

**Aus der Universitätsklinik für Anaesthesiologie und
Intensivmedizin**

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. K. Unertl

**Aktivierung der MAP Kinase p38 in RSV infizierten
Epithelzellen unter dem Einfluss von Makrophagen**

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

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

**vorgelegt von
Sandra Reinhardt, geb. Huonker
aus
Tübingen
2011**

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Respiratory Syncytial Virus	1
1.1.1 Klassifikation und Struktur	1
1.1.2 Epidemiologie	2
1.1.3 Übertragung und Klinik	3
1.1.4 Zelluläre Antwort nach RSV-Infektion	5
1.2 Inflammatorische Mediatoren	8
1.2.1 Beschreibung der untersuchten Zytokine und Chemokine.....	12
1.2.1.1 Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF-alpha)	13
1.2.1.2 Interleukin-1beta (IL-1beta).....	15
1.2.1.3 Interleukin-6 (IL-6)	16
1.2.1.4 mKC und mMIP-2.....	17
1.2.1.5 Interleukin-10 (IL-10)	18
1.2.1.6 Makrophagen Inflammatorisches Protein 1 (MIP-1).....	18
1.2.2 Lungeninflammation nach RSV-Infektion.....	19
1.3 Mitogen aktivierte Protein Kinasen (MAP Kinasen)	21
1.4 Fragestellung.....	24
2. Material und Methoden	26
2.1 Zellkultur	26
2.1.1 Material	26
2.1.2 Zellkulturmethoden und -bedingungen	31
2.2 Zellstimulation.....	34
2.2.1 Stimulation der Epithel-Zellen (LA-4/MLE-12) mit mTNF-alpha	34
2.2.2 Infektion der MLE-12 Zellen mit Respiratory Syncytial Virus (RSV) und UV- inaktiviertem Respiratory Syncytial Virus (UV-RSV)	35
2.2.3 Infektion von MLE-12 Zellen mit RSV unter vorheriger Inkubation der Zellen mit p38 MAP Kinase Inhibitor (SB 203580)	36
2.2.4. Inkubation von MLE-12 Zellen mit Überständen RSV infizierter MH-S Zellen unter Zugabe von Anti-Maus TNF-alpha Antikörper.....	37
2.2.5 Gesamtproteingewinnung und Gewinnung der Zellüberstände für die ELISAs	39

2.3 Westernblot	42
2.3.1 Elektrophorese.....	42
2.3.1.1 Herstellung der Elektrophoresegele	43
2.3.1.2 Vorbereitung der Proben für Elektrophorese	44
2.3.2 Blotten.....	46
2.3.3. Immundetektion	48
2.4. ELISA (Enzym-linked immunosorbent assay) zur Bestimmung der Chemokin- und Zytokin- Konzentrationen im Zellüberstand.....	51
2.4.1 Prinzip des Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	52
2.5 Statistische Auswertung	53
3. Ergebnisse.....	54
3.1. Expression von TNF-Rezeptoren.....	54
3.2. Expression von pp38 in den Zelllinien LA-4 und MLE-12	55
3.2.1 Expression von pp38 in LA-4 Zellen	55
3.2.2 Expression von pp38 in MLE-12 Zellen	57
3.3 Aktivierung der p38 MAP Kinase in den Zelllinien LA-4 und MLE-12	59
3.3.1 Aktivierung der p38 MAP Kinase in LA-4 Zellen	59
3.3.2 Aktivierung der p38 MAP Kinase in MLE-12 Zellen	61
3.4 Produktion von Mediatoren durch LA-4 und MLE-12 Zellen nach Stimulation mit TNF-alpha	62
3.4.1 mMIP-2 Konzentration im Überstand TNF-alpha stimulierter LA-4 und MLE-12 Zellen	63
3.4.2 mKC Konzentration im Überstand TNF-alpha stimulierter LA-4 und MLE-12 Zellen	65
3.4.3 mL-6 Konzentration im Überstand TNF-alpha stimulierter MLE-12 Zellen.....	67
3.4.4 mMIP-1 β Konzentration im Überstand TNF-alpha stimulierter MLE-12 Zellen	68
3.5. Inkubation von MLE-12 Zellen mit Überständen RSV infizierter alveolärer Makrophagen (MH-S-Zellen)	70
3.5.1 Expression von pp38 in MLE-12 Zellen nach Inkubation mit Überständen RSV infizierter alveolärer Makrophagen (MH-S-Zellen)	71
3.5.2 Produktion von Mediatoren durch MLE-12 Zellen nach Inkubation mit Überständen RSV infizierter alveolärer Makrophagen (MH-S-Zellen).....	72
3.6. Infektion von MLE-12 Zellen mit RSV und UV-inaktiviertem RSV (MOI 1)	77
3.6.1 Aktivierung der p38 MAP Kinase und pp38 Expression in MLE-12 Zellen nach	

Infektion mit RSV	77
3.6.2 Aktivierung der p38 MAP Kinase und pp38 Expression in MLE-12 Zellen nach Infektion mit UV-inaktiviertem RSV	81
3.6.3 Produktion von Mediatoren durch Epithelzellen (MLE-12) nach Infektion mit RSV und UV-inaktiviertem RSV	85
3.7 Infektion von MLE-12 Zellen mit RS-Virus nach Inkubation mit p38 MAP Kinase Inhibitor (SB 203580)	89
3.7.1 p38 MAP Kinase Aktivierung nach Inkubation mit Inhibitor	89
3.7.2 Mediatorfreisetzung durch MLE-12 Zellen nach Inkubation mit Inhibitor und anschließender RSV-Infektion	91
4. Diskussion	94
4.1 Mediatorproduktion im Rahmen der RSV-Infektion	95
4.2 Einfluss von TNF-alpha bei der Infektion mit RSV	96
4.3 Rolle der p38 MAP Kinase bei RSV-Infektion	99
4.4. Inhibierung der p38 MAP Kinase und Ihre Folgen	101
5 Zusammenfassung	103
6. Anhang	105
6.1 Abkürzungsverzeichnis	105
6.2 Abbildungsverzeichnis	107
6.3 Literaturverzeichnis	109
6.4 Danksagung	121
6.5 Lebenslauf	121