanisms of initiation and termination of signalling by neuropeptide receptors: a comparison with the proteinase-activated receptors. *Biochem Soc Trans* **28**, 419-426.
- DeFea, K. A., Vaughn, Z. D., O'Bryan, E. M., Nishijima, D., Dery, O. & Bunnett, N. W. (2000a).** The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a beta -arrestin-dependent scaffolding complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11086-11091.
- DeFea, K. A., Zalevsky, J., Thoma, M. S., Dery, O., Mullins, R. D. & Bunnett, N. W. (2000b).** beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J Cell Biol* **148**, 1267-1281.
- Del Re, D. P., Miyamoto, S. & Brown, J. H. (2007).** RhoA/Rho kinase up-regulate Bax to activate a mitochondrial death pathway and induce cardiomyocyte apoptosis. *J Biol Chem* **282**, 8069-8078.
- Dery, O., Defea, K. A. & Bunnett, N. W. (2001).** Protein kinase C-mediated desensitization of the neurokinin 1 receptor. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**, C1097-1106.
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., Maundrell, K., Antonsson, B. & Martinou, J. C. (1999).** Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol* **144**, 891-901.
- Dimri, R., Sharabi, Y. & Shoham, J. (2000).** Specific inhibition of glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis by substance P. *J Immunol* **164**, 2479-2486.
- Domachowske, J. B. & Rosenberg, H. F. (1999).** Respiratory syncytial virus infection: immune response, immunopathogenesis, and treatment. *Clin Microbiol Rev* **12**, 298-309.
- Dowell, S. F., Anderson, L. J., Gary, H. E., Jr., Erdman, D. D., Plouffe, J. F., File, T. M., Jr., Marston, B. J. & Breiman, R. F. (1996).** Respiratory syncytial virus is an important cause of community-acquired lower respiratory infection among hospitalized adults. *J Infect Dis* **174**, 456-462.

- Eisenhut, M. (2006).** Extrapulmonary manifestations of severe respiratory syncytial virus infection--a systematic review. *Crit Care* **10**, R107.
- EI-Hashim, A. Z. & Amine, S. A. (2005).** The role of substance P and bradykinin in the cough reflex and bronchoconstriction in guinea-pigs. *Eur J Pharmacol* **513**, 125-133.
- Elhassan, N. O., Sorbero, M. E., Hall, C. B., Stevens, T. P. & Dick, A. W. (2006).** Cost-effectiveness analysis of palivizumab in premature infants without chronic lung disease. *Arch Pediatr Adolesc Med* **160**, 1070-1076.
- Elliott, J., Lynch, O. T., Suessmuth, Y. & other authors (2007).** Respiratory syncytial virus NS1 protein degrades STAT2 by using the Elongin-Cullin E3 ligase. *J Virol* **81**, 3428-3436.
- Englund, J. A. (1994).** Passive protection against respiratory syncytial virus disease in infants: the role of maternal antibody. *Pediatr Infect Dis J* **13**, 449-453.
- Falsey, A. R., Cunningham, C. K., Barker, W. H., Kouides, R. W., Yuen, J. B., Menegus, M., Weiner, L. B., Bonville, C. A. & Betts, R. F. (1995a).** Respiratory syncytial virus and influenza A infections in the hospitalized elderly. *J Infect Dis* **172**, 389-394.
- Falsey, A. R., McCann, R. M., Hall, W. J. & other authors (1995b).** Acute respiratory tract infection in daycare centers for older persons. *J Am Geriatr Soc* **43**, 30-36.
- Fearn, R. & Collins, P. L. (1999).** Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. *J Virol* **73**, 5852-5864.
- Feldman, S. A., Audet, S. & Beeler, J. A. (2000).** The fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus facilitates virus attachment and infectivity via an interaction with cellular heparan sulfate. *J Virol* **74**, 6442-6447.
- Ferguson, S. S., Downey, W. E., 3rd, Colapietro, A. M., Barak, L. S., Menard, L. & Caron, M. G. (1996).** Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science* **271**, 363-366.
- Ferguson, S. S., Zhang, J., Barak, L. S. & Caron, M. G. (1998).** Molecular mechanisms of G protein-coupled receptor desensitization and resensitization. *Life Sci* **62**, 1561-1565.
- Ferguson, S. S. (2001).** Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* **53**, 1-24.
- Ferri, K. F., Jacotot, E., Blanco, J. & other authors (2000a).** Apoptosis control in syncytia induced by the HIV type 1-envelope glycoprotein complex: role of mitochondria and caspases. *J Exp Med* **192**, 1081-1092.
- Ferri, K. F., Jacotot, E., Geuskens, M. & Kroemer, G. (2000b).** Apoptosis and karyogamy in syncytia induced by the HIV-1-envelope glycoprotein complex. *Cell Death Differ* **7**, 1137-1139.
- Fleming, E. H., Kolokoltssov, A. A., Davey, R. A., Nichols, J. E. & Roberts, N. J., Jr. (2006).** Respiratory syncytial virus F envelope protein associates with lipid rafts without a requirement for other virus proteins. *J Virol* **80**, 12160-12170.
- Folsch, H., Ohno, H., Bonifacino, J. S. & Mellman, I. (1999).** A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells. *Cell* **99**, 189-198.

