Aus der
Medizinischen Klinik III
Pneumologie, Allergologie und Schlaf- und Beatmungsmedizin
des Berufsgenossenschaftlichen Universitätsklinikum
Bergmannsheil
der Ruhr-Universität Bochum
Ehem. Direktor: Prof. Dr. med. G. Schultze-Werninghaus

Untersuchung der Spezifität antiviraler Faktoren in der
bronchoalveolären Lavage

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Matthias Suermann
aus Bochum

2011

Dekan:	Prof. Dr. med. K. Überla
Referent:	Prof. Dr. med. G. Schultze-Werninghaus
Koreferent:	Prof. Dr. med. R. D. Merget

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Juni 2011

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Das natürliche Abwehrsystem der Lunge	1
1.2. Epidemiologische Bedeutung von respiratorischen Viren.....	3
1.2.1. Bedeutung respiratorischer Viren bei der COPD	4
1.2.2. Bedeutung respiratorischer Viren beim Asthma bronchiale	5
1.3. Untersuchungen der BAL auf das Vorliegen antiviraler Faktoren	6
1.4. Fragestellung.....	7
 2. Patienten, Material und Methoden	 9
2.1. Patienten	9
2.1.1. Patientenkollektiv und Probenmaterial	9
2.1.2. Sarkoidose	10
2.1.3. COPD.....	11
2.2. Material.....	14
2.2.1. Virusmaterial	14
2.2.2. Medien und Reagenzien	14
2.2.3. Geräteliste und Verbrauchsmaterial.....	15
2.3. Methoden.....	16
2.3.1. Aufreinigung der BAL-Überstände	16
2.3.2. Vereinigung der aufgereinigten BALs.....	17
2.3.3. Protein-Quantifizierung	17
2.3.4. Zellkulturen	18
2.3.4.1. Infektion von Hep-2-Zellen mit RSV in vitro.....	19
2.3.4.2. Infektion von A549-Zellen mit HRV in vitro	22
2.3.4.3. Infektion von HeLa-Zellen mit AdV in vitro.....	22
2.3.5. Isolation der mRNA aus den Zellüberständen.....	22
2.3.6. Synthese der cDNA.....	23
2.3.7. Quantitative real-time PCR	25
2.3.7.1. Prinzip der quantitativen real-time PCR.....	25
2.3.7.2. Primer und Sonden.....	27
2.3.7.3. Durchführung der PCR	27
2.3.8. Relative Quantifizierung mittels delta-delta-Ct-Methode	29
2.3.9. statistische Auswertung	30
 3. Ergebnisse	 31
3.1. Proteinquantifizierung der vereinigten BALs.....	31
3.2. Einfluss der BAL auf eine Infektion mit RSV in vitro	32
3.2.1. Etablierung eines Infektionsmodells für RSV in vitro.....	32
3.2.2. Einfluss der BAL auf eine Infektion mit RSV in vitro.....	35
3.3. Einfluss der BAL auf eine Infektion mit HRV in vitro	39
3.3.1. Etablierung eines Infektionsmodells für HRV in vitro	39
3.3.2. Einfluss der BAL auf eine Infektion mit HRV in vitro	40
3.4. Einfluss der BAL auf eine Infektion mit AdV in vitro.....	44
3.4.1. Etablierung eines Infektionsmodells für AdV in vitro	44

3.4.2. Einfluss der BAL auf eine Infektion mit AdV in vitro	45
3.5. Zusammenfassung der Ergebnisse	48
4. Diskussion	50
4.1. Unterschiede im Proteingehalt der Sarkoidose- und COPD-BAL	50
4.2. Einfluss der BAL auf eine Infektion mit Atemwegsviren in vitro	51
4.2.1. Einordnung der Ergebnisse in den aktuellen Stand der Forschung	51
4.2.2. Zellulärer Wirkmechanismus der untersuchten Viren.....	56
4.2.2.1. RSV	56
4.2.2.2. HRV	59
4.2.2.3. AdV.....	64
5. Zusammenfassung	68
6. Literaturverzeichnis	71
7. Danksagung	
8. Lebenslauf	

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
AdV	Adenovirus
ATCC	American Type Culture Collection
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BSA	Bovines Serumalbumin
CBBG	Coomassie-Brilliant-Blau G-250
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
COPD	Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung
CRP	C-reaktives Protein
Ct	Schwellenwert-Zyklus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELF	Epithelial Lining Fluid
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay
FCS	Fötales Kälberserum
FEV ₁	forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde
GOLD	Global Initiative for chronic obstructive lung disease
GUS	β-Glucuronidase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure
HRV	Humanes Rhinovirus
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
ICS	inhalative Glukokortikosteroide
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
m.o.i.	multiplicity of infection
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NMWL	Nominal Molecular Weight Limit
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
Pen	Penicillin

PLUNC	palate, lung and nasal epithelium carcinoma assosiated protein
POPG	Palmitoyl-oleoyl-phosphatidylglycerol
qPCR	quantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RSV	Respiratorisches Syncytial Virus
RZB	Relative Zentrifugen Beschleunigung
sIL2-R	löslicher Interleukin2-Rezeptor
SLPI	secretary leucocyte protease inhibitor
Strep	Streptomycin
UPM	Umdrehungen pro Minute

1. Einleitung

1.1. Das natürliche Abwehrsystem der Lunge

Die menschliche Lunge ist ein komplexes Organ, welches dem Gasaustausch des Organismus dient. Durch die Aufzweigung zahlreicher Bronchien, Bronchiolen und stark vaskularisierter Alveolen entsteht dabei ein System mit einer Oberfläche von über 100 m². Die Atmung setzt dieses Organ der ständigen Exposition von Mikroorganismen aus, die sich in der eingeatmeten Luft befinden. Für die Integrität der Lunge ist es daher wichtig, ein effektives Abwehrsystem zu etablieren, welches die Invasion von Mikroorganismen zu verhindern im Stande ist. Gleichzeitig jedoch dürfen die eingeleiteten Abwehrprozesse nur in einem sehr begrenzten Reaktionsausmaß stattfinden, da überschießende Prozesse die Funktion und Struktur der Lunge auf Grund ihrer Empfindlichkeit irreversibel beeinträchtigen können.

Die Abwehr der Lunge schließt strukturelle, physikalische und funktionelle Mechanismen ein (Whitsett, 2002). Das angeborene Immunsystem steht dabei in der ersten Reihe der direkten Abwehr von Mikroorganismen und der Stimulation einer Antwort des adaptiven Immunsystems (Medzhitov and Janeway, 1997). Die zellulären Komponenten des angeborenen Immunsystems beinhalten neutrophile Granulozyten, Makrophagen, natürliche Killerzellen, eosinophile Granulozyten und weitere Zellen.

Die Atemwegsepithelzellen formen eine Barriere zwischen dem inneren Milieu und der Umgebung und bilden dadurch die erste Kontaktfläche für inhalierte Substanzen wie Zigarettenrauch, Allergene und Mikroorganismen (Diamond et al., 2000). Sie sind in die angeborene Immunität aktiv eingebunden und können durch die Produktion von Zytokinen und weiteren Mediatoren (siehe unten) Entzündungszellen rekrutieren und aktivieren (Takizawa, 2005; Schleimer, 2004). Dem Atemwegsepithel direkt aufgelagert befindet sich ein dünner Flüssigkeitsfilm, die so genannte Epithelial Lining Fluid (ELF), in der sich zelluläre und lösliche Bestandteile des Abwehrsystems befinden.

Durch einen oralwärts gerichteten Zilienschlag des bronchialen Flimmerepithels, die so genannte mukoziliäre Clearance, wird bereits ein Großteil der in der ELF gebundenen Mikroorganismen entfernt und ein weiteres Eindringen in den Körper verhindert. Zusätzlich sind im Atemwegssekret Proteine und Peptide enthalten, welche direkt Pathogene abtöten können und darüber hinaus die Immunantwort modulieren (Beisswenger and Bals, 2005).

Die klassischen Komponenten, die antimikrobielle Aktivität besitzen, sind Lysozym, Lactoferrin, secretory Phospholipase A und secretory leucocyte protease inhibitor (SLPI). Weitere Substanzen wie Komplement, Surfactant Proteine, Clara-Zell-Proteine (CC10, CCSP) und Proteine der PLUNC-Familie (palate, lung and nasal epithelium carcinoma associated protein) (Bingle and Craven, 2002) tragen ebenfalls zur Erregerabwehr bei. Die zellulären Quellen dieser Substanzen sind die Atemwegsepithelzellen, neutrophile Granulozyten und Makrophagen.

Von den genannten Vertretern des angeborenen Immunsystems wird hauptsächlich bei den Interferonen und Defensinen eine antivirale Aktivität beobachtet.

Bei den Defensinen handelt es sich um erst kürzlich entdeckte, kationische Peptide, die ein weites Spektrum an antimikrobieller Aktivität aufweisen. Sie lassen sich beim Menschen hauptsächlich in zwei Klassen, die α - und β -Defensine unterteilen (Ganz and Weiss 1997), wobei nur die β -Defensine von Epithelzellen produziert werden (Schutte and McCray, 2002). Die α -Defensine hingegen werden von verschiedenen Zellen, hauptsächlich neutrophilen Granulozyten sowie Panethschen Körnerzellen des Dünndarms freigesetzt (van Wetering et al., 1999). Obwohl der genaue Wirkmechanismus der Defensine noch nicht erforscht werden konnte, wird ein direkter Angriff an der Membran von Bakterien, Pilzen und Parasiten vermutet (Brogden, 2005). Ebenso konnte eine Wirkung gegen verschiedene Viren, darunter auch Influenza A (Hartson et al., 2006) und Adenovirus als Vertreter respiratorischer Viren (Bastian and Schäfer, 2001; Gropp et al., 1999) gezeigt werden. Jedoch ist auch hier bisher

noch nicht bekannt, auf welchem Mechanismus die Unterdrückung der viralen Replikation beruht.

Bei den Typ I Interferonen – Interferon- α (IFN- α) und Interferon- β (IFN- β) - handelt es sich um eine Gruppe von Zytokinen, welche eine antivirale Immunantwort auslösen können (Samuel, 2001). Ihre Freisetzung erfolgt durch virusinfizierte Epithelzellen des Respirationstraktes. Durch auto- und parakrine Stimulation sind sie in der Lage, über eine Vielzahl weiterer Immunantworten eine virale Replikation zu begrenzen.

Das angeborene Immunsystem weist somit viele Abwehrmechanismen auf, die auf unterschiedlichen Ebenen Pathogenen entgegenwirken. Ein Defekt einzelner Komponenten endet daher für den Patienten meist nicht letal, kann aber verschiedenen Mikroorganismen das Eindringen in den menschlichen Körper erleichtern. Die dadurch eingeleiteten sekundären Immunprozesse können im Verlauf durch überschießende bzw. vermehrte Aktivierung inflammatorischer Prozesse schließlich zu größeren Gewebedefekten führen. Es wird vermutet, dass eine Störung dieses komplexen Gleichgewichtes auch in der Pathogenese verschiedener Lungenerkrankungen eine Rolle spielt.

1.2. Epidemiologische Bedeutung von respiratorischen Viren

Respiratorische Viren sind in der Lage, eine Vielzahl an Atemwegserkrankungen hervorzurufen. Dazu gehören unter anderem die Rhinitis, die Tracheobronchitis, sowie virale Pneumonien und die Bronchiolitis obliterans durch Respiratory-Syncytial-Virus (RSV) bei Kleinkindern. Bei Patienten mit chronischen Atemwegs- und/oder Lungenerkrankungen wie dem Asthma bronchiale oder der Chronisch Obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) können sie zu akuten Exazerbationen führen. Die epidemiologische Relevanz der Atemwegsviren für diese Erkrankungen lässt sich erst seit einigen Jahren durch die Möglichkeit neuer Nachweisverfahren mit größerer Genauigkeit darstellen. So ist die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) als molekularbiologisches Verfahren im Nachweis von Viren im Rahmen eines

akuten Krankheitsgeschehens um ein Vielfaches sensibler als die früheren, zur Diagnostik zur Verfügung stehenden Testsysteme. Die PCR benötigt zur Erregerdiagnostik durch Amplifikation mittels sequenzspezifischer Primer lediglich geringe Mengen der gesuchten Nukleinsäure im Ausgangsmaterial. Hierdurch ist es sogar möglich, unterschiedliche Serotypen zu erkennen. Innerhalb weniger Stunden gelingt somit eine sehr sensitive Diagnostik.

Vor Etablierung der PCR konnte eine virale Infektion entweder direkt (Viruskultur, direkte Immunfluoreszenz) oder indirekt durch den Nachweis vom Patienten gebildeter Antikörper (Western-Blot, ELISA, indirekte Immunfluoreszenz) diagnostiziert werden. Die Problematik bestand neben dem weniger sensiblen Nachweis jedoch im zeitlichen Zusammenhang mit dem Krankheitsgeschehen, da Kultur und Antikörperdiagnostik erst mit einer gewissen zeitlichen Verzögerung zu einem Ergebnis führten, zu der das akute Krankheitsgeschehen meist schon überwunden war.

1.2.1. Bedeutung respiratorischer Viren bei der COPD

Bei der COPD kommt es regelmäßig zu akuten Exazerbationen, welche mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität einhergehen (Seemungal et al., 1998). Lange Zeit ging man davon aus, dass etwa die Hälfte aller Exazerbationen bakterieller Genese sei und eine virale Infektion nur etwa in 30% der Fälle zu Grunde läge (Sethi, 2000).

Neuere Untersuchungen können durch Anwendung der PCR zeigen, dass in mehr als der Hälfte (56%) aller hospitalisierten COPD-Exazerbationen Atemwegviren nachweisbar sind. Rhinoviren sind hierbei mit 36% die häufigsten Viren, gefolgt von Influenza A (25%) und RSV (22%). Zudem zeigt sich, dass nur der Nachweis in den unteren Atemwegen mit der Exazerbation signifikant assoziiert (Rohde et al., 2003) ist. Eine weitere Studie berichtet, dass im ambulanten Bereich etwa 40% der Exazerbationen viraler Genese sind (Seemungal et al., 2001). Die gleiche Studie zeigt, dass virale Exazerbationen einen schwereren und längeren Krankheitsverlauf verglichen mit Exazerbationen ohne virale Genese aufzeigen.

Durch die zwischenzeitliche Etablierung quantitativer Nachweisverfahren (real-time TaqMan-PCR) gelang es, die infektiologische Relevanz dieser Befunde weiter zu untersuchen und zu validieren (Borg et al., 2003; Rohde et al., 2001; Arinir et al. 2002; Rohde et al. 2005).

Für RSV konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit COPD die Viruslast im Vergleich zu Kindern mit akutem respiratorischen Infekt signifikant niedriger liegt und auch während einer Exazerbation nicht signifikant ansteigt (Borg et al., 2003). Bei Patienten mit Influenza A-Nachweis findet sich im Gegensatz dazu eine signifikant höhere Viruslast bei Patienten mit akuter Exazerbation im Vergleich zu Patienten mit stabiler Erkrankung (Rohde et al., 2001).

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die verschiedenen Atemwegsviren eine unterschiedliche Rolle bei der COPD-Exazerbation spielen.

1.2.2. Bedeutung respiratorischer Viren beim Asthma bronchiale

Beim Asthma bronchiale als weiterer chronischer Erkrankung der Atemwege, kommt es ebenfalls zu akuten Exazerbationen. In den 90er Jahren konnte gezeigt werden, dass eine Infektion der oberen Atemwege mit respiratorischen Viren in bis zu 60% der akuten Exazerbationen bei Erwachsenen vorliegt (Nicholson et al., 1993). Bei Kindern liegt dieser Wert mit über 80% sogar noch deutlich höher (Johnston et al., 1995).

Ähnlich den bei der COPD gewonnenen Erkenntnissen ist in diesen Studien das Rhinovirus (HRV) mit etwa 66% der mit Abstand am häufigsten nachgewiesene Erreger. Influenza, Coronaviren und das RSV können ebenfalls nachgewiesen werden, jedoch in deutlich geringerem Ausmaß. Dabei zeigt sich, dass durch diese Viren schwere Exazerbationen auch bei Patienten mit guter Therapietreue und optimaler Dosierung ihrer inhalativen Kortikosteroidtherapie (ICS) hervorgerufen werden können (Reddel et al., 1999; Doull et al., 1997). Von besonderer Auffälligkeit beim Asthma bronchiale ist darüber hinaus eine starke Korrelation zwischen dem saisonalen Auftreten

viraler Infektionen des oberen Respirationstraktes und der Hospitalisierung von Patienten auf Grund akuter Exazerbationen (Johnston et al., 1996).

Neueste Erkenntnisse weisen darauf hin, dass beim Asthma bronchiale eine verminderte antivirale Aktivität des angeborenen Immunsystems auf eine Infektion des Bronchialepithels mit Rhinoviren vorliegt (Wark et al., 2005). Es wurden Bronchialepithelzellen von Asthmatikern und gesunden Kontrollpersonen im Rahmen einer Bronchoskopie gewonnen und anschließend in Kultur genommen. Die Bronchialepithelzellen von Asthmatikern weisen verglichen mit den Kontrollen eine vermehrte virale Replikation auf. Es wird vermutet, dass dieser Effekt auf eine verminderte Produktion von Interferon- β im Bronchialepithel der Asthmatiker zurückzuführen ist.