- Frisch, S. M. & Francis, H. (1994).** Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* **124**, 619-626.
- Fuentes, S., Tran, K. C., Luthra, P., Teng, M. N. & He, B. (2007).** Function of the respiratory syncytial virus small hydrophobic protein. *J Virol* **81**, 8361-8366.
- Fuller, H. & Del Mar, C. (2006).** Immunoglobulin treatment for respiratory syncytial virus infection. *Cochrane Database Syst Rev*, CD004883.
- Galiano, M. C., Luchsinger, V., Videla, C. M. & other authors (2005).** Intragroup antigenic diversity of human respiratory syncytial virus (group A) isolated in Argentina and Chile. *J Med Virol* **77**, 311-316.
- Garten, W. & Klenk, H. D. (1983).** Characterization of the carboxypeptidase involved in the proteolytic cleavage of the influenza haemagglutinin. *J Gen Virol* **64 (Pt 10)**, 2127-2137.
- Glezen, W. P., Taber, L. H., Frank, A. L. & Kasel, J. A. (1986).** Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. *Am J Dis Child* **140**, 543-546.
- Gonzalez-Reyes, L., Ruiz-Arguello, M. B., Garcia-Barreno, B., Calder, L., Lopez, J. A., Albar, J. P., Skehel, J. J., Wiley, D. C. & Melero, J. A. (2001).** Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9859-9864.
- Goodman, O. B., Jr., Krupnick, J. G., Santini, F., Gurevich, V. V., Penn, R. B., Gagnon, A. W., Keen, J. H. & Benovic, J. L. (1996).** Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* **383**, 447-450.
- Goodman, O. B., Jr., Krupnick, J. G., Gurevich, V. V., Benovic, J. L. & Keen, J. H. (1997).** Arrestin/clathrin interaction. Localization of the arrestin binding locus to the clathrin terminal domain. *J Biol Chem* **272**, 15017-15022.
- Gower, T. L., Peeples, M. E., Collins, P. L. & Graham, B. S. (2001).** RhoA is activated during respiratory syncytial virus infection. *Virology* **283**, 188-196.
- Gower, T. L., Pasty, M. K., Peeples, M. E., Collins, P. L., McCurdy, L. H., Hart, T. K., Guth, A., Johnson, T. R. & Graham, B. S. (2005).** RhoA signaling is required for respiratory syncytial virus-induced syncytium formation and filamentous virion morphology. *J Virol* **79**, 5326-5336.
- Grady, E. F., Yoshimi, S. K., Maa, J. & other authors (2000).** Substance P mediates inflammatory oedema in acute pancreatitis via activation of the neurokinin-1 receptor in rats and mice. *Br J Pharmacol* **130**, 505-512.
- Groneberg, D. A., Quarcoo, D., Frossard, N. & Fischer, A. (2004).** Neurogenic mechanisms in bronchial inflammatory diseases. *Allergy* **59**, 1139-1152.
- Groothuis, J. R., King, S. J., Hogerman, D. A., Paradiso, P. R. & Simoes, E. A. (1998).** Safety and immunogenicity of a purified F protein respiratory syncytial virus (PFP-2) vaccine in seropositive children with bronchopulmonary dysplasia. *J Infect Dis* **177**, 467-469.
- Groskreutz, D. J., Monick, M. M., Yarovinsky, T. O., Powers, L. S., Quelle, D. E., Varga, S. M., Look, D. C. & Hunninghake, G. W. (2007).** Respiratory Syncytial Virus Decreases p53 Protein to Prolong Survival of Airway Epithelial Cells. *J Immunol* **179**, 2741-2747.

- Gruber, C. & Levine, S. (1985).** Respiratory syncytial virus polypeptides. V. The kinetics of glycoprotein synthesis. *J Gen Virol* **66 (Pt 6)**, 1241-1247.
- Gudermann, T. (2001).** Multiple pathways of ERK activation by G protein-coupled receptors. *Novartis Found Symp* **239**, 68-79; discussion 80-64, 150-159.
- Hancock, G. E., Speelman, D. J., Frenchick, P. J., Mineo-Kuhn, M. M., Baggs, R. B. & Hahn, D. J. (1995).** Formulation of the purified fusion protein of respiratory syncytial virus with the saponin QS-21 induces protective immune responses in Balb/c mice that are similar to those generated by experimental infection. *Vaccine* **13**, 391-400.
- Hara, H., Fink, K., Endres, M., Friedlander, R. M., Gagliardini, V., Yuan, J. & Moskowitz, M. A. (1997).** Attenuation of transient focal cerebral ischemic injury in transgenic mice expressing a mutant ICE inhibitory protein. *J Cereb Blood Flow Metab* **17**, 370-375.
- Harrington, R. D., Hooton, T. M., Hackman, R. C., Storch, G. A., Osborne, B., Gleaves, C. A., Benson, A. & Meyers, J. D. (1992).** An outbreak of respiratory syncytial virus in a bone marrow transplant center. *J Infect Dis* **165**, 987-993.
- Harris, J. & Werling, D. (2003).** Binding and entry of respiratory syncytial virus into host cells and initiation of the innate immune response. *Cell Microbiol* **5**, 671-680.
- Hawes, B. E., van Biesen, T., Koch, W. J., Luttrell, L. M. & Lefkowitz, R. J. (1995).** Distinct pathways of Gi- and Gq-mediated mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* **270**, 17148-17153.
- Haynes, L. M., Tonkin, J., Anderson, L. J. & Tripp, R. A. (2002).** Neutralizing anti-F glycoprotein and anti-substance P antibody treatment effectively reduces infection and inflammation associated with respiratory syncytial virus infection. *J Virol* **76**, 6873-6881.
- Heilman, C. A. (1990).** From the National Institute of Allergy and Infectious Diseases and the World Health Organization. Respiratory syncytial and parainfluenza viruses. *J Infect Dis* **161**, 402-406.
- Heminway, B. R., Yu, Y., Tanaka, Y., Perrine, K. G., Gustafson, E., Bernstein, J. M. & Galinski, M. S. (1994).** Analysis of respiratory syncytial virus F, G, and SH proteins in cell fusion. *Virology* **200**, 801-805.
- Henderson, F. W., Clyde, W. A., Jr., Collier, A. M., Denny, F. W., Senior, R. J., Sheaffer, C. I., Conley, W. G., 3rd & Christian, R. M. (1979).** The etiologic and epidemiologic spectrum of bronchiolitis in pediatric practice. *J Pediatr* **95**, 183-190.
- Henderson, G., Murray, J. & Yeo, R. P. (2002).** Sorting of the respiratory syncytial virus matrix protein into detergent-resistant structures is dependent on cell-surface expression of the glycoproteins. *Virology* **300**, 244-254.
- Hershey, A. D. & Krause, J. E. (1990).** Molecular characterization of a functional cDNA encoding the rat substance P receptor. *Science* **247**, 958-962.
- Hinck, L., Nathke, I. S., Papkoff, J. & Nelson, W. J. (1994a).** Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. *J Cell Biol* **125**, 1327-1340.
- Hinck, L., Nathke, I. S., Papkoff, J. & Nelson, W. J. (1994b).** Beta-catenin: a common target for the regulation of cell adhesion by Wnt-1 and Src signaling pathways. *Trends Biochem Sci* **19**, 538-542.