1.3. Untersuchungen der BAL auf das Vorliegen antiviraler Faktoren

In der Vergangenheit ist es gelungen ein Testsystem zu entwickeln, welches den Einfluss löslicher Bestandteile in der Epithelial Lining Fluid (ELF) der Lunge auf eine Adenovirusinfektion von Zellen messen kann (Bastian and Bewig, 1999). Mit Hilfe dieses Systems kann nachgewiesen werden, dass die ELF im Rahmen verschiedener Atemwegs- und Lungenerkrankungen einen unterschiedlichen Einfluss auf die Adenovirusinfektion von Atemwegszellen hat.

Die aus der bronchoalveolären Lavage (BAL) gewonnenen Überstände einiger Patienten vermögen die Adenovirusinfektion von 293-Zellen annähernd vollständig zu unterbinden, während BAL-Überstände anderer Patienten hingegen keinen Einfluss auf die Infektion ausüben. Dieser Effekt ist unabhängig von Alter und Geschlecht der Patienten oder einer immunsuppressiven Therapie, wird aber von der Grunderkrankung beeinflusst. So sind in der Gruppe der stark hemmenden BALs überproportional häufig Patienten mit Sarkoidose, Tuberkulose und bakteriellen Pneumonien, während BALs von HIV Patienten mit einer *Pneumocystis carinii* Pneumonie und von Asthmatikern die Infektion nicht zu hemmen vermögen (Tabelle 1) (Bastian and Schäfer, 2001). Bisher unveröffentlichte Daten dieser Arbeitsgruppe zeigen

zudem bei acht von acht untersuchten COPD-Patienten eine verminderte Hemmung der BAL-Überstände auf die Adenovirusinfektion in vitro mit einer Infektionsrate von über 80% der Zellen in der Zellkultur.

Tabelle 1: BAL-Überstände verschiedener Erkrankungen wurden auf ihre Fähigkeit zur adenoviralen Infektionshemmung hin getestet. Es erfolgte eine Gruppenzuordnung anhand des Anteils der virusinfizierten Zellen verglichen mit 0,9-%-iger Kochsalzlösung.

Aus Bastian and Schäfer, 2001

Infectivity disease	< 20%	20–80%	> 80%
Sarcoidosis	10	1	1
Tuberculosis	3	0	0
Infection	6	3	0
Lung fibrosis	0	2	0
Malignoma	4	3	7
Asthma	0	0	3
PCP in HIV	0	0	2
Lymphocytic pneumonitis	2	0	0
Toxic pneumonitis	0	0	1
Alveolarproteinosis	1	0	0
Healthy	3	4	6

1.4. Fragestellung

Es ist bislang nur unzureichend verstanden, warum es bei einigen Atemwegs- und Lungenerkrankungen wie Asthma bronchiale oder COPD häufig zu Atemwegsinfektionen kommt, die dann akute Verschlechterungen dieser Erkrankungen auslösen, während dies bei anderen Atemwegs- und Lungenerkrankungen wie der Sarkoidose nicht der Fall ist.

Obwohl für das Asthma bronchiale und die COPD überzeugend gezeigt werden kann, dass eine Kausalität zwischen der Infektion respiratorischen Viren und einer akuten Exazerbation dieser Erkrankungen besteht, herrscht bisher noch weitgehend Unklarheit über die zugrundeliegenden Mechanismen.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, antivirale Faktoren in der bronchoalveolären Lavage in ihrer Wirkung auf unterschiedliche respiratorische DNA- und RNA-Viren zu charakterisieren und die folgenden Fragen zu beantworten:

- Ist die für die Sarkoidose bereits gezeigte Hemmung (Bastian and Schäfer, 2001) spezifisch für Adenovirus, oder auch bei anderen Atemwegsviren (Rhinoviren, RSV) zu beobachten?
- Findet sich in Anlehnung an die epidemiologischen Ähnlichkeiten bezüglich des Einflusses von Atemwegsviren auf eine Exazerbation zwischen Asthma bronchiale und COPD auch bei BAL-Überständen von COPD-Patienten eine verminderte antivirale Aktivität gegenüber Adenovirus, wie sie bereits beim Asthma bronchiale und in bisher unveröffentlichten Daten bei der COPD gezeigt werden konnte (Bastian and Schäfer, 2001)?
- Welchen Effekt übt die BAL von COPD-Patienten auf andere Atemwegsviren (Rhinoviren, RSV) aus?

Um diese Fragen zu beantworten, wurden in Anlehnung an die zitierten Vorarbeiten (Bastian and Bewig, 1999) Infektionsmodelle für eine in vitro Infektion mit Rhinovirus, RSV und Adenovirus entwickelt. Die Stärke der viralen Infektion konnte mittels quantitativer real-time PCR ermittelt werden. Es wurde BAL-Material von sechs an Sarkoidose und sechs an COPD erkrankten Patienten aufgereinigt und jeweils vereint. Die Spezifität möglicher antiviraler Faktoren wurde standardisiert und kontrolliert in drei Infektionsmodellen untersucht. Zu definierten Zeitpunkten wurde mittels quantitativer real-time PCR das Ausmaß der viralen Infektion in Abhängigkeit von der An- oder Abwesenheit von BAL von COPD und/oder Sarkoidose Patienten untersucht.

2. Patienten, Material und Methoden

2.1. Patienten

2.1.1. Patientenkollektiv und Probenmaterial

Der Einschluss von Patienten in die Untersuchung erfolgte zwischen August 2006 und August 2007. Es handelte sich dabei um Patienten der Medizinischen Klinik III, Pneumologie, Schlaf- und Beatmungsmedizin des Berufsgenossenschaftlichen Universitätsklinikums Bergmannsheil, Universitätsklinikum der Ruhr-Universität Bochum.

Es wurden Überstände der BAL von jeweils sechs an Sarkoidose bzw. COPD erkrankten Patienten gewonnen. Die zur Probengewinnung benötigte Bronchoskopie mit anschließender BAL erfolgte im Rahmen der Diagnostik während des stationären Aufenthaltes der Patienten. Es wurde keine Bronchoskopie oder BAL lediglich für Studienzwecke durchgeführt. Die Patienten wurden über die weitere Verwendung der BAL-Überstände aufgeklärt und gaben eine schriftliche Einverständniserklärung ab. Ebenso gab die Ethikkommission der Ruhr-Universität Bochum ihre Zustimmung zur Durchführung der Untersuchungen.

Die Diagnose wurde an Hand des klinischen Bildes, der Lungenfunktion, entsprechender Laborparameter bei der Sarkoidose sowie der radiologischen Befunde und der Befunde der BAL gestellt. Insgesamt wurden 29 Patienten gescreent. Es konnten 6 BAL-Proben für COPD und 6 für Sarkoidose gewonnen werden. Die Proben der übrigen 17 Patienten konnten nicht in die Studie eingeschlossen werden. Von den 17 Patienten verweigerten 3 Patienten ihre Einwilligung. Bei 2 Patienten lag gleichzeitig zur COPD eine Sarkoidose vor. Bei den übrigen gescreenten Patienten konnte während des stationären Aufenthaltes eine Sarkoidose bzw. COPD als Grundkrankheit ausgeschlossen werden.

2.1.2. Sarkoidose

Die Diagnose der Sarkoidose wurde an Hand des klinischen Bildes, der Lungenfunktion, der radiologischen Diagnostik (Röntgen-Thorax, Thorax CT), entsprechenden Laborparametern (ACE, sIL2-R, Ca^{2+}) sowie der Bronchoskopie mit anschließender BAL gestellt.

Obligate Einschlusskriterien der Sarkoidose-Gruppe:

- mindestens eines der klinischen Symptome trockener Husten, thorakales Engegefühl oder Dyspnoe bei Belastung
- positiver radiologischer Befund für das Vorliegen einer Sarkoidose. Hier wurde sowohl eine konventionelle Röntgen-Thorax-Aufnahme in Hinblick auf die internationale Einteilung der pulmonalen Sarkoidose (Stadien 0-IV) sowie, falls angefertigt, ein HRCT zur Beurteilung verwendet.

Fakultative Einschlusskriterien waren:

- erhöhte Laborparameter des Angiotensin Converting Enzyme (ACE), löslichen Interleukin 2 Rezeptors (sIL2-R), gesamt Immunglobulin G (IgG), Ca^{2+} sowie des C-reaktiven Proteins (CRP)
- Verschlechterung der statischen Compliance in der Lungenfunktion
- erhöhter CD4/CD8 Quotient ($>3,5$) in der Differenzialzytologie der BAL

Ausschlusskriterien der Verwendung der BAL-Überstände für die Sarkoidose-Gruppe:

- Einnahme von systemischen Steroiden innerhalb der letzten sechs Monate
- Vorliegen einer COPD
- Vorhandensein eines pneumonischen Infiltrats im Röntgen-Thorax
- fehlende Einwilligung des Patienten

Es konnten BAL-Überstände von sechs an Sarkoidose erkrankten Patienten einbezogen werden. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht der klinischen Charakteristika der an Sarkoidose erkrankten Patienten. Es fanden sich darunter drei Frauen und drei Männer im Alter zwischen 34 und 70 Jahren.

Zwei Patienten wiesen radiologisch eine Sarkoidose im Stadium I, drei Patienten im Stadium II und ein Patient im Stadium IV auf. Fünf Patienten hatten niemals geraucht. Ein Patient war ehemaliger Raucher mit einem Nikotinkonsum von 35 Pack Years, wobei die durchgeführte Lungenfunktion kein Vorliegen einer obstruktiven Lungenerkrankung im Sinne einer COPD ergab (Tiffeneau-Index 72%, FEV₁ 73% vom Soll). Bei fünf Patienten lag zum Zeitpunkt der Probennahme eine aktive Sarkoidose vor, bei einem Patient mit bekannter Sarkoidose ließ sich zum Zeitpunkt der Bronchoskopie kein Hinweis auf das Vorliegen eines derzeit aktiven Krankheitsschubes feststellen. Bei zwei Patienten ergab die Histologie der im Rahmen der Bronchoskopie durchgeführten Gewebeprobe das Vorliegen von nicht verkäsenden epitheloidzelligen Granulomen, welche gut vereinbar mit der Diagnose einer Sarkoidose waren.

2.1.3. COPD

Die Diagnose der COPD wurde auf der Basis der Lungenfunktion mit Hinblick auf die klinischen Symptome gestellt. Der Grad der Obstruktion wurde durch die GOLD-Klassifikation objektiviert.

Obligate Einschlusskriterien der COPD-Gruppe:

- Tiffeneau-Index kleiner als 70% entsprechend der GOLD-Klassifikation. Die Reversibilität der Obstruktion wurde mittels Bronchospasmolystetest geprüft. Die FEV₁ durfte dabei nach Inhalation eines β_2 -Sympathomimetikums (2 Hübe Salbutamol à 100µg) nicht mehr als 15% oder 200 ml zunehmen.
- Husten und Auswurf.

Fakultative Einschlusskriterien waren:

- Dyspnoe
- verlängertes Expirium
- trockene Rasselgeräusche

Ausschlusskriterien der Verwendung der BAL-Überstände für die COPD-Gruppe:

- Einnahme von systemischen Steroiden innerhalb der letzten sechs Monate
- Vorhandensein einer Sarkoidose
- Vorhandensein eines pneumonischen Infiltrats im Röntgen-Thorax
- fehlende Einwilligung des Patienten

Insgesamt wurden sechs an COPD erkrankte Patienten für die Untersuchungen rekrutiert (Tabelle 2). Vier Patienten waren männlich und zwei weiblich. Das Alter der Patienten lag zwischen 46 und 71 Jahren. Alle Patienten wiesen eine COPD im Stadium GOLD II auf, wobei keiner der Patienten an einer akuten Exazerbation seiner Erkrankung litt. Vier der Patienten waren aktive Raucher, zwei waren ehemalige Raucher, davon ein Patient seit 20 Jahren mit einem kumulativen Nikotinkonsum von 15 Pack Years und ein Patient seit drei Jahren mit einem kumulativen Konsum von 35 Pack Years. Ein Patient litt gleichzeitig an einem Pleuramesotheliom und ein Patient an einem Nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (NSCLC).

Tabelle 2: Charakterisierung der Patientengruppen Sarkoidose und COPD mit Darstellung der für die Diagnostik relevanten Untersuchungsergebnissen.

	Sarkoidose	COPD
Geschlecht [N♂(%), N♀(%)]	3 (50%), 3 (50%)	4 (67%), 2 (33%)
Alter [Median (Range)]	46,8 Jahre (34-70)	59,3 Jahre (46-71)
Röntgen-Thorax Sarkoidose Stadium		0
I	2	
II	3	
III	0	
IV	1	
GOLD-Stadium	0	
I		0
II		6
III		0
IV		0
Aktivität / Exazerbation		
aktiv	5	
inaktiv	1	
Exazerbation		0
Ohne Exazerbation		6
Rauchgewohnheit		
Raucher	0	4
Ex-Raucher	1	2
Nie-Raucher	5	0
Pack Years (PY) [Median (Range)]	35 PY (35)	27,3 PY (15-40)
sIL2-R		
normwertig	1	
erhöht	4	
nicht bestimmt	1	6
ACE		
erniedrigt	1 (ACE-Hemmer Medikation)	
normwertig	2	
erhöht	3	
nicht bestimmt	0	6
Ca²⁺		
normwertig	6	
erhöht	0	
nicht bestimmt	0	6
Steroideinnahme in den letzten 6 Monaten	ohne	ohne
begleitende Lungenerkrankung	ohne	1 NSCLC 1 Pleuramesotheliom

2.2. Material

2.2.1. Virusmaterial

Das Respiratorische Syncytium Virus (RSV) A, Stamm Long (ATCC VR-26) wurde ebenso wie das Humane Adenovirus B (AdV), Serotyp 3 freundlicherweise von Professor Überla, Abteilung für Molekulare und Medizinische Virologie der Ruhr-Universität Bochum, zur Verfügung gestellt und bei -70°C gelagert.

Das Rhinovirus (HRV 16) wurde von Prof. Johnston, Imperial College London zur Verfügung gestellt und bei -70°C gelagert.

2.2.2. Medien und Reagenzien

Medium für die Hep-2-Zellkultur

DMEM, low Glucose (1g/l) with 25 mM HEPES with L-Glutamine (PAA Laboratories, Pasching, Österreich)
+ 1 % Penicillin-/Streptomycin (PAA Laboratories, Pasching, Österreich)
+ 5 % FCS (ICN Biomedicals, Eschwege), 30 min. hitzeinaktiviert bei 56 °C

Medium für die HeLa- und A549-Zellkultur

DMEM, low Glucose (1g/l) with L-Glutamine (PAA Laboratories, Pasching, Österreich)
+ 1 % Penicillin-/Streptomycin (PAA Laboratories, Pasching, Österreich)
+ 10 % FCS (ICN Biomedicals, Eschwege), 30 min. hitzeinaktiviert bei 56 °C

Reagenzien

β-Mercaptoethanol: Sigma Aldrich, München

BSA: Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit, Pierce, Rockford, IL, USA

Coomassie-Brilliant-Blau G-250: Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit,
Pierce, Rockford, IL, USA

PBS: PAA Laboratories, Pasching, Österreich

2.2.3. Geräteliste und Verbrauchsmaterial

Zur Durchführung der einzelnen Arbeitsschritte wurden folgende Geräte verwendet:

Aufarbeitung der BAL-Überstände

Zentrifuge: Beckmann CS-6KR, Beckmann, München

Amicon® Konzentratoren: Amicon® Ultra-15 10k NMWL device, Millipore, Billerica, MA, USA

Proteinquantifizierung:

Photometer: Dynatech MR 5000, Dynex Technologies GmbH, Denkendorf

Software: MikroWin® (Version 3.29)

mRNA Isolation

Zentrifuge: Sigma 3K30, Sigma Zentrifugen, Osterode am Harz

cDNA Transkription

Thermo-Cycler: PTC-200, Biozym, Oldendorf

PCR-Tubes: 200 µl PCR-Softubes, Biozym, Oldendorf

quantitative real-time PCR

PCR-Cycler:

- Für RSV: GeneAmp 5500, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
- Für HRV und AdV: OneStep PCR, Applied Biosystems Foster City, CA, USA

2.3. Methoden

2.3.1. Aufreinigung der BAL-Überstände

Das im Rahmen der Bronchoalveolären Lavage gewonnene Material wurde direkt im Anschluss an die Bronchoskopie aufgearbeitet. Dazu wurde die BAL durch eine Lage Gaze hindurch in ein 50 ml Falcon-Tube überführt und 10 Minuten bei 500 g (Beckmann CS-6KR, Beckmann, München) zentrifugiert. Die Überstände wurden in ein neues 50 ml Falcon-Tube gegeben und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C eingefroren.

Die Aufreinigung der BAL-Überstände erfolgte mittels Amicon® Ultra-15 Zentrifugalfiltern (Millipore, Billerica, MA, USA) mit einem Ausschlussvolumen von 10.000 Da. Das Prinzip dieser Ultrafiltration beruht auf einem Filter, der weitgehend permeabel ist für Moleküle unter 10.000 Da. Größere Moleküle werden durch den Filter zurückgehalten. Die NaCl-Lösung der BAL kann den Filter während des Zentrifugierens ungehindert passieren, wodurch sich nach Zentrifugation BAL mit aufgrund der Rückhaltung großmolekularer Proteine stark konzentriertem Proteingehalt gewinnen lässt. Jede einzelne BAL wurde so auf ungefähr 1 bis 2 ml konzentriert (um den Faktor 50-100).

Die Amicon-Konzentratoren wurden bis zur oberen Markierung mit etwa 10ml der BAL-Überstände gefüllt und für circa 10 Minuten in der CS-6KR Zentrifuge (2.2.3.) zentrifugiert (Prog. 3 / 3345 RZB / 8°C / Rotor 7570 UPM), bis dass etwa 2 ml BAL-Überstand oberhalb des Filters verblieben. Es wurde nun erneut BAL-Überstand bis zur oberen Markierung der Konzentratoren hinzu gegeben und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis der gesamte BAL-Überstand der Patientenprobe auf ein Endvolumen von etwa 2 ml eingengt war.

Anschließend wurde der eingengte Überstand steril filtriert. Hierzu wurden Spritzenfilter mit einem Durchmesser von 13 mm und einer Filtergröße von 0,22 µm verwendet (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz). Die steril filtrierten BAL-Überstände wurden in 100 µl Aliquots bei -20°C eingefroren.

2.3.2. Vereinigung der aufgereinigten BALs

Die aufgereinigten BAL-Überstände wurden zu einer Sarkoidose- und einer COPD-Gruppe vereinigt, so dass die Versuche mit einheitlichem Probenmaterial der ab jetzt vereinigten BALs durchgeführt werden konnten.

2.3.3. Protein-Quantifizierung

Die Proteinmenge der aufgereinigten BALs wurde für beide Patientengruppen mit Hilfe der Bradford Methode auf einer 96-well Platte (Microtest™ Plate, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) bestimmt. Diese Methode ermöglicht eine Proteinquantifizierung auf der Basis einer photometrischen Bestimmung. Der in diesem Test verwandte Triphenylmethan-Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 (CBBG) verschiebt nach Bindung an Proteine sein Absorptionsmaximum von 456 nm nach 595 nm. Das nach Proteinbindung entstandene Konjugat wird bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch vermessen. Zur Quantifizierung der Proteinmenge ist es notwendig, eine Kalibrierung des Assays mit BSA-Lösung (Bovines Serumalbumin) (Pierce, Rockford, IL, USA) durch Erstellung einer Eichkurve vorzunehmen.

Es wurde von jeder BAL-Vereinigung eine Verdünnung von 1:10, 1:100 und 1:1000 angefertigt und deren Proteingehalt bestimmt. Zur Herstellung der 1:10 Verdünnung wurden 15 µl des Sarkoidose- bzw. COPD-BAL-Überstandes zu 135 µl NaCl gegeben und vermischt. Danach wurden 15 µl dieser Verdünnung zu 135 µl NaCl gegeben, um die 1:100 Verdünnung zu erhalten. Aus der 1:100 Verdünnung wurden wiederum 15 µl zu 135 µl NaCl für die 1:1000 Verdünnung gegeben.

Abbildung 1 zeigt die Belegung der 96-well Platte für die Proteinbestimmung. Die Spalten 1 und 2 beinhalten BSA-Lösung in absteigender Konzentration zur Bestimmung der Standardkurve. Es wurden zunächst 200 µl des Bradford-Reagenzes vorgelegt und anschließend 50 µl der jeweiligen BSA-Lösung in absteigender Proteinkonzentration hinzugefügt. Zur Bestimmung des

Proteingehalts der Sarkoidose- bzw. COPD-Verdünnungen wurde analog verfahren. Es wurden 200 µl des Bradford-Reagenzes vorgelegt und mit 50 µl der verschiedenen Sarkoidose- bzw. COPD-Verdünnungen vermengt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100	100	COPD 1:10	COPD 1:100	COPD 1:1000							
B	75	75	Sarkoidose 1:10	Sarkoidose 1:100	Sarkoidose 1:1000							
C	50	50										
D	25	25										
E	10	10										
F	5	5										
G	1	1										
H	0	0										

Ermittlung der Standardkurve in Doppelbestimmung

Abbildung 1: Belegung der 96-well Platte zur Durchführung des Bradford Proteinassays. Die Spalten 1 und 2 enthalten BSA-Lösung in absteigender Proteinkonzentration zur Ermittlung der Standardkurve.

Die so angelegte 96-well Platte wurde für 20 Minuten unter Lichtausschluss auf einen Schüttler gestellt und anschließend in einem Photometer (Dynatech MR 5000, Dynex Technologies GmbH, Denkendorf) gemessen. Die automatische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe eines speziellen Softwareprogramms MikroWin® (Version 3.29).

2.3.4. Zellkulturen

Die in vitro Infektionen wurden mit unterschiedlichen Zellkulturen für die verschiedenen Viren (RSV, HRV und Adenovirus) durchgeführt.

Das HRV benötigt zur Adhäsion an die Zielzelle ICAM-1, einen zellulären Rezeptor, welcher auf A549-Zellen, humanen Lungenkarzinomzellen, exprimiert wird (Papi et al., 2000).

Für das Adenovirus wurden HeLa-Zellen verwendet. Dabei handelt es sich um humane Zervixkarzinomzellen, welche in zahlreichen Untersuchungen bereits eine erfolgreiche Replikation des Adenovirus zeigen konnten.

Die Infektionsversuche mit RSV wurden in Hep-2-Zellen, einer humanen Larynxkarzinom-Zelllinie, durchgeführt. Diese hat sich als sehr empfänglich gegenüber einer Infektion mit RSV herausgestellt (Bromberg et al., 1984).

Die Zellkulturen wurden dreimal wöchentlich gesplittet und mit frischem Medium versehen.

2.3.4.1. Infektion von Hep-2-Zellen mit RSV in vitro

Hep-2-Zellen wurden mit DMEM + HEPES mit 5% FCS als Nährmedium in Kultur genommen. Durch Zugabe von 1% Penicillin/Streptomycin wurde das Risiko der bakteriellen Kontaminationen minimiert. Es wurden 75 cm² Kulturflaschen ohne Filter (Biochrom AG, Berlin) verwendet, da Hep-2-Zellen ohne CO₂-Zugabe optimales Wachstum zeigen. Die Verwendung filterloser Zellkulturflaschen ermöglichte die Inkubation der Hep-2-Zellen zusammen mit anderen Zellkulturen im Brutschrank bei 37°C mit 5% CO₂. Die für die Experimente benötigten Zellen wurden beim Splitten entnommen. Mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer wurde die in Kultur befindliche Zellzahl bestimmt und eine Zellsuspension mit der für die Versuche benötigten Anzahl an Zellen angesetzt. 200 µl der Suspension wurden in die entsprechend der jeweiligen Versuchsanordnung benötigten wells einer 96-well Platte (Microtest™ Plate, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) gegeben.

Zur Etablierung eines in vitro Infektionsmodells wurden die Infektionen zunächst ohne Zusatz der BAL-Überstände durchgeführt. Um die für die Versuche

optimalen Kultur- und Infektionsbedingungen zu ermitteln, wurden verschiedene Zellzahlen mit unterschiedlichen multiplicities of infection (m.o.i.) miteinander kombiniert und im Verlauf über 24 Stunden beobachtet.

Für die RSV Infektionsexperimente wurden Hep-2-Zellen in der 96-well Platte zunächst 24 Stunden bei 37°C und 0% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Medium der wells abgenommen und mit 200 µl PBS gewaschen. Nach Entfernen von PBS wurde erneut 195 µl Medium (DMEM + HEPES) zugefügt; zunächst jedoch ohne Zusatz von FCS, da FCS eine hemmende Wirkung auf die Infektion der Zellen mit Viren ausüben kann.

Bei den BAL-Hemmversuchen wurden vor Zugabe des Virus 20 µg BAL-Protein je well, entweder der Sarkoidose- oder der COPD-Vereinigung, hinzugefügt. Eine Negativ-BAL-Kontrolle erfolgte ohne Zugabe von Virus. Die Belegung der 96-well Platte für die Infektionsversuche ist in Abbildung 2 dargestellt. Es ergaben sich sechs Versuchsgruppen (Tabelle 3), die zu den Zeitpunkten 0, 12, 24 und 48 Stunden abgenommen wurden.

Tabelle 3: In der linken Spalte sind die für die Hemmversuche notwendigen Versuchsgruppen aufgelistet. In der rechten Spalte wird der jeweilige Verwendungszweck der Versuchsgruppe genannt.

Versuchsgruppe	Verwendungszweck
HRV	Viruskontrolle ohne BAL
HRV+COPD	HRV Hemmversuch mit COPD-BAL
COPD	BAL-Kontrolle ohne Virus
HRV+Sarkoidose	HRV Hemmversuch mit Sarkoidose-BAL
Sarkoidose	BAL-Kontrolle ohne Virus
A549	Negativkontrolle mit A549-Zellen

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	HRV 0h			HRV +COPD 0h		COPD 0h		HRV +Sarko 0h		Sarko. 0h		A549 0h
B	HRV 12h			HRV +COPD 12h		COPD 12h		HRV +Sarko 12h		Sarko. 12h		A549 12h
C	HRV 24h			HRV +COPD 24h		COPD 24h		HRV +Sarko 24h		Sarko. 24h		A549 24h
D	HRV 48h			HRV +COPD 48h		COPD 48h		HRV +Sarko 48h		Sarko. 48h		A549 48h
E	HRV 0h			HRV +COPD 0h		COPD 0h		HRV +Sarko 0h		Sarko. 0h		A549 0h
F	HRV 12h			HRV +COPD 12h		COPD 12h		HRV +Sarko 12h		Sarko. 12h		A549 12h
G	HRV 24h			HRV +COPD 24h		COPD 24h		HRV +Sarko 24h		Sarko. 24h		A549 24h
H	HRV 48h			HRV +COPD 48h		COPD 48h		HRV +Sarko 48h		Sarko. 48h		A549 48h
	Virus- Kontrolle			COPD- Virus- Hemm- versuch		BAL- Kontrolle		Sarkoidose- Virus- Hemm- versuch		BAL- Kontrolle		Negativ- Kontrolle

Abbildung 2: Belegung der 96-well Platte für die BAL-Hemmversuche am Beispiel des HRV. Für RSV und AdV ergibt sich ein äquivalenter Aufbau, jedoch wird bei AdV die Infektion zu den Zeitpunkten 0h, 24h und 48h gestoppt.

Die Zugabe von RSV erfolgte entsprechend der gewünschten m.o.i. Für die Versuche wurde aufgereinigtes RSV mit einem Titer von $1 \cdot 10^7/\mu\text{l}$ verwendet.

Mit den Kontrollen wurde ebenso wie mit den infizierten wells verfahren, jedoch wurde anstelle des Virus die entsprechende Menge PBS zugefügt.

Nach zwei Stunden Inkubation bei 37°C und $0\% \text{ CO}_2$ wurden $5\% \text{ FCS}$ pro well, entsprechend $10 \mu\text{l}$, hinzugegeben und die Platte weiter inkubiert.

Die Infektionen wurden zu den Zeitpunkten 0h, 12h, 24h und 48h gestoppt. Es wurden zunächst die Zellüberstände abgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit $350 \mu\text{l}$ RLT des RNeasy Kits (Qiagen, Hilden) + β -Mercapto-Ethanol

mit 1ml RLT auf 10 µl β-Mercapto-Ethanol lysiert und bei -70°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren.

2.3.4.2. Infektion von A549-Zellen mit HRV in vitro

Die Infektion der A549-Zellen mit HRV erfolgte analog den Versuchen mit Hep-2-Zellen und RSV; allerdings wurden die Zellen mit DMEM ohne HEPES und 10% FCS bei 37°C unter Zufuhr von 5% CO₂ inkubiert. Es wurden 75 cm² Zellkulturflaschen mit Filter (Biochrom AG, Berlin) verwendet, um den benötigten CO₂ Bedarf der Zellen zu gewährleisten. Analog dem Hep-2-Medium wurde auch diesem Medium 1% Penicillin/Streptomycin beigelegt.

Das für die HRV-Infektionsexperimente verwendete Virus „HRV 16“ wies einen Titer von 3*10⁷/µl auf.

2.3.4.3. Infektion von HeLa-Zellen mit AdV in vitro

Für die Infektionsversuche mit Adenovirus wurden HeLa-Zellen verwendet. Diese benötigen das gleiche Medium welches bereits bei den A549-Zellen zur Anwendung kam. Die Inkubation erfolgte bei 37°C unter Zufuhr von 5% CO₂ und 75 cm² Zellkulturflaschen mit Filter (Biochrom AG, Berlin).

Das für die Versuche verwendete Humane Adenovirus B (AdV), Serotyp 3 wies einen Titer von 5*10⁶/µl auf.

Die Infektionen wurden bei den Adenovirusversuchen in Anerkennung an den längeren Replikationszyklus des Virus zu den Zeitpunkten 0, 24 und 48 Stunden abgenommen (Ginsberg and Prince, 1994).

2.3.5. Isolation der mRNA aus den Zellüberständen

Die Isolation der mRNA aus den Zellüberständen wurde mit dem RNeasy Kit (Qiagen, Hilden) entsprechend den Protokollen des Herstellers durchgeführt. Es

wurde die Zentrifuge Sigma 3K30 (Sigma Zentrifugen, Osterode am Harz) verwendet. Das RNeasy Verfahren kombiniert die selektiven Bindungseigenschaften einer Silicagel-Membran mit der Mikro-zentrifugationstechnik. Die Anwendung der im Kit enthaltenen Puffersysteme führt zur Inaktivierung der in der Probe vorhandenen RNasen. Durch verschiedene Puffer- und Waschschrte kommt es zur Anlagerung von RNA-Molekülen mit einer Länge mehr als 200 Nukleotiden an die Silicagel-Membran. Diese können schließlich nach Inkubation der Säulchen mit RNAfreiem Wasser eluiert und weiter verarbeitet werden. Es kommt zur Anreicherung der mRNA im Eluat, da die meisten RNA-Moleküle mit einer kürzeren Nukleotidlänge (z.B. tRNA und 5S-rRNA) durch das Verfahren beseitigt werden.

Die bei -70°C tiefgefrorenen Zellüberstände wurden aufgetaut und für 60 Sekunden auf einen Reagenzschüttler gestellt. Nach Zugabe von 350 µl 70%igem Ethanol wurden die Überstände auf die vom Hersteller dafür vorgesehenen Säulchen gegeben und für 18 Sekunden bei 11.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Säulchen zweimal mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen und jeweils erneut für 18 Sekunden bei 11.000 rpm zentrifugiert. Es wurden 500µl RPE-Puffer hinzu gegeben und wiederum für 18 Sekunden bei 11.000 rpm zentrifugiert. Danach wurden die Säulchen in neue, dafür vorgesehene 2 ml Tubes eingesetzt und 500 µl RPE-Puffer zugegeben. Es wurde nun für zwei Minuten bei 16.000 g zentrifugiert. Danach wurden die Säulchen in neue 1,5 ml Tubes gestellt und mit 30 µl RNase freiem Wasser für drei Minuten inkubiert. Es folgte eine letzte Zentrifugation für zwei Minuten bei 10.000 rpm.

Das Eluat wurde bei -70°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren.

2.3.6. Synthese der cDNA

Zur quantitativen Bestimmung der viralen Infektion wurde das Prinzip der real-time PCR verwendet. Dazu war es jedoch erforderlich die gewonnene mRNA

zunächst in DNA zu überschreiben, da diese als Substrat für die PCR benötigt wird.

Für die Synthese der cDNA wurde das QuantiTect® Reverse Transkription-Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Dieses Kit beinhaltet die Durchführung zweier Reaktionsschritte. Ein erster Schritt bewirkt die Eliminierung genomischer DNA, wohingegen der zweite Schritt aus der Reversen Transkription, der Umschreibung der RNA in cDNA, besteht. Die Elimination genomischer DNA erfolgt durch zweiminütige Inkubation der mRNA Probe mit dem gDNA Wipeout Puffer des Kits bei 42°C. Dieser Schritt verhindert eine Detektion genomischer DNA zusätzlich zur RNA durch unspezifische Primer und Sonden in der nachfolgenden PCR.

Die Durchführung der Reversen Transkription erfolgte gemäß den Protokollen des Herstellers. Zur Verwendung kamen der Thermo-Cycler PTC-200 (Biozym, Oldendorf) sowie 200 µl PCR-Tubes (Biozym, Oldendorf).

Die bei -70°C tiefgefrorenen mRNA-Isolationen wurden zunächst aufgetaut; die weitere Verarbeitung der Proben erfolgte im Eisbad.

Die im Folgenden angegebenen Volumina beziehen sich jeweils auf eine Reaktionsprobe. Für den benötigten gDNA Wipeout Prämix wurden 2,0 µl gDNA Wipeout Buffer (7x) mit 3,0 µl PCR-H₂O vermengt. Pro PCR-Tube wurden 5 µl des gDNA Wipeout Prämix vorgelegt und 9 µl der entsprechenden RNA-Lösung hinzugegeben. Der cDNA Ansatz wurde im PCR-Cycler für zwei Minuten auf 42°C erwärmt und danach sofort wieder auf Eis gestellt.

Der nun benötigte ReverseTranscriptase-Prämix setzte sich aus 4,0 µl Quantiscript® RT-Puffer (5x), 1,0 µl RT Primer Mix sowie 1,0 µl Quantiscript® Reverse Transcriptase zusammen. 6 µl des ReverseTranscriptase-Prämixes wurden zu den 14 µl des Wipeout cDNA Ansatzes hinzugegeben. In einem ersten Reaktionsschritt wurde der Heizblock des Thermo-Cyclers für 30 Minuten bei 42°C gehalten und anschließend für 3 Minuten auf 95°C erhitzt.

Die transkribierte cDNA mit einem Gesamtvolumen von 20 µl wurde bei -20°C bis zur Durchführung der PCR eingefroren.