- Hsu, Y. T., Wolter, K. G. & Youle, R. J. (1997).** Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3668-3672.
- Hunter, M. G. & Picton, H. M. (1999).** Comparison of cyclic AMP production in response to LH by granulosa and theca cells from Meishan and Large-White hybrid gilts. *Anim Reprod Sci* **56**, 67-78.
- Hunziker, W., Harter, C., Matter, K. & Mellman, I. (1991).** Basolateral sorting in MDCK cells requires a distinct cytoplasmic domain determinant. *Cell* **66**, 907-920.
- Inaba, Y., Tanaka, Y., Omori, T. & Matumoto, M. (1970).** Isolation of bovine respiratory syncytial virus. *Jpn J Exp Med* **40**, 473-474.
- Jacobs, J. W. & Edington, N. (1975).** Experimental infection of calves with respiratory syncytial virus. *Res Vet Sci* **18**, 299-306.
- Jin, H., Cheng, X., Traina-Dorge, V. L., Park, H. J., Zhou, H., Soike, K. & Kemble, G. (2003).** Evaluation of recombinant respiratory syncytial virus gene deletion mutants in African green monkeys for their potential as live attenuated vaccine candidates. *Vaccine* **21**, 3647-3652.
- Johnson, J. E., Gonzales, R. A., Olson, S. J., Wright, P. F. & Graham, B. S. (2007).** The histopathology of fatal untreated human respiratory syncytial virus infection. *Mod Pathol* **20**, 108-119.
- Johnson, S., Oliver, C., Prince, G. A. & other authors (1997).** Development of a humanized monoclonal antibody (MEDI-493) with potent in vitro and in vivo activity against respiratory syncytial virus. *J Infect Dis* **176**, 1215-1224.
- Jones, L. P., Zheng, H. Q., Karron, R. A., Peret, T. C., Tsou, C. & Anderson, L. J. (2002).** Multiplex assay for detection of strain-specific antibodies against the two variable regions of the G protein of respiratory syncytial virus. *Clin Diagn Lab Immunol* **9**, 633-638.
- Joos, G. F., Germonpre, P. R. & Pauwels, R. A. (2000).** Role of tachykinins in asthma. *Allergy* **55**, 321-337.
- Joos, G. F. (2001).** The role of neuroeffector mechanisms in the pathogenesis of asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* **1**, 134-143.
- Joos, G. F. & Pauwels, R. A. (2001).** Tachykinin receptor antagonists: potential in airways diseases. *Curr Opin Pharmacol* **1**, 235-241.
- Jou, T. S., Schneeberger, E. E. & Nelson, W. J. (1998).** Structural and functional regulation of tight junctions by RhoA and Rac1 small GTPases. *J Cell Biol* **142**, 101-115.
- Jurgensmeier, J. M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D. & Reed, J. C. (1998).** Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4997-5002.
- Kamasaki, H., Tsutsumi, H., Seki, K. & Chiba, S. (2001).** Genetic variability of respiratory syncytial virus subgroup B strain isolated during the last 20 years from the same region in Japan: existence of time-dependent linear genetic drifts. *Arch Virol* **146**, 457-466.
- Kapikian, A. Z., Mitchell, R. H., Chanock, R. M., Shvedoff, R. A. & Stewart, C. E. (1969).** An epidemiologic study of altered clinical reactivity to respiratory syncytial (RS) virus infection

in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine. *Am J Epidemiol* **89**, 405-421.

Karger, A., Schmidt, U. & Buchholz, U. J. (2001). Recombinant bovine respiratory syncytial virus with deletions of the G or SH genes: G and F proteins bind heparin. *J Gen Virol* **82**, 631-640.

Karron, R. A., Buonagurio, D. A., Georgiu, A. F. & other authors (1997a). Respiratory syncytial virus (RSV) SH and G proteins are not essential for viral replication in vitro: clinical evaluation and molecular characterization of a cold-passaged, attenuated RSV subgroup B mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13961-13966.

Karron, R. A., Wright, P. F., Crowe, J. E., Jr., Clements-Mann, M. L., Thompson, J., Makhene, M., Casey, R. & Murphy, B. R. (1997b). Evaluation of two live, cold-passaged, temperature-sensitive respiratory syncytial virus vaccines in chimpanzees and in human adults, infants, and children. *J Infect Dis* **176**, 1428-1436.

Khan, I. & Collins, S. M. (1994). Fourth isoform of preprotachykinin messenger RNA encoding for substance P in the rat intestine. *Biochem Biophys Res Commun* **202**, 796-802.

Kim, H. W., Canchola, J. G., Brandt, C. D., Pyles, G., Chanock, R. M., Jensen, K. & Parrott, R. H. (1969). Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am J Epidemiol* **89**, 422-434.

Kim, H. W., Arrobio, J. O., Brandt, C. D., Wright, P., Hodes, D., Chanock, R. M. & Parrott, R. H. (1973). Safety and antigenicity of temperature sensitive (TS) mutant respiratory syncytial virus (RSV) in infants and children. *Pediatrics* **52**, 56-63.

Kimman, T. G. & Westenbrink, F. (1990). Immunity to human and bovine respiratory syncytial virus. *Arch Virol* **112**, 1-25.

Klenk, H. D. & Garten, W. (1994). Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends Microbiol* **2**, 39-43.

Knight-Krajewski, S., Welsh, C. F., Liu, Y., Lyons, L. S., Faysal, J. M., Yang, E. S. & Burnstein, K. L. (2004). Deregulation of the Rho GTPase, Rac1, suppresses cyclin-dependent kinase inhibitor p21(CIP1) levels in androgen-independent human prostate cancer cells. *Oncogene* **23**, 5513-5522.

Koon, H. W., Zhao, D., Na, X., Moyer, M. P. & Pothoulakis, C. (2004). Metalloproteinases and transforming growth factor-alpha mediate substance P-induced mitogen-activated protein kinase activation and proliferation in human colonocytes. *J Biol Chem* **279**, 45519-45527.

Kotelkin, A., Prihod'ko, E. A., Cohen, J. I., Collins, P. L. & Bukreyev, A. (2003). Respiratory syncytial virus infection sensitizes cells to apoptosis mediated by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J Virol* **77**, 9156-9172.

Krause, J. E., DiMaggio, D. A. & McCaaron, K. E. (1995). Alterations in neurokinin 1 receptor gene expression in models of pain and inflammation. *Can J Physiol Pharmacol* **73**, 854-859.

Krempl, C., Murphy, B. R. & Collins, P. L. (2002). Recombinant respiratory syncytial virus with the G and F genes shifted to the promoter-proximal positions. *J Virol* **76**, 11931-11942.