2.3.7. Quantitative real-time PCR

2.3.7.1. Prinzip der quantitativen real-time PCR

Die Stärke der viralen Infektionen wurde mit Hilfe der quantitativen TaqMan® real-time PCR (Applied Biosystems Foster City, CA, USA) bestimmt. Bei dieser PCR Methode werden gesuchte Zielsequenzen während der exponentiellen Amplifikationsphase der PCR Reaktion detektiert und exakt quantifiziert.

Das Prinzip beruht auf der Verwendung einer sequenzspezifischen Sonde, deren Zielsequenz zwischen beiden für die PCR verwandten Primern liegt. An ihrem 5'-Ende weist die Sonde einen Donorfarbstoff, den so genannten Reporter, auf, welcher durch eine Lichtquelle angeregt wird und dadurch ein Fluoreszenzsignal aussendet. Am 3'-Ende befindet sich ein Akzeptor, der so genannte Quencher, welcher bei intakten Sonden das Fluoreszenzsignal des Reporters unterdrückt. Während der Amplifikation erreicht die Taq-Polymerase der PCR die zwischen beiden Primern befindliche Sonde. Durch ihre 5'-3'-Exonukleaseaktivität kommt es zur Hydrolyse der Sonde und somit zur Freisetzung von Quencher und Reporter, deren räumlicher Abstand dadurch vergrößert wird. Somit wird das vom Reporter ausgehende Fluoreszenzsignal nicht länger vom Quencher absorbiert, sondern vom PCR-Gerät mittels einer Kamera detektiert. Die Menge an freigesetzter Reporterfluoreszenz korreliert mit der Menge der amplifizierten DNA, da während jedes Amplifikationsschrittes genau eine Sonde pro synthetisiertem DNA-Strang hydrolysiert wird. Das Ergebnis der PCR wird als so genannter Ct-Wert angegeben. Dieser Wert stellt die Angabe des PCR-Zyklus dar, in dem erstmals ein signifikanter Fluoreszenzanstieg von der im PCR-Gerät integrierten Detektionskamera aufgezeichnet werden konnte. Die real-time PCR lief über 40 PCR-Zyklen, das bedeutet, dass ein Ct-Wert von 3 einen signifikanten Fluoreszenzanstieg bereits nach dem dritten Amplifikationszyklus messen konnte, wohingegen bei einem

Wert von 35 erst nach 35 Amplifikationszyklen eine signifikante Fluoreszenzsteigerung ermittelt wurde. Ein Ct-Wert von 40 bedeutet, dass selbst nach 40 Zyklen kein Fluoreszenzanstieg zu verzeichnen war und somit das gesuchte Genom nicht in der Probe vorhanden war. Die Ermittlung des Ct-Wertes erfolgt im linearen Anstiegsbereich der logarithmischen Kurven durch die Festlegung eines Schwellenwertes, welcher für die alle nachfolgenden PCR Läufe des gleichen Versuchs übernommen wurde (Abbildung 3).

Abbildung 3: Amplifikationskurven der quantitativen real-time PCR. Die Ergebnisse eines PCR-Ansatzes sind für RSV über 40 PCR-Zyklen abgebildet. Der Ct-Wert der jeweiligen Probe wird am Kreuzungspunkt der Kurve mit dem Threshold (markierte horizontale Linie) bestimmt.

Die quantitative real-time PCR für die RSV-Infektionsexperimente wurde mit dem GeneAmp 5500 (Applied Biosystems Foster City, CA, USA) durchgeführt. Aufgrund eines Geräteausfalls wurde für die HRV- und AdV-Infektionsexperimente das OneStep PCR-Gerät (Applied Biosystems Foster City, CA, USA) verwendet.

2.3.7.2. Primer und Sonden

Forward und Reverse Primer und die Sonden wurden mit der Primer Express Software (Primer ExpressTM Version 1.0; Applied Biosystems Foster City, CA, USA) entwickelt. Die Sequenzen der Primer und Sonden sind in Tabelle 4 dargestellt. Die Primer und Sonden für das Referenz-Gen β -Glucuronidase (GUS) (2.3.8.) wurden einem kommerziell erhältlichen Primer-und-Sonden-Ansatz (Applied Biosystems Foster City, CA, USA) entnommen.

Tabelle 4: Die Tabelle zeigt die Primer und Sonden, die für den molekulabiologischen Nachweis der Adenovirus-, RSV- und Rhinovirusinfektion verwendet wurden;

Virus	Primer-, Sonden-Region und -Sequenz (5' - 3' Richtung)
Adenovirus B (AdV)	L-Genbereich (Hexonprotein) H1B: CCTTCTCCAGCAACTTCATG H2B: AGGGTGGGCTCATCCAT Sonde: CCTTACCGACCTGGGACAGAACATGCTCTAT
RSV subgroup A	F-Gen (Fusionsglykoprotein) F1: TTGGATCTGCAATCGCCA F2: CTTTGTGATCTTGTTCACTTCTCCTTCT Sonde: TGGCACTGCTGTATCTAAGGTCCTGCACT
Rhinovirus (HRV)	5' non-translated region NTR1: GGTGTGAAGAGCCGCGTG NTR2: CCAAAGTAGTTGGTCCCATCCC Sonde: TCCTCCGGCCCCTGAATGTGG

2.3.7.3. Durchführung der PCR

Als Ausgangsmaterial für die real-time PCR wurden die bei -20°C eingefrorenen cDNA-Ansätze zunächst aufgetaut und mit 50 μ l PCR-H₂O verdünnt.

Die zur PCR benötigten Prämixe setzten sich aus dem QuantiTectMaster Mix® (Qiagen, Hilden), den jeweiligen Forward- und Reverse-Primern sowie den entsprechenden Sonden zusammen. Eine genaue Zusammensetzung der

Prämixe ist in Tabelle 5 für jeweils einen PCR Reaktionsansatz zusammengestellt.

Tabelle 5: Die Tabelle listet die Zusammensetzung der PCR Prämixe für das Referenzgen, RSV, Rhino- und Adenovirus für jeweils einen Reaktionsansatz auf.

	1 Reaktionsansatz à 20 µl	
GUS-Prämix		
2x QuantiTectMaster Mix®		12,50 µl
20x GUS (Sonde/Primer)		1,25 µl
Aqua dest		6,25 µl
RSV-Long(F)-Prämix		
2x QuantiTectMaster Mix®		12,50 µl
RSV(F)-FOR	500 nM $\triangle$	1,00 µl
RSV(F)-REV	495 nM $\triangle$	0,90 µl
RSV(F) Sonde	250 nM $\triangle$	1,00 µl
Aqua dest		4,60 µl
HRV-Prämix		
2x QuantiTectMaster Mix®		12,50 µl
HRV-FOR	500 nM $\triangle$	1,00 µl
HRV-REV	500 nM $\triangle$	1,00 µl
HRV Sonde	280 nM $\triangle$	0,89 µl
Aqua dest		4,61 µl
Adenovirus-Prämix		
2x QuantiTectMaster Mix®		12,50 µl
Adeno-FOR	500 nM $\triangle$	0,75 µl
Adeno-REV	500 nM $\triangle$	0,75 µl
Adeno-Sonde	250 nM $\triangle$	1,00 µl
Aqua dest		5,00 µl

In jedes well der PCR-Platte wurden zunächst 20 µl des Prämixes der jeweils zu bestimmenden DNA, entsprechend GUS, RSV, HRV oder AdV, vorgelegt und 5 µl der zu untersuchenden Probe hinzu gegeben. Als Negativkontrolle (NTC) wurde anstelle einer Probe 5 µl PCR-H₂O zu den 20 µl des Prämix hinzu gegeben. Das Ergebnis jeder Probe wurde durch einen zweiten PCR-Lauf zur Doppelbestimmung des Messwertes wiederholt. In der anschließenden

Auswertung wurde ein Mittelwert aus beiden Ergebnissen gebildet und zur weiteren Berechnung herangezogen.

Die zu untersuchende Probe wurde aufgeteilt und das Referenzgen sowie das Zielgen in getrennten Wells bestimmt.

2.3.8. Relative Quantifizierung mittels delta-delta-Ct-Methode

Die quantitative real-time PCR bietet die Möglichkeit der Berechnung des relativen Expressionsunterschiedes einer behandelten Probe zur Kontrolle. Die Berechnung erfolgte unter Anwendung der so genannten „delta-delta-Ct-Methode“ (Livak and Schmittgen, 2001). Dabei wird neben der eigentlichen Zielsequenz, dem viralen Genom, ein Referenzgen oder auch „House-Keeping Gen“ bestimmt, welches konstitutiv in der Zellkultur exprimiert wird und somit keiner weiteren Regulierung unterliegt. Als Referenzgen wurde die β -Glucuronidase (GUS) verwendet, deren Bestimmung durch die Verwendung eines kommerziellen Primer- und Sonden-PCR Kits (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) ermöglicht wurde. Durch die konstitutive Expression des Referenzgens sind seine Ct-Werte sowohl in der Behandlungs- als auch in der Kontrollgruppe identisch und heben sich in den weiteren Berechnungsschritten auf. Dadurch ist es möglich, eine Aussage über den relativen Expressionsunterschied einer behandelten Probe zur Kontrolle vorzunehmen. Der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Wert gibt schließlich das Vielfache der Genexpression der behandelten Probe verglichen mit der entsprechenden Kontrolle an. Die Berechnungen wurden nach folgenden Formeln mit Microsoft Excel berechnet:

$$\begin{aligned}\Delta Ct &= Ct \text{ Zielgen} - Ct \text{ Referenzgen} \\ \Delta\Delta Ct &= \Delta Ct \text{ Behandlung} - \Delta Ct \text{ Kontrolle} \\ \text{Ratio} &= 2^{-\Delta\Delta Ct}\end{aligned}$$

2.3.9. statistische Auswertung

Normalverteilte Daten werden als Mittelwerte und Standardabweichung präsentiert, nicht-normalverteilte Daten als Median und Bereich. Die statistische Auswertung zwischen den Gruppen erfolgte mittels einer univariaten Varianzanalyse (ANOVA). Im Falle signifikanter Unterschiede wurden post-hoc Tests (Newman-Keuls Multiple Comparison Tests) durchgeführt. Diskrete Variablen wurden als Frequenzen angegeben und mittels Chi-Quadrat Test mit Yates Korrektur analysiert. Bivariate Korrelationen von normalverteilten Variablen wurden mittels Pearson's test, bei nicht-normalverteilten Variablen mittels Spearman's test untersucht und die entsprechende zwei-seitige Signifikanz angegeben. Das Signifikanzniveau wurde auf 5% gesetzt. Alle Analysen erfolgten mittels GraphPad Prism 4.0 und SPSS 11.5.1..

3. Ergebnisse

3.1. Proteinquantifizierung der vereinigten BALs

Nachdem die konzentrierten BAL-Überstände zu den Gruppen Sarkoidose und COPD (2.3.2.) vereinigt wurden, erfolgte die Quantifizierung des Proteingehaltes der jeweiligen Verdünnungen mit Hilfe der Bradford Methode (2.3.3.).

Abbildung 4 zeigt die per Photometer (Dynatech MR 5000, Dynex Technologies GmbH, Denkendorf) erhaltene Standardkurve für die Proteinbestimmung. Die per Software ermittelten Proteingehalte für die jeweiligen Sarkoidose- bzw. COPD-Verdünnungen sind in Tabelle 6 aufgelistet. Es zeigte sich, dass die vereinigte Sarkoidose-BAL mit 2424,06 µg/ml einen 2,6 fach höheren Proteingehalt gegenüber der COPD-BAL mit 923,572 µg/ml aufwies.

Abbildung 4: Die Abbildung zeigt die mittels BSA-Lösung erstellte Eichkurve, an Hand derer die Proteinbestimmung der BALs der Sarkoidose- und COPD-Vereinigung erfolgte.

Zur Untersuchung der antiviralen Aktivität der Sarkoidose- bzw. COPD-BAL wurde vor Infektion mit dem Virus BAL mit jeweils 20 µg Protein dem Versuchsansatz zugegeben. Für die Sarkoidose-BAL bedeutet dies eine

Zugabe von 8,25 µl, während von der COPD-BAL dem Versuchsansatz 21,66 µl zugeführt wurden. Um gleiche Volumina in den Versuchsansätzen zu erhalten wurde der Sarkoidose-BAL jeweils 13,41 µl PBS hinzugefügt, entsprechend einem Gesamtvolumen von 21,66 µl.

Tabelle 6: Die Bradford Bestimmung ergab einen Proteingehalt von 923,572 µg/ml für die vereinigten COPD- und 2424,06 µg/ml für die Sarkoidose-BAL-Überstände.

BAL-Vereinigung	
Sarkoidose	2424,06 µg/ml
COPD	923,572 µg/ml

3.2. Einfluss der BAL auf eine Infektion mit RSV in vitro

3.2.1. Etablierung eines Infektionsmodells für RSV in vitro

Um die für die Versuche optimalen Kultur- und Infektionsbedingungen zu ermitteln, wurden zunächst verschiedene Zellzahlen mit unterschiedlichen m.o.i.s miteinander kombiniert und im Verlauf über 24 Stunden beobachtet.

Es wurden 35.000 und 50.000 Hep-2-Zellen pro well einer 96-well Platte (Microtest™ Plate, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) ausgesät. Für beide Zellzahlen wurden die m.o.i.s 0,02, 0,2 und 0,4 gewählt. Ziel dabei war es, eine möglichst niedrige, aber in der quantitativen real-time PCR verlässlich zu detektierende Infektion zu erreichen, um eventuelle Effekte der BAL-Überstände auf die virale Infektion deutlicher hervorheben zu können.

Die Ergebnisse der quantitativen real-time PCR für die Infektionsansätze mit 35.000 und 50.000 Hep-2-Zellen sind in den Abbildungen 5 und 6 abgebildet. Es zeigten sich über den zeitlichen Verlauf in allen mit Virus infizierten Ansätzen abnehmende Ct-Werte für RSV, wodurch eine aktive Virusreplikation bewiesen werden konnte. In allen uninfizierten wells ergaben sich Ct-Werte von 40, was bedeutet, dass nach 40 Amplifikationszyklen kein virales Genom mittels PCR nachweisbar war.

Die Ct-Werte des RSV lagen bei dem Versuchsansatz mit 35.000 Hep-2-Zellen über den gesamten zeitlichen Verlauf bei der m.o.i. von 0,02 erwartungsgemäß deutlich oberhalb von den Ct-Werten der m.o.i. 0,2 und 0,4. Das bedeutet, dass im Versuchsansatz mit einer m.o.i. von 0,02 deutlich weniger virales Genom nachgewiesen werden konnte als bei den anderen beiden Ansätzen. Bei 24 Stunden ließ sich ein Ct-Wert für m.o.i. 0,02 von 26,60 und 21,40 für m.o.i. 0,2 und somit eine Differenz von 5,2 Ct-Werten zwischen beiden Ansätzen ermitteln. Eine Differenz von einem Ct-Wert bedeutet das Vorhandensein der doppelten Menge an viralem Genom, da eine signifikante Fluoreszenz erst nach einem weiteren Amplifikationsschritt der vorhandenen DNA der PCR ermittelt werden konnte. Bei einer Differenz von etwa 5 Ct-Werten lag somit eine 32 fach niedrigere Menge an viralem Genom bei 24 Stunden bei einer m.o.i. von 0,02 gegenüber 0,2 vor.

Für 50.000 Hep-2-Zellen ergab die real-time PCR annähernd vergleichbare Ct-Werte für die jeweiligen Versuchsgruppen. Da sich mikroskopisch jedoch bereits nach 24 Stunden eine Überschichtung der Zellen zeigte, wurden die weiteren Versuche mit einer Zellzahl von 35.000 Hep-2-Zellen durchgeführt. Hierbei ergab sich unter dem Mikroskop eine Konfluenz der Zellen von etwa 80%, was als optimal für die Versuche angesehen wurde. Zum einen begünstigte die niedrigere Zellzahl über den Versuchszeitraum einen längeren Verbleib der Zellen in einer Monolayer-Schicht, zum anderen wurde dadurch auf Grund des geringeren Mediumverbrauchs eine längere Laufzeit des Versuchs über 48 Stunden hinweg ermöglicht.

Abbildung 5: Etablierung einer Infektion von Hep-2-Zellen mit RSV in vitro. Eine virale Replikation war bei 35.000 Hep-2-Zellen und untersuchten m.o.i.s über einen Versuchsablauf von 24 Stunden hinweg nachweisbar.

RSV-Replikation in Hep-2-Zellen (50.000 Zellen pro well)

Abbildung 6: Die virale Infektion ließ sich bei 50.000 Hep-2-Zellen pro well und m.o.i.s von 0,02, 0,2 und 0,4 zu jedem Zeitpunkt des Versuchs über 24 Stunden nachweisen.

Da die Infektion bei der m.o.i. von 0,02 und 35.000 Hep-2-Zellen über den gesamten Zeitraum verlässlich zu detektieren war, wurde zur Reproduktion der Ergebnisse ein erneuter Infektionsversuch mit 35.000 Zellen angesetzt. In diesem Ansatz lag der Versuchszeitraum jedoch wie die späteren BAL-Hemmversuche bei 48 Stunden. Es wurde neben der m.o.i. von 0,02 noch eine m.o.i. von 0,008 gewählt, um eine noch schwächere Infektion zu simulieren, so dass etwaige BAL-Effekte auf die Infektion deutlicher zu verzeichnen sein müssten. Abbildung 7 zeigt das Ergebnis der real-time PCR für beide m.o.i.s.