- Krupnick, J. G. & Benovic, J. L. (1998).** The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **38**, 289-319.
- Krusat, T. & Streckert, H. J. (1997).** Heparin-dependent attachment of respiratory syncytial virus (RSV) to host cells. *Arch Virol* **142**, 1247-1254.
- Kuo, L., Grosfeld, H., Cristina, J., Hill, M. G. & Collins, P. L. (1996).** Effects of mutations in the gene-start and gene-end sequence motifs on transcription of monocistronic and dicistronic minigenomes of respiratory syncytial virus. *J Virol* **70**, 6892-6901.
- Kurt-Jones, E. A., Popova, L., Kwinn, L., Haynes, L. M., Jones, L. P., Tripp, R. A., Walsh, E. E., Freeman, M. W., Golenbock, D. T., Anderson, L. J. & Finberg, R. W. (2000).** Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* **1**, 398-401.
- Kyhse-Andersen, J. (1984).** Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**, 203-209.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lallemend, F., Lefebvre, P. P., Hans, G., Rigo, J. M., Van de Water, T. R., Moonen, G. & Malgrange, B. (2003).** Substance P protects spiral ganglion neurons from apoptosis via PKC-Ca²⁺-MAPK/ERK pathways. *J Neurochem* **87**, 508-521.
- Lamprecht, C. L., Krause, H. E. & Mufson, M. A. (1976).** Role of maternal antibody in pneumonia and bronchiolitis due to respiratory syncytial virus. *J Infect Dis* **134**, 211-217.
- Langedijk, J. P., Meloen, R. H., Taylor, G., Furze, J. M. & van Oirschot, J. T. (1997).** Antigenic structure of the central conserved region of protein G of bovine respiratory syncytial virus. *J Virol* **71**, 4055-4061.
- Laniyonu, A., Sliwinski-Lis, E. & Fleming, N. (1988).** Different tachykinin receptor subtypes are coupled to the phosphoinositide or cyclic AMP signal transduction pathways in rat submandibular cells. *FEBS Lett* **240**, 186-190.
- Lefkowitz, R. J., Inglese, J., Koch, W. J., Pitcher, J., Attramadal, H. & Caron, M. G. (1992).** G-protein-coupled receptors: regulatory role of receptor kinases and arrestin proteins. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **57**, 127-133.
- Lin, C. F., Chen, C. L., Chang, W. T., Jan, M. S., Hsu, L. J., Wu, R. H., Tang, M. J., Chang, W. C. & Lin, Y. S. (2004).** Sequential caspase-2 and caspase-8 activation upstream of mitochondria during ceramide and etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem* **279**, 40755-40761.
- Lohse, M. J., Benovic, J. L., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1990).** Multiple pathways of rapid beta 2-adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitors. *J Biol Chem* **265**, 3202-3211.
- Luttrell, L. M., van Biesen, T., Hawes, B. E., Koch, W. J., Touhara, K. & Lefkowitz, R. J. (1995).** G beta gamma subunits mediate mitogen-activated protein kinase activation by the tyrosine kinase insulin-like growth factor 1 receptor. *J Biol Chem* **270**, 16495-16498.

- MacDonald, M. R., McCourt, D. W. & Krause, J. E. (1988).** Posttranslational processing of alpha-, beta-, and gamma-preprotachykinins. Cell-free translation and early posttranslational processing events. *J Biol Chem* **263**, 15176-15183.
- Maggi, C. A. (1995).** The mammalian tachykinin receptors. *Gen Pharmacol* **26**, 911-944.
- Maghni, K., Michoud, M. C., Alles, M., Rubin, A., Govindaraju, V., Meloche, C. & Martin, J. G. (2003).** Airway smooth muscle cells express functional neurokinin-1 receptors and the nerve-derived preprotachykinin-a gene: regulation by passive sensitization. *Am J Respir Cell Mol Biol* **28**, 103-110.
- Mallipeddi, S. K., Samal, S. K. & Mohanty, S. B. (1990).** Analysis of polypeptides synthesized in bovine respiratory syncytial virus-infected cells. *Arch Virol* **115**, 23-36.
- Martinez, F. D. (2003).** Respiratory syncytial virus bronchiolitis and the pathogenesis of childhood asthma. *Pediatr Infect Dis J* **22**, S76-82.
- Martinez-Sobrido, L., Gitiban, N., Fernandez-Sesma, A. & other authors (2006).** Protection against respiratory syncytial virus by a recombinant Newcastle disease virus vector. *J Virol* **80**, 1130-1139.
- Matter, K., Hunziker, W. & Mellman, I. (1992).** Basolateral sorting of LDL receptor in MDCK cells: the cytoplasmic domain contains two tyrosine-dependent targeting determinants. *Cell* **71**, 741-753.
- Matter, K., Yamamoto, E. M. & Mellman, I. (1994).** Structural requirements and sequence motifs for polarized sorting and endocytosis of LDL and Fc receptors in MDCK cells. *J Cell Biol* **126**, 991-1004.
- McConalogue, K., Dery, O., Lovett, M., Wong, H., Walsh, J. H., Grady, E. F. & Bunnett, N. W. (1999).** Substance P-induced trafficking of beta-arrestins. The role of beta-arrestins in endocytosis of the neurokinin-1 receptor. *J Biol Chem* **274**, 16257-16268.
- McConkey, D. J. (1998).** Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. *Toxicol Lett* **99**, 157-168.
- McDonald, T. P., Pitt, A. R., Brown, G., Rixon, H. W. & Sugrue, R. J. (2004).** Evidence that the respiratory syncytial virus polymerase complex associates with lipid rafts in virus-infected cells: a proteomic analysis. *Virology* **330**, 147-157.
- McKay, E., Higgins, P., Tyrrell, D. & Pringle, C. (1988).** Immunogenicity and pathogenicity of temperature-sensitive modified respiratory syncytial virus in adult volunteers. *J Med Virol* **25**, 411-421.
- Mejias, A., Chavez-Bueno, S., Rios, A. M. & other authors (2005).** Comparative effects of two neutralizing anti-respiratory syncytial virus (RSV) monoclonal antibodies in the RSV murine model: time versus potency. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 4700-4707.
- Monastyrskaya, K., Hostettler, A., Buergi, S. & Draeger, A. (2005).** The NK1 receptor localizes to the plasma membrane microdomains, and its activation is dependent on lipid raft integrity. *J Biol Chem* **280**, 7135-7146.
- Monick, M. M., Cameron, K., Powers, L. S., Butler, N. S., McCoy, D., Mallampalli, R. K. & Hunninghake, G. W. (2004).** Sphingosine kinase mediates activation of extracellular signal-related kinase and Akt by respiratory syncytial virus. *Am J Respir Cell Mol Biol* **30**, 844-852.