Abbildung 7: Etablierung einer Infektion von Hep-2-Zellen mit RSV in vitro. Eine m.o.i von 0,008 zeigte gegenüber einer m.o.i. von 0,02 in der real-time PCR eine nachweisbar geringere Infektion.

Es zeigte sich ein reproduzierbarer Verlauf der Infektion im Hinblick auf die vorangegangenen Versuche. Virales Genom konnte in allen infizierten Wells nachgewiesen werden. Die Kurven der Ct-Werte für die m.o.i.s 0,02 und 0,008 zeigten über den gesamten Versuch hin einen parallelen Verlauf (Abbildung 7), wobei die Ct-Werte bei einer m.o.i. von 0,008 durchweg höher waren und somit eine schwächere, aber dennoch zuverlässig zu detektierende Infektion aufzeigten. Bis zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Infektionsbeginn ließ sich für beide Infektionen eine stetige Abnahme der Ct-Werte feststellen, die auf eine aktive virale Replikation zurückzuführen war. Es zeigte sich ein leichter Anstieg der Ct-Werte zum Zeitpunkt 48 Stunden, welcher durch eine Abnahme der Menge an gemessenem viralem Genom bedingt ist.

In Anbetracht dieser Ergebnisse wurden die weiteren Versuche mit 35.000 Hep-2-Zellen pro Well und einer m.o.i. von 0,008 durchgeführt.

3.2.2. Einfluss der BAL auf eine Infektion mit RSV in vitro

Nach Etablierung eines Infektionsmodells von Hep-2-Zellen mit RSV in vitro (3.3.1.) konnte der Einfluss der vereinigten Sarkoidose- und COPD-BALs auf die virale Infektion entsprechend der Versuchsbeschreibung (2.3.3.1.) untersucht werden.

Der Kurvenverlauf der Ct-Werte für das konstitutiv exprimierte Referenzgen β -Glucuronidase ist in Abbildung 8 für einen der sechs Infektionsversuche exemplarisch dargestellt. Es war für alle Versuchsgruppen, unabhängig von der Behandlung mit Virus, BAL oder beidem, ein konstanter Verlauf der Ct-Werte von Beginn der Infektion bis 24 Stunden nach Infektionsbeginn feststellbar. In allen Versuchsgruppen fanden sich zum Zeitpunkt 48 Stunden zunehmende Ct-Werte, entsprechend einer vermindert gemessenen Menge der GUS-DNA (Abbildung 8). Die abnehmenden Ct-Werte nach 48 Stunden zeigten die Limitierung des Modells auf eine begrenzte zeitliche Betrachtung auf. Es kam zu diesem Zeitpunkt zu einer Überwucherung der Zellen und Verbrauch des

Mediums, was zu Beeinträchtigungen des zellulären Stoffwechsels, erkennbar an zunehmenden Ct-Werten für GUS und RSV (Abbildungen 8 und 9) führte.

Abbildung 8: Die Abbildung zeigt den Kurvenverlauf der mittels real-time PCR ermittelten Ct-Werte für das Referenzgen β -Glucuronidase (GUS) der jeweiligen Versuchsgruppen exemplarisch für einen Versuchsdurchlauf.

Der zeitliche Verlauf der mittels PCR gemessenen Ct-Werte für das RSV-Genom ist exemplarisch für einen der sechs Versuche in Abbildung 10 dargestellt. Die dazugehörigen Ct-Werte sind in Tabelle 7 aufgelistet.

In den uninfizierten Kontrollen ließ sich kein RSV in der real-time PCR nachweisen, entsprechend ergaben sich für die Gruppen Uninfiziert, Sarkoidose und COPD Ct-Werte von 40 über den gesamten Versuchsablauf hinweg (Tabelle 7).

Die Infektion der Hep-2-Zellen mit RSV ohne Zugabe von BAL zu der Zellkultur wies einen nach Etablierung des Modells bereits erwarteten Infektionsverlauf auf (3.3.1.). Zu jedem Zeitpunkt ließ sich in der RSV-Kontrolle virales Genom nachweisen, wobei ein Maximum an viraler DNA zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Infektionsbeginn ermittelt werden konnte. Es fand sich ebenfalls wie bereits während der Etablierung des Modells eine erneute Zunahme des Ct-Wertes auf 31,81, entsprechend einer Abnahme an viralem Genom, zum Zeitpunkt 48 Stunden hin (Abbildung 9, Tabelle 7).

Die Zugabe sowohl von Sarkoidose- als auch von COPD-BAL zum Medium vor Infektion mit RSV bewirkte eine Abweichung des Ct-Kurvenverlaufes von dem der unbehandelten viralen Infektion (Abbildung 9):

Für die Sarkoidose-BAL ließ sich zu Beginn der Infektion ($t = 0\text{h}$) mit einem Ct-Wert von 39,58 nur eine sehr geringe Menge an viralem Genom ermitteln. Zwölf Stunden nach Beginn der Infektion war sogar so wenig RSV in den Probenansätzen vorhanden, dass selbst nach 40 Amplifikationszyklen der PCR kein virales Genom nachgewiesen werden konnte (Tabelle 7). Die Zeitpunkte 24 und 48 Stunden hingegen zeigten mit Ct-Werten von 38,13 und 37,68 eine stattgefundenen virale Replikation mit Zunahme an Virusmenge im Reaktionsgefäß an. Es zeigte sich im Vergleich zur alleinigen RSV-Infektion eine Differenz von 7,7 Ct-Werten zum Zeitpunkt 24 Stunden und 5,8 zum Zeitpunkt 48 Stunden (Tabelle 7), wobei die alleinige RSV-Infektion stets geringere Ct-Werte und somit mehr virales Genom als die BAL-Gruppe aufwies.

Die Auswertung aller sechs Sarkoidose-BAL-Versuche für RSV ergab zum Zeitpunkt 24 Stunden mit $p < 0,001$ eine signifikante Hemmung der Sarkoidose-BAL auf die in-vitro Infektion (Abbildung 10). Zu den übrigen Zeitpunkten wurde die RSV-Infektion durch die Sarkoidose-BAL ebenfalls gehemmt, jedoch zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Ausmaß der Hemmung.

Die Zugabe von COPD-BAL zum Medium vor Beginn der Infektion mit RSV offenbarte einen der Sarkoidose-BAL ähnlichen Kurvenverlauf. Für die COPD-BAL war zu Beginn der Infektion kein virales Genom in der PCR nachweisbar (Tabelle 7). Erst nach zwölf Stunden gelang der Nachweis von RSV, allerdings verglichen mit dem ohne BAL behandelten Versuchsansatz in einem deutlich geringeren Ausmaß. Die Differenz von 3,3 Ct-Werten zwischen beiden Ansätzen ließ auf eine um das achtfache niedrigere virale Menge im mit COPD-BAL behandelten Versuchsansatz schließen. Zum Zeitpunkt 24 und 48 Stunden zeigte sich ein Verlauf mit fortan abnehmenden Ct-Werten, entsprechend dem Verlauf der Sarkoidose-BAL.

Auch für die COPD-BAL ergab sich nach Auswertung aller sechs Infektionsversuche mit $p < 0,001$ eine signifikante Hemmung auf eine in vitro-Infektion mit RSV (Abbildung 10) bei 24 Stunden.

Zusammenfassend zeigten somit nach Auswertung aller sechs Infektionsversuche sowohl die Sarkoidose- als auch die COPD-BAL eine signifikante Hemmung der Infektion mit RSV in vitro 24 Stunden nach Infektionsbeginn verglichen mit Kontrollen. Es konnte dabei kein signifikanter Unterschied im Ausmaß der Hemmung der beiden BAL-Gruppen ermittelt werden.

Abbildung 9: BAL-Überstände von COPD- und Sarkoidose-Patienten übten einen hemmenden Effekt auf die Infektion von Hep-2-Zellen mit RSV in vitro aus.

Tabelle 7: Die Tabelle listet die in der quantitativen real-time PCR gemessenen Ct-Werte der einzelnen Versuchsgruppen zu dem in Abbildung 9 gezeigten Versuch auf.

	Ct mittel	Ct mittel	Ct mittel	Ct mittel	Ct mittel	Ct mittel
H	uninf.,	RSV	RSV+COPD	COPD	RSV+Sarkoidose	Sarkoidose
0	40,00	38,15	40,00	40,00	39,58	40,00
12	40,00	36,44	39,70	40,00	40,00	40,00
24	40,00	30,43	37,36	40,00	38,13	40,00
48	40,00	31,81	35,34	40,00	37,68	40,00

Abbildung 10: 24 Stunden nach Infektionsbeginn zeigte sich mit $p < 0,001$ ein signifikanter Unterschied im Ausmaß der Hemmung sowohl der Sarkoidose- als auch der COPD-BAL auf eine Infektion mit RSV in vitro verglichen mit Kontrollen.

3.3. Einfluss der BAL auf eine Infektion mit HRV in vitro

3.3.1. Etablierung eines Infektionsmodells für HRV in vitro

Im Rahmen der Etablierung eines Infektionsmodells für Rhinovirus in A549-Zellen erfolgte zunächst analog zum RSV-Modell eine mikroskopische Betrachtung des Wachstumsverhaltens der Zellkultur in der 96-well Platte. Dabei zeigte sich nach 24 Stunden eine annähernd 80%ige Konfluenz der A549-Zellen bei der Aussaat von 25.000 Zellen. Die Verwendung von 30.000 A549-Zellen führte bereits zu einer etwa 90%igen Konfluenz, so dass die weiteren Versuche mit 25.000 A549-Zellen pro well der 96-well Platte durchgeführt wurden.

Es wurde zunächst ein Infektionsversuch ohne Zugabe von BAL-Überständen durchgeführt, um eine den Versuchsanforderungen optimale m.o.i. zu bestimmen (3.3.1.). Dazu wurden 25.000 A549-Zellen mit m.o.i.s von 0,01, 0,05 und 0,2 über 48 Stunden in Kultur genommen.

Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Abbildung 11 dargestellt. Im Gegensatz zur uninfizierten Negativkontrolle, in der zu keinem Zeitpunkt HRV nachweisbar

war, konnte in allen infizierten wells das Virus bestimmt werden. Es zeigte sich ein paralleler Kurvenverlauf der Ct-Werte für die untersuchten m.o.i.s, wobei bei der m.o.i. von 0,2 zu den jeweiligen Zeitpunkten stets niedrigere Ct-Werte, entsprechend einer größeren Menge an viralem Genom, gegenüber den m.o.i.s von 0,05 und 0,01 gemessen wurde.

Die höchsten Ct-Werte zu allen untersuchten Zeitpunkten und somit die schwächste virale Infektion wurde bei der m.o.i. von 0,01 festgestellt. Diese m.o.i. wurde für die weiteren Infektionsversuche mit HRV bei 25.000 A549-Zellen verwendet. Die ermittelten Ct-Werte und somit die Stärke der viralen Infektion entsprachen unter diesen Bedingungen in etwa denen, die für das RSV etabliert werden konnten, wodurch in gewissem Maße zudem eine quantitative Vergleichbarkeit der Effekte der Sarkoidose- bzw. COPD-BAL auf die virale Infektion vorgenommen werden konnte.

Abbildung 11: Etablierung einer Infektion von A549-Zellen mit HRV in vitro. Eine m.o.i. von 0,01 ergab eine in der PCR nachweislich geringere Infektion als höhere m.o.i.s von 0,05 und 0,2.

3.3.2. Einfluss der BAL auf eine Infektion mit HRV in vitro

Nachdem es gelungen war, ein Infektionsmodell für Rhinovirus in der A549-Zellkultur zu etablieren, konnte der Einfluss gepoolter Sarkoidose- bzw. COPD-BAL auf die Infektion in vitro untersucht werden. Es wurden dazu 20 µg BAL-

Protein der Sarkoidose- bzw. COPD-Vereinigung vor der Infektion mit dem Virus dem Versuchsansatz zugefügt.

Abbildung 12 und 13 zeigen exemplarisch das Ergebnis eines der sechs BAL-HRV-Infektionsexperimente. Der Effekt einer Behandlung der Zellkultur mit den beiden BAL-Gruppen ist nach Auswertung aller sechs Infektionsexperimente in Abbildung 14 dargestellt.

Die Ergebnisse der real-time PCR für das Referenzgen GUS sind in Abbildung 12 dargestellt. Über den gesamten Versuch hinweg konnten konstante Ct-Werte für GUS in allen untersuchten Gruppen, unabhängig von einer etwaigen Behandlung mit Virus oder BAL oder beidem, ermittelt werden.

Abbildung 12: Die Abbildung zeigt den Kurvenverlauf der mittels real-time PCR ermittelten Ct-Werte für das Referenzgen β -Glucuronidase (GUS) der jeweiligen Versuchsgruppen exemplarisch für einen Versuchsdurchlauf.

Die Ergebnisse der real-time PCR für das virale Genom dieses Versuchs sind in Abbildung 13 aufgezeigt.

In allen uninfizierten Kontrollgruppen (uninfiziert ohne BAL, nur Sarkoidose-BAL, nur COPD-BAL) konnte nach 40 PCR-Zyklen kein virales Genom nachgewiesen werden. Entsprechend ergaben sich für alle uninfizierten Gruppen zu allen Zeitpunkten in allen sechs HRV-Versuchen Ct-Werte für das HRV von 40.

In den mit HRV infizierten Versuchsansätzen konnte zu jedem Zeitpunkt des Versuchs virales Genom in der PCR detektiert werden.

Die Viruskontrollgruppe zeigte einen Verlauf der Ct-Werte, der in etwa den während der Etablierung des Modells gewonnenen Ergebnissen entsprach (Abbildung 11). Der Verlauf der Ct-Werte für HRV in der Viruskontrollgruppe zeigte von Beginn der Infektion bis zum 24 Stunden Messpunkt abnehmende Werte und verblieb bis zum 48 Stunden Messpunkt mit einem Wert von 30,25 auf etwa konstantem Niveau. Somit konnte eine aktive Virusreplikation mit stetiger Zunahme des viralen Genoms bis zum 24 Stunden Messpunkt aufgezeigt werden.

Die mit BAL behandelten Versuchsansätze wiesen ein hiervon abweichendes Bild auf. Es zeigten sich sowohl für die Sarkoidose- als auch für die COPD-BAL über den gesamten Versuchsablauf hinweg höhere Ct-Werte in der PCR, entsprechend weniger viralem Genom, im Vergleich zur HRV-Infektion ohne Behandlung mit BAL:

Für die Sarkoidose ergab sich im in Abbildung 13 abgebildeten Versuch ebenfalls eine Verringerung der Ct-Werte bis zwölf Stunden hin, jedoch waren die einzelnen Werte stets höher als bei der alleinigen RSV Infektion. Die Messpunkte 24 und 48 Stunden wiesen höhere Ct-Werte, entsprechend einer geringeren Menge an viralem Genom, auf. Zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Infektionsbeginn zeigte sich im vorliegenden Versuch eine Differenz der Ct-Werte von 5,88 zwischen der unbehandelten HRV-Infektion und der Zugabe von Sarkoidose-BAL. Somit konnte zum 24 Stunden Zeitpunkt etwa 32 fach mehr Virus in der unbehandelten Probe verglichen zur Sarkoidose-BAL Behandlung nachgewiesen werden.

Der Einfluss der COPD-BAL auf die Infektion mit HRV in vitro offenbarte ein ähnliches Ergebnis. Auch hier konnte eine Hemmung der viralen Infektion zu allen Messpunkten verzeichnet werden. Der Verlauf der Kurve der Ct-Werte lag bis zwölf Stunden nach Infektionsbeginn auf gleichem Niveau mit den Ergebnissen der Sarkoidose-BAL (Abbildung 13). Zu den Messpunkten 24 und

48 Stunden zeigte sich verglichen mit der Sarkoidose-Gruppe kein erneuter Rückgang der Ct-Werte, sondern ein Stagnieren bei einem Wert von 34,43. Zum 24 Stunden Zeitpunkt ergab sich für die COPD-Gruppe ein um 4,1 Punkte höherer Ct-Wert verglichen mit der Viruskontrolle; entsprechend konnte zu diesem Zeitpunkt in etwa 16fach weniger HRV Genom in der COPD- Gruppe nachgewiesen werden.

Abbildung 13: BAL-Überstände von COPD- und Sarkoidose-Patienten übten einen hemmenden Effekt auf die Infektion von A549-Zellen mit HRV in vitro aus.

Die Auswertung aller sechs Versuche ist in Abbildung 14 aufgezeigt. Sowohl die Sarkoidose- als auch die COPD-BAL vermochten eine Infektion von A549-Zellen mit HRV in vitro zu hemmen. Diese Hemmung konnte zu jedem untersuchten Zeitpunkt nachgewiesen werden, jedoch zeigte sich nur bei 24 Stunden mit $p < 0,05$ ein signifikanter Unterschied im Ausmaß der Hemmung sowohl der Sarkoidose- als auch der COPD-BAL auf die Infektion mit HRV. Es ließ sich dabei kein signifikanter Unterschied im Ausmaß der Hemmung zwischen beiden BAL-Gruppen nachweisen.

Abbildung 14: 24 Stunden nach Infektionsbeginn zeigte sich mit $p < 0,05$ ein signifikanter Unterschied im Ausmaß der Hemmung sowohl der Sarkoidose- als auch der COPD-BAL auf eine Infektion mit HRV in vitro verglichen mit Kontrollen.

3.4. Einfluss der BAL auf eine Infektion mit AdV in vitro

3.4.1. Etablierung eines Infektionsmodells für AdV in vitro

Um zu untersuchen, ob sich die Ergebnisse der zitierten Vorarbeiten (siehe 1.3.) hinsichtlich des Einflusses der BAL auf eine Adenovirusinfektion in vitro auch in dieser Arbeit bestätigen lassen, musste zunächst ebenfalls ein entsprechendes Infektionsmodell etabliert werden.