- Moussaoui, S. M., Le Prado, N., Bonici, B., Faucher, D. C., Cuine, F., Laduron, P. M. & Garret, C. (1992).** Distribution of neurokinin B in rat spinal cord and peripheral tissues: comparison with neurokinin A and substance P and effects of neonatal capsaicin treatment. *Neuroscience* **48**, 969-978.
- Murphy, B. R., Collins, P. L., Lawrence, L., Zubak, J., Chanock, R. M. & Prince, G. A. (1989).** Immunosuppression of the antibody response to respiratory syncytial virus (RSV) by pre-existing serum antibodies: partial prevention by topical infection of the respiratory tract with vaccinia virus-RSV recombinants. *J Gen Virol* **70 (Pt 8)**, 2185-2190.
- Narumi, S. & Maki, Y. (1978).** Stimulatory effects of substance P on neurite extension and cyclic AMP levels in cultured neuroblastoma cells. *J Neurochem* **30**, 1321-1326.
- Nawa, H., Kotani, H. & Nakanishi, S. (1984).** Tissue-specific generation of two preprotachykinin mRNAs from one gene by alternative RNA splicing. *Nature* **312**, 729-734.
- O'Connor, T. M., O'Connell, J., O'Brien, D. I., Goode, T., Bredin, C. P. & Shanahan, F. (2004).** The role of substance P in inflammatory disease. *J Cell Physiol* **201**, 167-180.
- O'Donnell D, R., Milligan, L. & Stark, J. M. (1999).** Induction of CD95 (Fas) and apoptosis in respiratory epithelial cell cultures following respiratory syncytial virus infection. *Virology* **257**, 198-207.
- Ogilvie, M. M., Vathenen, A. S., Radford, M., Codd, J. & Key, S. (1981).** Maternal antibody and respiratory syncytial virus infection in infancy. *J Med Virol* **7**, 263-271.
- Olson, M. F., Paterson, H. F. & Marshall, C. J. (1998).** Signals from Ras and Rho GTPases interact to regulate expression of p21Waf1/Cip1. *Nature* **394**, 295-299.
- Paccaud, M. F. & Jacquier, C. (1970).** A respiratory syncytial virus of bovine origin. *Arch Gesamte Virusforsch* **30**, 327-342.
- Pastey, M. K. & Samal, S. K. (1997).** Analysis of the bovine respiratory syncytial virus fusion protein (F) using monoclonal antibodies. *Vet Microbiol* **58**, 175-185.
- Pastey, M. K., Crowe, J. E., Jr. & Graham, B. S. (1999).** RhoA interacts with the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus and facilitates virus-induced syncytium formation. *J Virol* **73**, 7262-7270.
- Patacchini, R. & Maggi, C. A. (1995).** Tachykinin receptors and receptor subtypes. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **329**, 161-184.
- Perfettini, J. L., Castedo, M., Nardacci, R., Ciccocanti, F., Boya, P., Roumier, T., Larochette, N., Piacentini, M. & Kroemer, G. (2005a).** Essential role of p53 phosphorylation by p38 MAPK in apoptosis induction by the HIV-1 envelope. *J Exp Med* **201**, 279-289.
- Perfettini, J. L., Castedo, M., Roumier, T., Andreau, K., Nardacci, R., Piacentini, M. & Kroemer, G. (2005b).** Mechanisms of apoptosis induction by the HIV-1 envelope. *Cell Death Differ* **12 Suppl 1**, 916-923.
- Pippig, S., Andexinger, S., Daniel, K., Puzicha, M., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. & Lohse, M. J. (1993).** Overexpression of beta-arrestin and beta-adrenergic receptor kinase augment desensitization of beta 2-adrenergic receptors. *J Biol Chem* **268**, 3201-3208.

- Polizzi, D., Pratesi, G., Tortoreto, M., Supino, R., Riva, A., Bombardelli, E. & Zunino, F. (1999).** A novel taxane with improved tolerability and therapeutic activity in a panel of human tumor xenografts. *Cancer Res* **59**, 1036-1040.
- Pontow, S. E., Heyden, N. V., Wei, S. & Ratner, L. (2004).** Actin cytoskeletal reorganizations and coreceptor-mediated activation of rac during human immunodeficiency virus-induced cell fusion. *J Virol* **78**, 7138-7147.
- Power, U. F., Nguyen, T. N., Rietveld, E. & other authors (2001a).** Safety and immunogenicity of a novel recombinant subunit respiratory syncytial virus vaccine (BBG2Na) in healthy young adults. *J Infect Dis* **184**, 1456-1460.
- Power, U. F., Plotnicky-Gilquin, H., Goetsch, L., Champion, T., Beck, A., Haeuw, J. F., Nguyen, T. N., Bonnefoy, J. Y. & Corvaia, N. (2001b).** Identification and characterisation of multiple linear B cell protectopes in the respiratory syncytial virus G protein. *Vaccine* **19**, 2345-2351.
- Prigge, S. T., Mains, R. E., Eipper, B. A. & Amzel, L. M. (2000).** New insights into copper monooxygenases and peptide amidation: structure, mechanism and function. *Cell Mol Life Sci* **57**, 1236-1259.
- Pringle, C. R. (1999).** Virus taxonomy--1999. The universal system of virus taxonomy, updated to include the new proposals ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses during 1998. *Arch Virol* **144**, 421-429.
- Ramaswamy, M., Shi, L., Varga, S. M., Barik, S., Behlke, M. A. & Look, D. C. (2006).** Respiratory syncytial virus nonstructural protein 2 specifically inhibits type I interferon signal transduction. *Virology* **344**, 328-339.
- Regoli, D., Boudon, A. & Fauchere, J. L. (1994).** Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Pharmacol Rev* **46**, 551-599.
- Roberts, S. R., Compans, R. W. & Wertz, G. W. (1995).** Respiratory syncytial virus matures at the apical surfaces of polarized epithelial cells. *J Virol* **69**, 2667-2673.
- Roe, M. F., Bloxham, D. M., White, D. K., Ross-Russell, R. I., Tasker, R. T. & O'Donnell, D. R. (2004).** Lymphocyte apoptosis in acute respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Clin Exp Immunol* **137**, 139-145.
- Rosenblatt, J., Raff, M. C. & Cramer, L. P. (2001).** An epithelial cell destined for apoptosis signals its neighbors to extrude it by an actin- and myosin-dependent mechanism. *Curr Biol* **11**, 1847-1857.
- Saunders, C., Keefer, J. R., Bonner, C. A. & Limbird, L. E. (1998).** Targeting of G protein-coupled receptors to the basolateral surface of polarized renal epithelial cells involves multiple, non-contiguous structural signals. *J Biol Chem* **273**, 24196-24206.
- Scheiffele, P., Peranen, J. & Simons, K. (1995).** N-glycans as apical sorting signals in epithelial cells. *Nature* **378**, 96-98.
- Schlender, J., Bossert, B., Buchholz, U. & Conzelmann, K. K. (2000).** Bovine respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 cooperatively antagonize alpha/beta interferon-induced antiviral response. *J Virol* **74**, 8234-8242.

- Schlender, J., Walliser, G., Fricke, J. & Conzelmann, K. K. (2002).** Respiratory syncytial virus fusion protein mediates inhibition of mitogen-induced T-cell proliferation by contact. *J Virol* **76**, 1163-1170.
- Schlender, J., Zimmer, G., Herrler, G. & Conzelmann, K. K. (2003).** Respiratory syncytial virus (RSV) fusion protein subunit F2, not attachment protein G, determines the specificity of RSV infection. *J Virol* **77**, 4609-4616.
- Schmidlin, F., Dery, O., Bunnett, N. W. & Grady, E. F. (2002).** Heterologous regulation of trafficking and signaling of G protein-coupled receptors: beta-arrestin-dependent interactions between neurokinin receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3324-3329.
- Schreiber, P., Matheise, J. P., Dessy, F., Heimann, M., Letesson, J. J., Coppe, P. & Collard, A. (2000).** High mortality rate associated with bovine respiratory syncytial virus (BRSV) infection in Belgian white blue calves previously vaccinated with an inactivated BRSV vaccine. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **47**, 535-550.
- Schwarze, J., Hamelmann, E., Bradley, K. L., Takeda, K. & Gelfand, E. W. (1997).** Respiratory syncytial virus infection results in airway hyperresponsiveness and enhanced airway sensitization to allergen. *J Clin Invest* **100**, 226-233.
- Schwarze, J., Makela, M., Cieslewicz, G., Dakhama, A., Lahn, M., Ikemura, T., Joetham, A. & Gelfand, E. W. (1999).** Transfer of the enhancing effect of respiratory syncytial virus infection on subsequent allergic airway sensitization by T lymphocytes. *J Immunol* **163**, 5729-5734.
- Schwarze, J., O'Donnell, D. R., Rohwedder, A. & Openshaw, P. J. (2004).** Latency and persistence of respiratory syncytial virus despite T cell immunity. *Am J Respir Crit Care Med* **169**, 801-805.
- Sekizawa, K., Ebihara, T. & Sasaki, H. (1995).** Role of substance P in cough during bronchoconstriction in awake guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med* **151**, 815-821.
- Sekizawa, K., Jia, Y. X., Ebihara, T., Hirose, Y., Hirayama, Y. & Sasaki, H. (1996).** Role of substance P in cough. *Pulm Pharmacol* **9**, 323-328.
- Shay, D. K., Holman, R. C., Newman, R. D., Liu, L. L., Stout, J. W. & Anderson, L. J. (1999).** Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996. *Jama* **282**, 1440-1446.
- Sheeran, P., Jafri, H., Carubelli, C., Saavedra, J., Johnson, C., Krisher, K., Sanchez, P. J. & Ramilo, O. (1999).** Elevated cytokine concentrations in the nasopharyngeal and tracheal secretions of children with respiratory syncytial virus disease. *Pediatr Infect Dis J* **18**, 115-122.
- Sigurs, N., Bjarnason, R., Sigurbergsson, F. & Kjellman, B. (2000).** Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. *Am J Respir Crit Care Med* **161**, 1501-1507.
- Sigurs, N., Gustafsson, P. M., Bjarnason, R., Lundberg, F., Schmidt, S., Sigurbergsson, F. & Kjellman, B. (2005).** Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy and asthma and allergy at age 13. *Am J Respir Crit Care Med* **171**, 137-141.
- Simons, K. & Ikonen, E. (1997).** Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-572.

- Simons, K. & Toomre, D. (2000).** Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 31-39.
- Spann, K. M., Tran, K. C., Chi, B., Rabin, R. L. & Collins, P. L. (2004).** Suppression of the induction of alpha, beta, and lambda interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages [corrected]. *J Virol* **78**, 4363-4369.
- Stankiewicz, A. R., Lachapelle, G., Foo, C. P., Radicioni, S. M. & Mosser, D. D. (2005).** Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J Biol Chem* **280**, 38729-38739.
- Stein, R. T., Sherrill, D., Morgan, W. J., Holberg, C. J., Halonen, M., Taussig, L. M., Wright, A. L. & Martinez, F. D. (1999).** Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *Lancet* **354**, 541-545.
- Takeuchi, R., Tsutsumi, H., Osaki, M., Haseyama, K., Mizue, N. & Chiba, S. (1998).** Respiratory syncytial virus infection of human alveolar epithelial cells enhances interferon regulatory factor 1 and interleukin-1beta-converting enzyme gene expression but does not cause apoptosis. *J Virol* **72**, 4498-4502.
- Takimoto, T., Hurwitz, J. L., Zhan, X. & other authors (2005).** Recombinant Sendai virus as a novel vaccine candidate for respiratory syncytial virus. *Viral Immunol* **18**, 255-266.
- Tan, K. H. & Hunziker, W. (2003).** Compartmentalization of Fas and Fas ligand may prevent auto- or paracrine apoptosis in epithelial cells. *Exp Cell Res* **284**, 283-290.
- Techaarpornkul, S., Barretto, N. & Peeples, M. E. (2001).** Functional analysis of recombinant respiratory syncytial virus deletion mutants lacking the small hydrophobic and/or attachment glycoprotein gene. *J Virol* **75**, 6825-6834.
- Teng, M. N. & Collins, P. L. (1999).** Altered growth characteristics of recombinant respiratory syncytial viruses which do not produce NS2 protein. *J Virol* **73**, 466-473.
- Teng, M. N., Whitehead, S. S., Bermingham, A., St Claire, M., Elkins, W. R., Murphy, B. R. & Collins, P. L. (2000).** Recombinant respiratory syncytial virus that does not express the NS1 or M2-2 protein is highly attenuated and immunogenic in chimpanzees. *J Virol* **74**, 9317-9321.
- Teng, M. N., Whitehead, S. S. & Collins, P. L. (2001).** Contribution of the respiratory syncytial virus G glycoprotein and its secreted and membrane-bound forms to virus replication in vitro and in vivo. *Virology* **289**, 283-296.
- Teng, M. N. & Collins, P. L. (2002).** The central conserved cystine noose of the attachment G protein of human respiratory syncytial virus is not required for efficient viral infection in vitro or in vivo. *J Virol* **76**, 6164-6171.
- Thomas, L. H., Stott, E. J., Jones, P. W., Jebbett, N. J. & Collins, A. P. (1980).** The possible role of respiratory syncytial virus and Pasteurella spp in calf respiratory disease. *Vet Rec* **107**, 304-307.
- Thomas, L. H., Wickremasinghe, M. I., Sharland, M. & Friedland, J. S. (2000).** Synergistic upregulation of interleukin-8 secretion from pulmonary epithelial cells by direct and monocyte-dependent effects of respiratory syncytial virus infection. *J Virol* **74**, 8425-8433.