Es wurden 25.000 HeLa-Zellen pro well einer 96-well Platte nach 24 stündiger Inkubation unter dem Mikroskop betrachtet. Dabei zeigte sich eine annähernd 80%ige Konfluenz der Zellen. Die weiteren Versuche wurden daraufhin mit dieser Zellzahl pro well der 96-well Platte durchgeführt.

Zur Etablierung der viralen Infektion wurde ein Versuchsansatz mit m.o.i.s von 0,01 und 0,05 über 48 Stunden angesetzt. Dabei wurde die Infektion auf Grund des längeren Replikationszyklus des Virus zu den Zeitpunkten 0, 24 und 48 Stunden gestoppt (siehe 2.3.4.3.).

Die Ergebnisse dieses Versuchsansatzes sind in Abbildung 15 dargestellt. Es ließ sich in allen infizierten wells adenovirales Genom nachweisen. Die Abnahme der Ct-Werte in beiden Ansätzen über 48 Stunden hinweg ließ auf eine aktive Replikation des Virus schließen.

Für die weiteren Versuche wurde die niedrigere m.o.i. von 0,01 gewählt. Hierbei war das Virus auch zu Beginn des Versuches bei einem Ct-Wert von 39,01 noch gerade eben nachweisbar.

Abbildung 15: Etablierung einer Infektion von HeLa-Zellen mit AdV in vitro. Die schwächere Infektion mit einer m.o.i von 0,01 ließ sich über den gesamten Versuchsverlauf in der real-time PCR nachweisen.

3.4.2. Einfluss der BAL auf eine Infektion mit AdV in vitro

Der BAL-Hemmversuch für das Adenovirus wurde im Gegensatz zu den RSV- und HRV-Versuchen auf Grund der begrenzten Menge an BAL-Material nur viermal wiederholt. Die Ergebnisse der real-time PCR eines der vier Versuche sind in Abbildung 16 und 17 dargestellt. Der Einfluss einer Behandlung der Zellkultur mit den beiden BAL-Gruppen ist nach Auswertung aller vier Infektionsexperimente in Abbildung 18 dargestellt.

Die Ct-Werte des Referenzgens GUS für die untersuchten Gruppen im Versuchsverlauf sind in Abbildung 16 abgebildet. Es zeigte sich zwischen 0 und 24 Stunden eine annähernd gleich bleibende Expression der β -Glucuronidase in allen sechs Versuchsgruppen. Darüber hinaus ließen sich keine

Unterschiede im Ausmaß der Expression weder bei den Behandlungs- als auch bei den Kontrollgruppen feststellen. Der bei 24 Stunden gemessene Ct-Wert lag zwischen 24,4 und 25,2. Bei 48 Stunden konnte ein höherer Ct-Wert ermittelt werden, was eine verminderte Expression des Referenzgens bedeutete. Diese Veränderung wurde in allen Gruppen in gleicher Weise verzeichnet und in dieser Form auch schon im Hep-2-Zellmodell (siehe 3.2.2.) beobachtet.

Abbildung 16: Die Abbildung zeigt den Verlauf der mittels real-time PCR ermittelten Ct-Werte für das Referenzgen GUS der jeweiligen Versuchsgruppen exemplarisch für einen Versuchsdurchlauf.

Die Ergebnisse der viralen Expression des exemplarisch dargestellten Adenovirus-BAL-Hemmversuchs sind in Abbildung 17 aufgezeichnet. Das virale Genom war in allen infizierten wells über den gesamten Versuchsablauf hinweg in der real-time PCR nachweisbar. In den uninfizierten Kontrollen ließ sich hingegen kein Virus feststellen. Die virale Infektion ohne BAL-Behandlung zeigte eine durchgehende Abnahme der Ct-Werte über den Versuchsablauf hinweg. Während zu Versuchsbeginn ein Ct-Wert von 38,15 gemessen wurde betrug dieser Wert 36,34 bei 24 Stunden und 32,61 bei 48 Stunden. Die Abnahme dieses Wertes über den Versuch hinweg bedeutet das Vorliegen einer aktiven Replikation des Virus mit einer zunehmend nachweisbaren Menge an viraler DNA.

Bei einer Behandlung der Zellkultur mit BAL-Material vor Zugabe des Virus wurden sowohl für die Sarkoidose- als auch für die COPD-Gruppe annähernd

gleiche Ergebnisse festgestellt. Es war kein signifikanter Unterschied im Ausmaß der Hemmung zwischen beiden Versuchsgruppen feststellbar ($p > 0,05$). Die Ct-Werte für das adenovirale Genom in beiden BAL-Gruppen lagen über den gesamten Versuchsablauf hinweg auf gleich bleibendem Niveau bei einem Mittelwert von 38,38.

Im vorliegenden Versuch zeigte sich zu Beginn kein signifikanter Unterschied zwischen der adenoviralen Infektion ohne Behandlung (Ct 38,15) und einer Behandlung mit BAL-Überständen (Ct 38,24 Sarkoidose; Ct 38,65 COPD). 24 Stunden nach Infektionsbeginn zeigte sich bereits eine verminderte Expression des viralen Genoms in den mit BAL-Überständen behandelten Gruppen verglichen mit der alleinigen viralen Infektion. Allerdings war das Ausmaß der Hemmung zu diesem Zeitpunkt nach Auswertung aller vier Versuche verglichen mit Kontrollen nicht signifikant (Abbildung 18).

Nach 48 Stunden ließen sich in der real-time PCR Ct-Werte der mit BAL behandelten Gruppen von 38,63 für die Sarkoidose und 38,15 für die COPD ermitteln. Gegenüber der alleinigen Infektion ohne BAL-Behandlung konnte in beiden BAL-Gruppen somit deutlich weniger adenovirales Genom nachgewiesen werden, was auf eine verminderte Replikation des Virus in diesen Versuchsansätzen zurückzuführen ist.

Abbildung 17: BAL-Überstände von COPD- und Sarkoidose-Patienten übten einen hemmenden Effekt auf die Infektion von HeLa-Zellen mit AdV in vitro aus.

Das Ausmaß der Hemmung nach Auswertung aller vier BAL-Hemmversuche wird in Abbildung 18 gezeigt. 24 Stunden nach BAL-Zugabe war kein signifikanter Unterschied der adenoviralen Genexpression verglichen mit Kontrollen nachweisbar, weder durch die Sarkoidose- noch durch die COPD-BAL ($p>0,05$). Nach 48 Stunden konnte jedoch durch Behandlung der Zellkultur mit BAL-Überständen eine Hemmung der Adenovirusinfektion verzeichnet werden. Das Ausmaß der adenoviralen Genexpression zwischen Behandlung mit BAL und Kontrollen unterschied sich mit $p<0,001$ sowohl für die Sarkoidose- als auch für die COPD-BAL signifikant. Ein signifikanter Unterschied im Ausmaß der Hemmung zwischen der Sarkoidose- und COPD-BAL wurde nicht festgestellt.

Abbildung 18: 48 Stunden nach Infektionsbeginn zeigte sich mit $p<0,001$ eine signifikante Hemmung sowohl der Sarkoidose- als auch der COPD-BAL auf eine Infektion mit AdV in vitro verglichen mit Kontrollen.

3.5. Zusammenfassung der Ergebnisse

In den durchgeführten Versuchen gelang es, durch Zugabe konzentrierter BAL-Überstände eine signifikante Hemmung der viralen Replikation für alle drei untersuchten Atemwegsviren (Adenovirus, RSV und HRV) in vitro verglichen mit Kontrollen zu zeigen. Diese Beobachtung konnte sowohl für die Sarkoidose- als auch für die COPD-BAL in gleicher Weise festgestellt werden, wobei sich in keinem Versuchsansatz ein signifikanter Unterschied im Ausmaß der Hemmung zwischen beiden BAL-Vereinigungen ergab.

Es ergaben sich allerdings Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Hemmung. Die Infektionen mit RSV und HRV konnten durch die Behandlung mit BAL-Material nur zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Infektionsbeginn signifikant gehemmt werden. Zwar ließ sich zu den übrigen Zeitpunkten ebenfalls eine Verminderung der viralen Replikation durch die BAL-Überstände ermitteln, allerdings ließen sich hierbei keine signifikanten Unterschiede feststellen.

Im Gegensatz dazu wurde eine signifikante Hemmung der viralen Replikation des Adenovirus durch eine Behandlung mit den BAL-Überständen erst 48 Stunden nach Infektionsbeginn ermittelt. Es zeigte sich auch hier wie bei den anderen Viren zu den übrigen Zeitpunkten eine verminderte virale Replikation. Beim Adenovirus wurden hierbei jedoch ebenfalls keine signifikanten Unterschiede im Ausmaß der Genexpression zwischen Behandlung und Kontrolle gesehen.

4. Diskussion

4.1. Unterschiede im Proteingehalt der Sarkoidose- und COPD-BAL

In der vorliegenden Arbeit wurde die vereinigte BAL von jeweils sechs Sarkoidose- und COPD-Patienten im Hinblick auf ihre antivirale Aktivität gegenüber relevanten Atemwegsviren (RSV, Rhinovirus und Adenovirus) untersucht. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, war es erforderlich, gleiche Mengen an BAL-Ausgangsmaterial zu verwenden. Daher erfolgte zunächst eine Quantifizierung des in der vereinigten BAL vorhandenen Proteingehalts. Die Sarkoidose-BAL wies mit 2424,06 µg/ml einen 2,6 fach höheren Proteingehalt gegenüber der COPD-BAL mit 923,572 µg/ml auf (siehe 3.1.). Bereits in früheren Studien wurde ein signifikant erhöhter Proteingehalt in der BAL von Sarkoidose-Patienten verglichen zu gesunden Kontrollen beschrieben (Sabounchi-Schütt, 2003). Es wurde dabei der Proteingehalt der BAL in einer 2-D-Gelelektrophorese untersucht. Zwar war die Anzahl der Protein-Spots bei Sarkoidose-Patienten nicht signifikant erhöht, jedoch wurden einige Proteine vermehrt exprimiert, was sich in einer veränderten Fluoreszenz in der Gelelektrophorese widerspiegelte. Insgesamt konnte bei 21 Proteinspots der Sarkoidose-Patienten eine signifikant veränderte Fluoreszenz festgestellt werden. In sieben Fällen kam es zu einer Verstärkung und in 14 Fällen zu einer Verminderung der Intensität und somit einer geringeren Expression. Unter den vermindert exprimierten Proteinen waren unter anderem antioxidative Proteine, welche eine Rolle in der Abwehr gegenüber Mikroorganismen und inhalativen Noxen spielen. Die klinische Bedeutung dieser Erkenntnisse ist jedoch noch unklar. Möglicherweise ist diese Verschiebung Ausdruck des bei der Sarkoidose vorliegenden akuten Entzündungsgeschehens mit einem Ungleichgewicht von oxidativen und antioxidativen Prozessen. Ebenso könnte ein erhöhter Proteingehalt bei der Sarkoidose durch ein im Rahmen des akuten Entzündungsgeschehens vorhandenes kapilläres Leck resultieren.

Für die COPD konnte in vielen Studien eine Schädigung des respiratorischen Epithels gezeigt werden (siehe 4.2.1.). Bislang gibt es jedoch keine

Untersuchungen, die den Proteingehalt bzw. die Proteinzusammensetzung der BAL von COPD-Patienten näher charakterisiert. Für asymptomatische Raucher konnte kürzlich in den BAL-Zellen eine verminderte mRNA-Synthese von Chemokinen und Cytokinen verglichen mit Nichtrauchern gezeigt werden (Meuronen et al., 2008). Gleichzeitig war die Anzahl der Makrophagen und Gesamtzellen erhöht. So ist zu vermuten, dass der im Vergleich zur Sarkoidose-BAL verminderte Proteingehalt auf den chronischen Entzündungsprozess zurückzuführen ist.

4.2. Einfluss der BAL auf eine Infektion mit Atemwegsviren in vitro

4.2.1. Einordnung der Ergebnisse in den aktuellen Stand der Forschung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Zugabe von BAL-Überständen die Replikation verschiedener relevanter Atemwegsviren (RSV, HRV und Adenovirus) in vitro signifikant gehemmt werden kann. Diese Hemmung war sowohl bei der Sarkoidose- als auch bei der COPD-BAL vorhanden, wobei sich kein signifikanter Unterschied im Ausmaß der Hemmung zwischen beiden BAL-Vereinigungen ergab ($p > 0,05$). Somit scheinen unabhängig von der Grunderkrankung Faktoren in den BAL-Überständen vorzuliegen, die dem Organismus durch ihre antivirale Aktivität als erste effektive Barriere gegenüber einem weiteren Eindringen von Atemwegsviren in das respiratorische Epithel dienen.

Andere Arbeiten (Bastian and Bewig, 1999; Bastian and Schäfer, 2001) konnten einen hemmenden Effekt der BAL-Überstände bisher für eine Adenovirusinfektion von 293-Zellen zeigen. In diesen Studien wurde das Ausmaß der Hemmung der adenoviralen Infektion durch BAL-Überstände von Patienten unterschiedlicher pulmonaler Grunderkrankungen untersucht (siehe 1.3.). Dabei zeigten sich jedoch im Unterschied zur vorliegenden Arbeit Unterschiede im Ausmaß der Hemmung, abhängig davon, welche Erkrankung zu Grunde lag. So zeigte sich bei einigen Erkrankungen wie der Sarkoidose oder der Tuberkulose (Bastian and Bewig, 1999; Bastian and Schäfer, 2001)

eine stark hemmende Aktivität der BAL-Überstände gegenüber der Adenovirusinfektion, während BALs von Asthmatikern und Patienten mit einer *Pneumocystis carinii* Pneumonie die Infektion hingegen in deutlich geringerem Ausmaß abschwächen (Bastian and Schäfer, 2001) konnten. Bisher unveröffentlichte Daten aus derselben Arbeitsgruppe konnten einen ähnlichen Effekt für die BAL-Überstände von COPD-Patienten feststellen: Acht von acht untersuchten COPD-BALs waren nicht in der Lage, eine adenovirale Infektion von 293-Zellen in signifikantem Ausmaß zu hemmen. Es wurde vermutet, dass es im Rahmen der Pathogenese dieser Erkrankungen zu einer Verminderung der antiviralen Aktivität kommen könnte. So könnten die Faktoren, die eine antivirale Aktivität bedingen, möglicherweise vermindert gebildet oder aber auf eine bisher unbekannte Weise durch die Grunderkrankung inaktiviert worden sein.

Zur Einordnung der Ergebnisse bedarf es zunächst einer Betrachtung des in den verschiedenen Untersuchungen verwendeten Patientenkollektivs und Studiendesigns:

Um die Einflüsse der Epithelial Lining Fluid auf eine virale Infektion hin zu untersuchen, besteht ein erster wichtiger Ansatzpunkt in der Betrachtung einer eventuellen Vorbehandlung bzw. begleitenden Therapie der Patienten. In dieser Arbeit galt eine Behandlung mit systemischen Steroiden innerhalb der letzten sechs Monate vor Durchführung der BAL als Ausschlusskriterium (siehe 2.1.). Das Patientengut wurde in beiden zitierten Studien (Bastian and Bewig, 1999; Bastian and Schäfer, 2001) nicht näher charakterisiert, so dass keine Rückschlüsse über eine Behandlung mit systemischen oder inhalativen Steroiden gezogen werden konnten.

Kortikosteroide nehmen eine bedeutsame Rolle in der Therapie von inflammatorischen Prozessen im Respirationstrakt ein. Sie können unter anderem eine Vielzahl von Entzündungsprozessen begrenzen und Mechanismen des angeborenen Immunsystems verstärken (Schleimer, 2004). Hierunter fallen beispielsweise eine vermehrte Synthese der Komplementfaktoren oder der Surfactant-Proteine A und D (Schleimer, 2004),

welchen eine antimikrobielle Aktivität zugeschrieben wird (s.u.). Eine systemische Langzeitapplikation bei der COPD muss jedoch kritisch abgewogen werden, da dem Nutzen der Therapie ihre Nebenwirkungen (u.a. Osteoporose, Glucoseintoleranz) gegenüberstehen. Gegen eine solche Therapie spricht auch, dass ein signifikanter positiver Langzeiteffekt systemischer Steroide bei der stabilen COPD bisher noch nicht gezeigt werden konnte (Walters et al., 2005).

Inhalative Steroide sind in der Lage die bronchiale Hyperreagibilität sowie die Frequenz von Exazerbationen und eine progrediente Verschlechterung des Gesundheitsstatus des Patienten zu verringern (Lung Health Study Research Group, 2000).

Die COPD-Patienten in dieser Studie befanden sich alle im Stadium II nach GOLD, so dass eine inhalative Therapie mit langwirksamen Beta-2-Mimetika erfolgte. Inhalative Glukokortikoide werden im Rahmen der aktuellen Leitlinientherapie (Nationale Versorgungsleitlinie COPD, 2006) erst im Stadium GOLD III eingesetzt, so dass die vorliegenden Ergebnisse nicht auf dem Einfluss einer Steroidtherapie beruhen konnten.

Ein zweiter Ansatz zur Interpretation der Ergebnisse ist sicherlich das Stadium der jeweiligen Erkrankung, in dem das Probenmaterial gewonnen wurde. Die COPD-Patienten in der vorliegenden Arbeit befanden sich zum Zeitpunkt der Probenentnahme alle im Stadium GOLD II. Keiner der Patienten litt an einer akuten Exazerbation seiner Erkrankung. In beiden zitierten Arbeiten wurde hierüber keine Angabe gemacht. So ist es möglich, dass sich die untersuchten Patienten in einem weiter fortgeschrittenen Krankheitsstadium (GOLD III oder IV) befanden oder aber zum Zeitpunkt der Probenentnahme eine akute Exazerbation vorlag. Wie bereits eingangs erwähnt, ist im Rahmen einer akuten COPD-Exazerbation in etwa 56% der Fälle (Rohde et al., 2003) eine virale Beteiligung nachweisbar. Sollte eine COPD-BAL während einer akuten Exazerbation, welche durch eine virale Infektion ausgelöst wurde, gewonnen worden sein, so kam es in diesem Fall bereits zur Überwindung der immunologischen Abwehr durch das Virus. Von daher wäre es nicht verwunderlich, wenn eine BAL-Probe von COPD-Patienten, die während einer akuten Exazerbation gewonnen wurde, eine verminderte antivirale Aktivität

aufweist. Auf der anderen Seite muss jedoch in Betracht gezogen werden, dass im Rahmen einer akuten Exazerbation vermehrt Entzündungszellen gefunden werden, was eher für eine verstärkte antivirale Immunantwort sprechen würde.

In diesem Zusammenhang rückt auch die Rauchgewohnheit der Patienten in den näheren Fokus. Im Rahmen der Pathogenese der COPD ist der Nikotinkonsum als einer der wesentlichen Mechanismen bekannt (Spurzem and Rennard, 2005). Die Bestandteile des inhalativen Zigarettenrauchs können einerseits die Integrität und Funktion des respiratorischen Epithels beeinträchtigen sowie darüber hinaus auch die Kapazität der immunologischen Abwehr vermindern. Es sind vor allem bislang epidemiologische Untersuchungen, die die Kausalität zwischen einer gesteigerten Empfänglichkeit des Respirationstraktes gegenüber viralen und bakteriellen Infektionen sowie dem Zigarettenrauch erhärten (Gürkan et al., 2000; Bradley et al., 2005).

Ein Beispiel für die Beeinträchtigung der Epithel- und Abwehrfunktion sind die Surfactant-Proteine A und D. Es handelt sich dabei Glykoproteine, welche der Klasse der Collectine angehören. Ihre Synthese findet in den Typ II-Alveolarzellen statt (Crouch et al., 2000). Ihnen wird eine Rolle bei der Modulation der Leukozytenfunktion und Begünstigung der Abtötung von Mikroorganismen zugeschrieben (Lawson and Reid, 2000,). Es konnte bereits gezeigt werden, dass durch Surfactant-Protein A eine Immunabwehr gegenüber RSV (LeVine et al., 1999) und Surfactant-Protein D gegenüber Influenza A (LeVine et al., 2001) und RSV (LeVine et al., 2004) in vivo begünstigt wird.

Bei langjährigen Rauchern kommt es zu einer verminderten Konzentration von Surfactant-Protein D in der Epithelial Lining Fluid des unteren Respirationstraktes (Betsuyaku et al., 2004). Bei älteren Patienten und bei langjährigen Rauchern, die gleichzeitig an einem Lungenemphysem leiden, ist zudem die Surfactant-Protein A Synthese vermindert (Betsuyaku et al., 2004). Das Ausmaß der klinischen Relevanz im Hinblick auf eine verminderte antivirale Aktivität hierdurch ist bisher jedoch noch nicht hinlänglich untersucht worden.

Bei der Sarkoidose hingegen konnte in der BAL kein signifikanter Unterschied in der Konzentration von Surfactant-Protein D verglichen mit anderen Erkrankungen festgestellt werden (Kucejko et al., 2009).

Um eventuelle Beeinträchtigungen der antiviralen Aktivität der Epithelial Lining Fluid, die auf diesen Faktoren beruht, herauszufinden, ist es notwendig, die Rauchgewohnheiten des Patientenguts mit in die Überlegungen einzubeziehen. Unter den COPD-Patienten der vorliegenden Arbeit befanden sich vier Raucher und zwei Exraucher. Der durchschnittliche Nikotinkonsum lag bei 27,3 Pack Years, mit einer Spannweite von 15 bis 40 Pack Years. Es liegen keine Daten bezüglich der Rauchgewohnheiten der in den zitierten Studien untersuchten Patienten vor.

Ein wesentlicher Punkt bei der Einordnung der Ergebnisse stellt auch das unterschiedliche Studiendesign dar. In dieser Arbeit wurden vereinigte BAL-Proben der jeweiligen Patientengruppe verwendet, während die beiden zitierten Studien jeweils das Material einzelner Patienten auf seine Hemmfähigkeit hin untersuchten. Dieser methodische Unterschied wurde bewusst gewählt und beruht auf den Ergebnissen der zitierten Studien: Zehn der zwölf getesteten Sarkoidose-BALs konnten eine Adenovirusinfektion in vitro nahezu vollständig unterbinden. In den bisher unveröffentlichten Daten der Arbeitsgruppe wiesen alle acht untersuchten COPD-BALs eine deutlich verminderte antivirale Aktivität gegenüber der Adenovirusinfektion verglichen mit Kontrollen auf. Aufgrund dieser Ausgangsdaten wurde im Hinblick auf das Ziel, die Spezifität des BAL-Materials auf seine Hemmung gegenüber weiteren Viren zu untersuchen, das BAL-Material der Patienten innerhalb beider Gruppen jeweils vereint. Nur auf diese Weise war es möglich, ausreichend identisches BAL-Material für alle Versuchsreihen zur Verfügung zu stellen.

Es konnte somit zwar nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden, dass unter den vereinigten BALs ein oder sogar mehrere Proben eingeschlossen wurden, die keine antivirale Aktivität aufwiesen, während dies bei anderen Proben durchaus der Fall war. Dies könnte zur Folge haben, dass durch die antivirale Aktivität vereinzelter Proben die gesamte BAL-Vereinigung

diese Eigenschaft erlangt hat. Aufgrund der zuvor beschriebenen Ergebnisse wurde dieser Effekt jedoch als vernachlässigbar angesehen.

Von übergeordneter Relevanz für die Einordnung der Ergebnisse ist jedoch, dass in den zitierten Studien ein anderer Serotyp des Adenovirus verwendet wurde. Die Bedeutung der Verwendung unterschiedlicher Serotypen wird weiter unten weiter erörtert (siehe 4.2.2.3.).

4.2.2. Zellulärer Wirkmechanismus der untersuchten Viren

Diese Arbeit ist die erste, die die antivirale Aktivität von identischem BAL-Material gegenüber einer Infektion mit verschiedenen Atemwegsviren in vitro – RSV, HRV und Adenovirus – aufzeigt. Dabei ist von entscheidender Bedeutung, dass die untersuchten Viren auf vollkommen unterschiedliche Art und Weise mit dem Wirtsorganismus interagieren. Eine Betrachtung der jeweiligen Virus-Wirt-Interaktion ist notwendig, um mögliche Angriffspunkte der Abwehr gegenüber diesen Erregern besser zu verstehen.

4.2.2.1. Respiratory Syncytial Virus (RSV)

Beim Respiratory Syncytial Virus (RSV) handelt es sich um ein umhülltes, einzelsträngiges (-)-Strang-RNA-Virus aus der Familie der Paramyxoviridae (Henderson, 1987). Eine große epidemiologische Bedeutung kommt dem Virus bei der akuten Bronchiolitis im Kindesalter zu (Mansbach et al., 2008). Es wird angenommen, dass eine RSV-Infektion im frühen Kindesalter zu der Entwicklung von Asthma bronchiale im weiteren Verlauf führen kann (Perez-Yaza et al., 2007). Aber auch im fortgeschrittenen Alter kommt dem RSV als Atemwegspathogen eine bedeutsame Rolle zu; besonders chronisch Lungenerkrankte oder immunsupprimierte Patienten sind hiervon betroffen (Griffin et al., 2002; Englund et al., 1988).

Über Adsorption und Membranfusion der eigenen Hülle mit der Membran der Wirtszelle gelangt das Viruskapsid in das Zytoplasma der Zelle (Hoekstra and

Kok, 1989; Lamb, 1993). Das RSV trägt an seiner Oberfläche drei Glykoproteine G (Anlagerung), F (Fusion) und SH (small hydrophobic), welche für diese Mechanismen verantwortlich sind (Collins, 1991). Das Glykoprotein G ist für die Anlagerung an die Zelle verantwortlich, F spielt für die Membranfusion die entscheidende Rolle. Die Funktion des Glykoproteins SH ist bisher noch nicht vollständig geklärt, es wird vermutet, dass es für die Funktion von F und G erforderlich ist. 16 Stunden nach Infektion kommt es zum Maximum der mRNA-Bildung. Nach 18-20 Stunden wird der Höhepunkt der Proteinbildung erreicht, so dass in der Folge eine Freisetzung der neuen Viruspartikel erfolgen kann (Collins et al., 1996).

In der vorliegenden Arbeit kam es beim RSV genau wie beim HRV in beiden mit BAL behandelten Gruppen zu einer signifikanten Hemmung 24 Stunden nach Infektionsbeginn. Es liegt die Vermutung nahe, dass zwölf Stunden nach Infektion aufgrund des längeren Replikationszyklus noch nicht ausreichend virale Partikel freigesetzt wurden und somit kein signifikanter Effekt zu beobachten war.

Für RSV konnten in der Vergangenheit Mechanismen des Immunsystems aufgezeigt werden, die dem Organismus eine Abwehr gegenüber einer RSV-Infektion ermöglichen.

Es konnte für die Surfactant-Proteine A und D eine entsprechende Funktion aufgezeigt werden. Surfactant-Protein D bindet direkt an RSV und fördert somit die Phagozytose des Virus durch Alveolarmakrophagen. In Mäusen ohne Surfactant-Protein D Synthese konnte das Virus verglichen zu Kontrollen in geringerem Ausmaß aus dem Respirationstrakt beseitigt werden und führte darüber hinaus zu einer verstärkten inflammatorischen Reaktion (LeVine et al., 2004). Es liegt die Vermutung nahe, dass eine Bindung von Surfactant-Protein D durch Interaktion mit den membrangebundenen Glykoproteinen das Virus zudem vom Eintritt in die Wirtszelle abhält. Für das Surfactant-Protein A konnte bereits zuvor eine dem Protein D äquivalente Wirkung gezeigt werden (LeVine et al., 1999).

Darüber hinaus konnte für das Humane β -Defensin-2 (HBD-2) eine antivirale Aktivität gegenüber RSV in respiratorischen Epithelzellen gezeigt werden (Kota et al., 2008). Es verhindert ein Eindringen des RSV in die Wirtszelle, indem es die Membranhülle des Virus in ihrer Integrität beeinträchtigt. Die Defensine sind, wie eingangs bereits erwähnt, als Mitglieder des angeborenen Immunsystems in der Epithelial Lining Fluid vertreten. Im Rahmen einer RSV-Infektion kommt es zu einer vermehrten Expression des HBD-2 in uninfizierten Epithelzellen über parakrine Aktivierung durch TNF- α und NF- κ B, welches von den infizierten Zellen freigesetzt wird (Kota et al., 2008). Somit kann dem RSV eine effektive Immunantwort entgegengesetzt werden.

Bei Rauchern wurden signifikant verminderte HBD-2 Spiegel im Sputum und Rachensekret von Patienten mit akuter Pneumonie festgestellt (Herr et al., 2009). Weitergehende Untersuchungen konnten zeigen, dass HBD-2 durch den Einfluss von Zigarettenrauch vermindert gebildet wird (Herr et al., 2009). Hierdurch könnte der Nachweis von RSV bei Patienten mit COPD-Exazerbationen sicherlich nicht ausschließlich, jedoch mitbegründet sein.

In der vorliegenden Arbeit konnte die RSV-Infektion durch die COPD-BAL jedoch signifikant gehemmt werden. Es wurde ein Infektionsmodell entwickelt, dass eine möglichst geringe Infektion simulieren sollte, um die antiviralen Effekte der BAL deutlicher herausstellen zu können. So ist einerseits denkbar, dass aufgrund der sehr niedrigen m.o.i. noch ausreichend HBD-2 vorhanden war, um die Infektion signifikant zu hemmen. Des Weiteren handelte es sich um in vitro Versuche, in denen die Zellen bislang nicht dem schädlichen Einfluss durch den Zigarettenrauch exponiert waren, wie dies bei Rauchern der Fall ist. Somit ist wahrscheinlich, dass die uninfizierten Zellen nicht in ihrer Fähigkeit der HBD-2 Produktion durch parakrine Aktivierung der infizierten Zellen beeinträchtigt waren, wie dies vermutlich bei Rauchern der Fall ist. Jedoch sind auch hier noch weitere Untersuchungen nötig, um diese Zusammenhänge näher zu belegen.

Bei der Sarkoidose hingegen konnten in der BAL erhöhte Spiegel von α - und β -Defensinen gemessen werden (Mukae et al., 2007). Eine geringere Rate an klinischen Infektionen könnte unter anderem hierin begründet sein.

In einem ersten pharmakologischen Ansatz ist es bereits gelungen, einen monoklonalen Antikörper, das Palivizumab, gegen das F-Protein zu entwickeln. Bei Kindern mit hohem Risiko für RSV-Infektionen ist er zur prophylaktischen Gabe zugelassen (American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases and Committee of Fetus and Newborn, 1999). Zur Behandlung von RSV-Infektionen ist er jedoch nicht geeignet. Das Palmitoyl-oleoyl-phosphatidylglycerol (POPG), ein Lungensurfactant, konnte erst kürzlich als ein weiterer vielversprechender pharmakologischer Ansatz zur Prävention und Behandlung von RSV-Infektionen identifiziert werden (Numata et al., 2010). Sowohl in vitro als auch in vivo konnte eine verminderte RSV-induzierte Inflammation sowie Infektion nachgewiesen werden. Es bedarf jedoch noch weiterer Untersuchungen, um den genauen Wirkmechanismus dieser natürlichen Substanz zu entschlüsseln.

4.2.2.2. Rhinovirus

Beim Rhinovirus handelt es sich als Mitglied der Picornaviren um ein nicht-umhülltes (+)-Strang-RNA-Virus, welches in über 100 Serotypen unterteilt werden kann. Etwa 90% der Serotypen, so auch das hier untersuchte HRV 16, gehören der so genannten „major group“ an, welche den interzellulären Rezeptor ICAM-1 des respiratorischen Epithels zur Adhäsion benötigen. (Greve et al., 1989). Eine andere Gruppe von Rhinoviren („minor group“) bindet sich über den LDL-Rezeptor (Hofer et al., 1994) an die Zielzelle. Die Replikation des Rhinovirus erfolgt in den Epithelzellen des oberen und unteren Respirationstraktes (Mosser et al., 2002; Papadopoulos et al., 2000). Es wird vermutet, dass ein Zusammenhang zwischen dem Schweregrad einer durch Rhinoviren verursachten akuten Exazerbation bei Asthmatikern bzw. COPD-Patienten und dem jeweils vorherrschenden Serotyp besteht (Wark et al., 2009).

Eine Infektion von A549-Zellen mit Rhinovirus in vitro konnte 24 Stunden nach Zugabe von BAL-Überständen verglichen mit Kontrollen signifikant gehemmt werden (siehe 3.3.2.). Der Replikationszyklus der Picornaviren endet nach etwa

zehn Stunden mit der Freisetzung der viralen Partikel (<http://www.microbiologybytes.com/virology/Picornaviruses.html>). Da in der vorliegenden Arbeit zwölf Stunden nach Beginn der Infektion somit die ersten Viren freigesetzt wurden, ließe sich erklären, warum sich zu diesem Zeitpunkt zwar bereits eine Hemmung der viralen Infektion in den BAL-Gruppen verglichen mit den Kontrollen abzugrenzen war, diese Hemmung jedoch noch nicht statistisch signifikant war (siehe 3.3.2.). Dieser Effekt war bei allen fünf hier nicht abgebildeten Versuchen reproduzierbar. 48 Stunden nach Infektionsbeginn zeigte sich in den mit BAL behandelten Ansätzen verglichen zu den Kontrollen ebenfalls ein verringerter Virusnachweis. Die Hemmung zu diesem Zeitpunkt war jedoch nicht statistisch signifikant. Dieses Ergebnis ist am ehesten der Limitierung des in vitro Modells zuzuschreiben. Nach 48 Stunden wurde aufgrund des zytopathischen Effekts des Rhinovirus bereits ein Großteil der Zellen zerstört, so dass eine weitere virale Replikation in den verbleibenden Zellen lediglich in geringerem Ausmaß stattfinden konnte. Hinzu kam, dass durch die vorangegangenen Prozesse in der Zellkultur bereits ein Großteil des Mediums verbraucht wurde. Ein Wechsel des Mediums konnte aus methodischen Gründen nicht vollzogen werden, da in diesem Fall sowohl das BAL-Material als auch die nicht adhärenen Viruspartikel aus dem Ansatz entfernt worden wären.

Da die Hemmung der rhinoviralen Infektion bereits zu einem frühen Zeitpunkt stattfand deutet dies darauf hin, dass die in der BAL vorliegenden antiviralen Faktoren das Rhinovirus offensichtlich entweder vor Infektion der Zellen inaktivieren konnten oder aber den Prozess der intrazellulären Replikation unterbinden konnten.