- Thomas, M., Massimi, P. & Banks, L. (1996a).** HPV-18 E6 inhibits p53 DNA binding activity regardless of the oligomeric state of p53 or the exact p53 recognition sequence. *Oncogene* **13**, 471-480.
- Thomas, M., Matlashewski, G., Pim, D. & Banks, L. (1996b).** Induction of apoptosis by p53 is independent of its oligomeric state and can be abolished by HPV-18 E6 through ubiquitin mediated degradation. *Oncogene* **13**, 265-273.
- Tinel, A. & Tschopp, J. (2004).** The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science* **304**, 843-846.
- Tinel, A., Janssens, S., Lippens, S., Cuenin, S., Logette, E., Jaccard, B., Quadroni, M. & Tschopp, J. (2007).** Autoproteolysis of PIDD marks the bifurcation between pro-death caspase-2 and pro-survival NF-kappaB pathway. *Embo J* **26**, 197-208.
- Tripp, R. A., Jones, L. P., Haynes, L. M., Zheng, H., Murphy, P. M. & Anderson, L. J. (2001).** CX3C chemokine mimicry by respiratory syncytial virus G glycoprotein. *Nat Immunol* **2**, 732-738.
- Tripp, R. A., Barskey, A., Goss, L. & Anderson, L. J. (2002).** Substance P receptor expression on lymphocytes is associated with the immune response to respiratory syncytial virus infection. *J Neuroimmunol* **129**, 141-153.
- Tripp, R. A., Dakhama, A., Jones, L. P., Barskey, A., Gelfand, E. W. & Anderson, L. J. (2003).** The G glycoprotein of respiratory syncytial virus depresses respiratory rates through the CX3C motif and substance P. *J Virol* **77**, 6580-6584.
- Valarcher, J. F., Furze, J., Wyld, S. G., Cook, R., Zimmer, G., Herrler, G. & Taylor, G. (2006).** Bovine respiratory syncytial virus lacking the virokinin or with a mutation in furin cleavage site RA(R/K)R109 induces less pulmonary inflammation without impeding the induction of protective immunity in calves. *J Gen Virol* **87**, 1659-1667.
- Valarcher, J. F. & Taylor, G. (2007).** Bovine respiratory syncytial virus infection. *Vet Res* **38**, 153-180.
- van Biesen, T., Hawes, B. E., Raymond, J. R., Luttrell, L. M., Koch, W. J. & Lefkowitz, R. J. (1996).** G(o)-protein alpha-subunits activate mitogen-activated protein kinase via a novel protein kinase C-dependent mechanism. *J Biol Chem* **271**, 1266-1269.
- Vandivier, R. W., Henson, P. M. & Douglas, I. S. (2006).** Burying the dead: the impact of failed apoptotic cell removal (efferocytosis) on chronic inflammatory lung disease. *Chest* **129**, 1673-1682.
- Verhoeff, J., Van der Ban, M. & van Nieuwstadt, A. P. (1984).** Bovine respiratory syncytial virus infections in young dairy cattle: clinical and haematological findings. *Vet Rec* **114**, 9-12.
- Viuff, B., Uttenthal, A., Tegtmeyer, C. & Alexandersen, S. (1996).** Sites of replication of bovine respiratory syncytial virus in naturally infected calves as determined by in situ hybridization. *Vet Pathol* **33**, 383-390.
- Wagner, R., Herwig, A., Azzouz, N. & Klenk, H. D. (2005).** Acylation-mediated membrane anchoring of avian influenza virus hemagglutinin is essential for fusion pore formation and virus infectivity. *J Virol* **79**, 6449-6458.

- Wechsler, S. L., Lambert, D. M., Galinski, M. S., Heineke, B. E., Lambert, A. L., Mink, M., Rochovansky, O. M. & Pons, M. W. (1985).** A simple method for increased recovery of purified paramyxovirus virions. *J Virol Methods* **12**, 179-182.
- Weidmann, A., Fischer, C., Ohgimoto, S., Ruth, C., ter Meulen, V. & Schneider-Schaulies, S. (2000).** Measles virus-induced immunosuppression in vitro is independent of complex glycosylation of viral glycoproteins and of hemifusion. *J Virol* **74**, 7548-7553.
- Whimbey, E., Couch, R. B., Englund, J. A. & other authors (1995).** Respiratory syncytial virus pneumonia in hospitalized adult patients with leukemia. *Clin Infect Dis* **21**, 376-379.
- Whimbey, E., Champlin, R. E., Couch, R. B. & other authors (1996).** Community respiratory virus infections among hospitalized adult bone marrow transplant recipients. *Clin Infect Dis* **22**, 778-782.
- Widdicombe, J. G. (1995).** Neurophysiology of the cough reflex. *Eur Respir J* **8**, 1193-1202.
- Wolter, K. G., Hsu, Y. T., Smith, C. L., Nechushtan, A., Xi, X. G. & Youle, R. J. (1997).** Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* **139**, 1281-1292.
- Wright, P. F., Karron, R. A., Belshe, R. B., Shi, J. R., Randolph, V. B., Collins, P. L., O'Shea A, F., Gruber, W. C. & Murphy, B. R. (2007).** The absence of enhanced disease with wild type respiratory syncytial virus infection occurring after receipt of live, attenuated, respiratory syncytial virus vaccines. *Vaccine*.
- Wurzer, W. J., Planz, O., Ehrhardt, C., Giner, M., Silberzahn, T., Pleschka, S. & Ludwig, S. (2003).** Caspase 3 activation is essential for efficient influenza virus propagation. *Embo J* **22**, 2717-2728.
- Wyllie, A. H., Morris, R. G., Smith, A. L. & Dunlop, D. (1984).** Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* **142**, 67-77.
- Yamashita, K., Koide, Y. & Aiyoshi, Y. (1983).** Effects of substance P on thyroidal cyclic AMP levels and thyroid hormone release from canine thyroid slices. *Life Sci* **32**, 2163-2166.
- Yu, K. L., Wang, X. A., Civiello, R. L. & other authors (2006).** Respiratory syncytial virus fusion inhibitors. Part 3: Water-soluble benzimidazol-2-one derivatives with antiviral activity in vivo. *Bioorg Med Chem Lett* **16**, 1115-1122.
- Yu, K. L., Sin, N., Civiello, R. L. & other authors (2007).** Respiratory syncytial virus fusion inhibitors. Part 4: optimization for oral bioavailability. *Bioorg Med Chem Lett* **17**, 895-901.
- Zhang, J., Barak, L. S., Anborgh, P. H., Laporte, S. A., Caron, M. G. & Ferguson, S. S. (1999).** Cellular trafficking of G protein-coupled receptor/beta-arrestin endocytic complexes. *J Biol Chem* **274**, 10999-11006.
- Zhang, L., Peeples, M. E., Boucher, R. C., Collins, P. L. & Pickles, R. J. (2002).** Respiratory syncytial virus infection of human airway epithelial cells is polarized, specific to ciliated cells, and without obvious cytopathology. *J Virol* **76**, 5654-5666.
- Zimmer, G., Lottspeich, F., Maisner, A., Klenk, H. D. & Herrler, G. (1997).** Molecular characterization of gp40, a mucin-type glycoprotein from the apical plasma membrane of Madin-Darby canine kidney cells (type I). *Biochem J* **326** (Pt 1), 99-108.

Zimmer, G., Budz, L. & Herrler, G. (2001a). Proteolytic activation of respiratory syncytial virus fusion protein. Cleavage at two furin consensus sequences. *J Biol Chem* **276**, 31642-31650.

Zimmer, G., Trotz, I. & Herrler, G. (2001b). N-glycans of F protein differentially affect fusion activity of human respiratory syncytial virus. *J Virol* **75**, 4744-4751.

Zimmer, G., Conzelmann, K. K. & Herrler, G. (2002). Cleavage at the furin consensus sequence RAR/KR(109) and presence of the intervening peptide of the respiratory syncytial virus fusion protein are dispensable for virus replication in cell culture. *J Virol* **76**, 9218-9224.

Zimmer, G., Rohn, M., McGregor, G. P., Schemann, M., Conzelmann, K. K. & Herrler, G. (2003). Virokinin, a bioactive peptide of the tachykinin family, is released from the fusion protein of bovine respiratory syncytial virus. *J Biol Chem* **278**, 46854-46861.

Zimmer, G., Bossow, S., Kolesnikova, L., Hinz, M., Neubert, W. J. & Herrler, G. (2005). A chimeric respiratory syncytial virus fusion protein functionally replaces the F and HN glycoproteins in recombinant Sendai virus. *J Virol* **79**, 10467-10477.

Lebenslauf

Nachname: Eckardt-Michel
Vorname: Julia
Geburtstag: 08. Oktober 1979
Geburtsort: Marburg
Nationalität: Deutsch
Adresse: Ernststraße 16
30559 Hannover, Deutschland

Studium und Promotion

10/2004 – 02/2008	Promotion „Untersuchungen zur Cytopathogenität des Fusionsproteins des respiratorischen Syncytialvirus (RSV)“ Institut für Virologie, PD Dr. Gert Zimmer, Tierärztliche Hochschule Hannover
10/2001 – 09/2004	Biologie / Diplom Biologin Philipps-Universität Marburg
10/1999 – 09/2001	Biologie / Vordiplom Philipps-Universität Marburg

Schulische Ausbildung

08/1989 – 06/1999	Abitur Gymnasium Elisabethschule, Marburg
-------------------	---

Stipendium

10/2004 – 10/2007	Assoziiertes Mitglied Graduiertenkolleg 745, „Mukosale Erreger-Wirt-Interaktionen“, Deutsche Forschungsgemeinschaft
-------------------	---

Veröffentlichung und Tagungsbeiträge

Veröffentlichung

Eckardt-Michel J., Lorek M., Baxmann D., and Zimmer G. "The fusion protein of respiratory syncytial virus activates transcription factor p53 leading to apoptosis and shedding of epithelial cells". (zur Publikation eingereicht)

Tagungsbeiträge

Eckardt, J. and Zimmer, G. "Activation of G protein-coupled tachykinin receptors in polarized MDCK cells by a viral peptide hormone (Virokinin)". Ann. Meeting of the "Gesellschaft für Virologie", March 16-19, Hannover 2005 (Posterpräsentation)

Eckardt J., Lorek M., and Zimmer G. "Activation of G protein coupled tachykinin receptors in polarized MDCK cells by a viral peptide hormone". Fourth Workshop study section cell biology of the german society for virology. September 26-28, 2005, Deidesheim (Vortrag)

Eckardt J., Lorek M., and Zimmer G. "Bovine Respiratory Syncytial Virus F Protein induces a transdifferentiation process in epithelial cells". Ann. Meeting of the "Gesellschaft für Virologie", March 15-18, München 2006 (Vortrag)

Eckardt-Michel J., Lorek M., and Zimmer G. "The fusion protein of respiratory syncytial virus (RSV) activates transcription factor p53 leading to apoptosis and shedding of epithelial cells". Ann. Meeting of the European Society of Virology, September 1-5, Nürnberg 2007 (Vortrag)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Gert Zimmer für die Überlassung des Themas und für die hervorragende Betreuung und Unterstützung während der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof Dr. Hassan Y. Naim danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Bei Prof. Dr. Günther Keil und Prof. Dr. Klaus Überla möchte ich mich für das Bereitstellen der synthetisierten, codon-optimierten RSV F-Gene bedanken, ohne die eine Untersuchung der Cytopathogenität nur schwer möglich gewesen wäre.

Herrn Prof. Dr. Nigel Bunnett danke ich für das rTACR-1-Plasmid.

Bei Prof. Dr. Matthias Döbelstein möchte ich mich für die Hilfestellung in der p53-Forschung und für die Bereitstellung der p53-DN-Mutante (Plasmid) bedanken.

Für die zur Verfügung gestellten MDCK-(hF-GFP)-Zelllinie bzw. MDCK-(SevF-GFP)-Zelllinie bedanke ich mich bei Markus Lorek und Diane Baxmann.

Ich möchte mich außerdem bei allen Mitarbeitern des Instituts für Virologie, für ihre Hilfsbereitschaft, die gute Zusammenarbeit und das gute Arbeitsklima bedanken. Besonderer Dank gilt meiner „Büromitbewohnerin“ Alexandra mit der ich viele amüsante und schöne Momente im Büro und im Labor hatte. Den „Labor-Bewohnern“ André, Caro, Christine, Christel, Diane, Jörg, Katarina, Katherina, Maren, Markus H., Markus L., Martina, Nazeer, Sabine, Sahar und Sandra danke ich für die schönen und lustigen Momente im und außerhalb des Labors.

Meinen Eltern möchte ich für Ihre Geduld und moralische Unterstützung danken und dafür, dass Sie mir ermöglicht haben, meinen Weg zu machen.

Holger danke ich für die unerschöpfliche Geduld und die Unterstützung bei dieser Arbeit. Auch wenn ein riesiger Unterschied zwischen Quotierung und Cytopathogenität besteht, danke ich ihm fürs Zuhören zu jeder Tages- und Nachtzeit.