90% der Rhinoviren benötigen ICAM-1 als Rezeptor für die Zelladhäsion. In der Vergangenheit wurde bereits untersucht, ob sich an dieser Stelle eine Möglichkeit bietet, die virale Infektion zu inhibieren. Es sind hauptsächlich die basalen Zellen des respiratorischen Epithels, welche ICAM-1 exprimieren; die differenzierten suprabasalen Zellen hingegen präsentieren den Interzellularrezeptor in deutlich geringerem Ausmaß (Jakiela et al., 2008). Hieraus resultiert eine höhere Empfänglichkeit der basalen Epithelzellen

gegenüber einer Infektion mit Rhinovirus. Kommt es zu einer Verletzung oder Zerstörung der relativ resistenten Suprabasalzellen wird dem Virus der Weg für eine Infektion der nun freiliegenden und empfänglicheren Basalzellen geebnet (Jakiela et al., 2008). Ein entsprechender Epitheldefekt kann im Rahmen chronischer Lungenerkrankungen wie dem Asthma bronchiale oder der COPD vorkommen und würde die erhöhte Infektionsrate dieser Patienten mit respiratorischen Viren, allem voran dem Rhinovirus (siehe 1.3), erklären.

Eine gesteigerte Permeabilität des respiratorischen Epithels wurde bei Rauchern bereits Mitte der 80er Jahre entdeckt (Kennedy et al., 1984). Möglicherweise gelingt es dem Rhinovirus die basalen Zellen zu erreichen, bevor eine vollständige Elimination der Viren durch das Immunsystem erfolgen konnte. Hierdurch wäre auch nachvollziehbar, warum Raucher häufiger und schwerer an Erkältungen, welche meist durch Rhinoviren hervorgerufen werden, erkranken (Murin et al., 2000). Neuere Arbeiten konnten zudem eine verminderte Abwehr menschlicher Bronchialepithelzellen in vitro nach Zigarettenrauchexposition gegenüber einer rhinoviralen Infektion, resultierend in einer gesteigerten Replikation verglichen mit Kontrollen, nachweisen (Eddleston et al., 2011).

Auf den ersten Blick scheinen diese Erkenntnisse im Widerspruch zu den in dieser Arbeit gewonnenen Daten zu stehen. So wurde eine Infektion mit Rhinovirus in vitro durch BAL-Überstände sowohl von Sarkoidose- als auch von COPD-Patienten in gleichem Ausmaß gehemmt (siehe 3.3.2.). Im Rahmen der zitierten Studien wurde das Augenmerk allein auf die virale Infektion der Epithelzellen an sich gelegt, während die Einflüsse der ELF außer Acht blieben. Dabei lagert sich im Organismus die ELF, welche in dieser Arbeit durch die BAL-Überstände in konzentrierter Form untersucht wurde und wichtige Komponenten der immunologischen Abwehr enthält (siehe 1.1.), dem respiratorischen Epithel auf. Somit lag in dieser Arbeit der Fokus gezielt auf der antiviralen Aktivität eben dieser ELF. Es konnte gezeigt werden, dass im Falle der COPD trotz einer für rhinovirale Infektion prädisponierenden Grunderkrankung die antivirale Aktivität der ELF gegenüber dem Rhinovirus erhalten blieb. Daher liegt die Schlussfolgerung nahe, dass das Ausmaß des

Epitheldefektes und die daraus resultierende Exposition der ICAM-1 präsentierenden basalen Zellen eine entsprechende Infektion stärker begünstigen als dass eine vollständige Elimination des Virus vor Infektion der Zellen erfolgen kann. Diese Vermutung wird durch neueste Untersuchungen gestützt, bei denen der langwirksame β -2-Agonist Procaterol eine verminderte Expression von ICAM-1 durch menschliche Trachealepithelzellen in vitro mit nachfolgend verminderter Replikation von Rhinovirus 14 bewirkte (Yamaya et al., 2011).

Bei der Sarkoidose als granulomatöser Erkrankung kommt es klinisch nicht zu einer gehäuften Infektion mit Atemwegsviren. Im Gegensatz zum Asthma bronchiale oder der COPD existieren bisher kaum Studien, die einen Einfluss dieser Erkrankung auf die Funktion des respiratorischen Epithels im Hinblick auf seine antimikrobielle Kapazität hin untersuchen.

In der Vergangenheit konnten in der BAL von Sarkoidose-Patienten erhöhte Werte des löslichen ICAM-1 Rezeptors (sICAM-1) festgestellt werden (Ishii and Kitamura, 1995). Die Höhe des sICAM-1 Spiegels in der BAL korreliert dabei mit dem Aktivitätsgrad der Erkrankung. Es wird vermutet, dass die lösliche Form dieses Rezeptors durch Ablösung der wandständigen Form von Alveolarmakrophagen, Lymphozyten und dem Lungengewebe im Rahmen des Entzündungsprozesses entsteht (Ishii and Kitamura, 1995). Für den löslichen ICAM-1 Rezeptor konnte bereits eine Hemmung der rhinoviralen Infektion in vitro gezeigt werden (Crump et al., 1993; Marlin et al., 1990). Es kommt dabei zu einer Komplexbildung zwischen Rezeptor und Virus, wodurch dieses inaktiviert wird. Diese Zusammenhänge wurden durch eine klinische Studie, bei der Patienten vor Infektion mit Rhinovirus der lösliche ICAM-1 Rezeptor in vivo appliziert wurde, bestätigt (Turner et al., 1999). Allerdings wurden die Ergebnisse nicht weiter verfolgt, so dass hieraus bisher kein therapeutisches Behandlungskonzept entwickelt wurde. Die Relevanz des ICAM-1 als möglichem therapeutischen Angriffspunkt wurde unabhängig von diesen Untersuchungen durch eine andere Arbeitsgruppe gezeigt, welche durch die Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen ICAM-1 eine rhinovirale Infektion in vitro hemmen konnte (Subauste et al., 1995).

Eine Erhöhung des sICAM-1 findet sich zwar auch in der BAL von Asthmatikern (Hashimoto et al., 1993) und COPD-Patienten (Riise et al., 1994), jedoch scheinen bei dieser Erkrankung die vorliegenden Epitheldefekte durch eine vermehrte Zugänglichkeit der wandständigen ICAM-1 Rezeptoren der basalen Epithelzellen die rhinovirale Infektion in einem höheren Ausmaß zu begünstigen als die BAL zu hemmen im Stande ist (siehe oben). In dieses Bild würde auch die von Wark et al. gemachte Beobachtung passen, dass in Kultur genommene Bronchialepithelzellen von Asthmatikern eine vermehrte virale Replikation aufweisen (Wark et al., 2005).

Wie weiter oben bereits vermutet, scheint auch eine Veränderung der Genexpression der Zielzelle in Folge einer rhinoviralen Infektion in vitro und in vivo im Rahmen der Erregerabwehr beteiligt zu sein (Subauste et al., 1995; Einarsson et al., 1996; Proud et al., 2008). Proud und seine Mitarbeiter stellten 48 Stunden nach Infektion von Nasenepithelzellen in vivo eine Veränderung der Genexpression in 11.000 Transkripten verglichen zur Kontrollgruppe fest. Allerdings konnte nicht hinreichend erkundet werden, ob es sich hierbei um eine direkte virusinduzierte Veränderung handelte oder aber Folge von bereits in Gang gesetzten Kaskaden des Abwehrsystems war.

Andere Arbeiten stellten in Folge einer HRV-Infektion des respiratorischen Epithels eine vermehrte Produktion von humanem β -Defensin-2 und der induzierbaren NO-Synthase im Sinne einer antiviralen Abwehrreaktion des Immunsystems (Proud et al., 2004; Sanders et al., 2004) über Induktion weiterer Immunkaskaden fest, welche bislang jedoch noch unvollständig erforscht sind.

Eine vermehrte Synthese antiviraler Faktoren in Folge einer viralen Infektion konnte für das Rhinovirus bereits gezeigt werden (Proud et al., 2008).

So zeigt sich, dass die antivirale Abwehr des respiratorischen Epithels auf einer Vielzahl von Mechanismen beruht, welche teils unabhängig voneinander agieren und teils miteinander verknüpft sind. Nur so kann gewährleistet werden, dass bei einem Ausfall eines der Abwehrsysteme die Integrität des Organismus weiter erhalten werden kann. Der lösliche ICAM-1 Rezeptor wurde dabei in der

Vergangenheit als ein möglicher Angriffsort der antiviralen Aktivität und soll hier exemplarisch für eine Vielzahl weitere Mechanismen genannt werden.

4.2.2.3. Adenovirus

Beim Adenovirus handelt es sich um ein nicht-umhülltes, ikosahedrales, doppelsträngiges DNA-Virus. Es sind bislang 51 humanpathogene Serotypen bekannt, welche sich in sieben Spezies (A-F) einteilen lassen (Benkö et al., 2000; Wadell et al., 1980). Sie können ein breites Spektrum an Infektionen hervorrufen (Nazir and Metcalf, 2005). Hierzu zählen besonders Infektionen des Respirations- sowie des Gastrointestinaltraktes. Es werden jedoch auch Infektionen an Auge, Leber sowie des Urogenitaltraktes und lymphatischen Gewebes durch das Virus verursacht. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Adenovirus handelte es sich um das Humane Adenovirus B, Serotyp 3. Dieser Serotyp zählt ebenfalls zu den Erregern des Respirationstraktes (Kim et al., 2003).

Der Replikationszyklus des Adenovirus dauert etwa 24-36 Stunden (Shenk, 2001). Er lässt sich in zwei teilweise überlappende Prozesse unterteilen: eine frühe und eine späte Phase. In den ersten 8 bis 18 Stunden erfolgt zunächst die Synthese der viralen DNA. Dabei werden so genannte frühe Gene exprimiert (E1-4), welche die mRNA und Proteine zellulärer Komponenten fast vollständig unterbinden und den Stoffwechsel ganz auf die Virusreplikation ausrichten. Die späte Phase umfasst den Zeitraum zwischen 12 und 36 Stunden nach Infektion und ist dadurch gekennzeichnet, dass die sogenannten späten Gene (L1-5) das Zusammenfügen der neuen Viruspartikel steuern. Der Replikationszyklus endet in der Gewebekultur mit der Lyse der Wirtszelle, wobei abhängig vom jeweiligen Serotyp bis zu 10.000 Viruspartikel freigesetzt werden.

In den Adenovirus-Versuchen (siehe 3.4.2.) konnte durch Zugabe von BAL 48 Stunden nach Infektionsbeginn im Vergleich zur Kontrolle signifikant weniger Virus in der real-time PCR nachgewiesen werden. Es zeigte sich bereits zuvor

bei 24 Stunden in den mit BAL behandelten Proben verglichen zu den Kontrollen eine verminderte virale Replikation, jedoch war diese Hemmung noch nicht statistisch signifikant ($p > 0,05$). Aufgrund des längeren Replikationszyklus des Adenovirus verglichen mit den beiden anderen Viren (s.o.), kommt somit dem 48 Stunden Wert die entscheidende Bedeutung in der Analyse der Ergebnisse zu. Bei 24 Stunden wurden vermutlich erst wenige Viruspartikel freigesetzt, so dass das volle Ausmaß der antiviralen Aktivität erst nach Vollendung eines ganzen Replikationszyklus in signifikantem Ausmaß zur Geltung kommt.

Wie auch beim RSV und HRV bestehen theoretisch mehrere Angriffspunkte des Immunsystems gegenüber einer adenoviralen Infektion. So kann auch hier ein Eindringen des Virus in die Zellen verhindert oder aber die virale Replikation innerhalb der Zellen beeinflusst werden.

Ein Großteil der in der Literatur beschriebenen Arbeiten befasst sich mit dem Serotyp 5 des Adenovirus, welcher der Spezies Adenovirus C angehört und ebenfalls zu den Erregern des Respirationstraktes zählt. So wurde auch in den Arbeiten von Bastian das Adenovirus Typ 5 verwendet. Ein wesentlicher Unterschied zu der in dieser Arbeit verwendeten Spezies B besteht in der Invasion des Virus in die Zielzelle. Während die Spezies C den Coxsackie- und Adenovirusrezeptor (CAR) als Rezeptor der Wirtszelle benutzen (Bergelson et al., 1997; Roelvink et al., 1998; Tomko et al., 1997), verwendet die Spezies B mit Ausnahme der Serotypen 3 und 7 CD46 (Gaggar et al., 2003; Marttila et al., 2005; Segerman et al., 2003) als zellulären Rezeptor. Für die Serotypen 3 und 7 wurden CD80 und CD86 als entsprechende Oberflächenrezeptoren für das Eindringen in ihre Wirtszelle beschrieben (Short et al., 2004). Diese beiden Marker konnten bereits auf Zellen des respiratorischen Epithels, den bevorzugten Wirtszellen von Adenovirus Typ 3, nachgewiesen werden (Salik et al., 1999). Durch die Verwendung verschiedener Rezeptoren für die Virus-Wirt-Interaktion lässt sich somit die Organotropie der verschiedenen Serotypen des Adenovirus nachvollziehen.

In den Vorarbeiten konnte eine Adenovirus-Infektion mit Adenovirus C, Serotyp 5, welches über den CAR-Rezeptor in die Wirtszelle eindringt, nur in geringem Ausmaß durch Zugabe von COPD-BAL gehemmt werden (Bastian and Bewig, 1999; Bastian and Schäfer, 2001). Durch die Zugabe von Sarkoidose-BAL wurde eine nahezu vollständige Hemmung bewirkt. In der vorliegenden Arbeit wurde das Adenovirus B, Serotyp 3 verwendet, welches die Oberflächenmarker CD80 und CD86 als zelluläre Rezeptoren benötigt. Es konnte für dieses Virus eine ebenso effektive Hemmung der BAL von COPD- als auch von Sarkoidose-Patienten auf die in vitro Infektion gezeigt werden. Somit liegt die Vermutung nahe, dass die Unterschiede der antiviralen Aktivität der BAL von COPD-Patienten gegenüber einer Adenovirusinfektion abhängig vom vorliegenden Serotyp sind. Um diese These zu bestätigen bedarf es weiterer klinischer Untersuchungen, die die beiden Serotypen hinsichtlich ihrer Prävalenz im Zusammenhang mit akuten Exazerbationen der COPD untersuchen.

Bei der Sarkoidose konnte in der BAL eine erhöhte Expression von CD80 und CD86 auf den Alveolarmakrophagen nachgewiesen werden (Lommatzsch et al., 2007), so dass eine erhöhte Empfänglichkeit gegenüber einer Infektion mit Adenovirus Typ 3 vermutet werden sollte. Dies lässt sich im klinischen Alltag jedoch bislang nicht bestätigen. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die virale Replikation eher in den Epithelzellen des Respirationstraktes als in den Makrophagen stattfindet. Diese Vermutung ließ sich mit der vorliegenden Arbeit jedoch nicht näher überprüfen. Zum einen waren nach Lagerung bei -20°C keine vitalen Makrophagen in den BAL-Überständen mehr vorhanden, zum anderen wurden die Versuche in vitro durchgeführt. Dies brachte mit sich, dass der Einfluss des respiratorischen Epithels, welches im Rahmen der Pathogenese der Sarkoidose eventuell ebenfalls ein verändertes Expressionsmuster aufweist, außer Acht blieb.

Für die COPD existieren bislang keine Studien, die ein verändertes Expressionsmuster der Epithelzellen für CD80 aufzeigen. Es zeigte sich auf den Alveolarmakrophagen von COPD-Patienten jedoch eine verminderte Expression von CD86 verglichen zu nicht obstruktiven Rauchern. Die CD80-Expression von COPD-Patienten verglichen mit nicht obstruktiven Rauchern

und Nichtrauchern unterschied sich nicht signifikant (Löfdahl et al., 2006). Entsprechend der Sarkoidose sind jedoch auch hier weitere Untersuchungen nötig, um die klinische Relevanz dieser Erkenntnisse besser zu verstehen.

Bislang gibt es erst wenige Untersuchungen, die sich mit antiviralen Eigenschaften des angeborenen Immunsystems gegenüber den verschiedenen Serotypen des Adenovirus auseinandersetzen. So konnte für die α -Defensine bereits eine antivirale Aktivität gegenüber Adenovirus Typ 5 nachgewiesen werden (Smith and Nemerow, 2008). Ihr Wirkmechanismus besteht in der Blockade der Endosompenetration des Virus. Ob auch eine Infektion des Adenovirus Typ 3 durch α -Defensine gehemmt werden kann, ist derzeit unklar. Für die β -Defensine hingegen konnte bislang keine antivirale Aktivität gegenüber Adenovirus gezeigt werden.

Somit bedarf es weiterer Untersuchungen, um die antiviralen Komponenten des angeborenen Immunsystems gegenüber dem Adenovirus zu verstehen und daraus in der Folge therapeutische Konzepte ableiten zu können.

5. Zusammenfassung

Es ist bislang nur unzureichend verstanden, warum es bei einigen Atemwegs- und Lungenerkrankungen wie dem Asthma bronchiale oder COPD häufig zu Atemwegsinfektionen kommt, die dann akute Verschlechterungen dieser Erkrankungen auslösen, während dies bei anderen Atemwegs- und Lungenerkrankungen wie der Sarkoidose nicht der Fall ist. In Vorarbeiten konnte die bronchoalveoläre Lavage (BAL) von Patienten mit Sarkoidose eine Infektion mit Adenoviren in vitro hemmen, während dies bei Patienten mit Asthma bronchiale oder COPD nicht der Fall war. Es wurde vermutet, dass die antiviralen Eigenschaften der Epithelial Lining Fluid der Lunge – welche durch die BAL repräsentiert wird – im Rahmen der Pathogenese beim Asthma bronchiale und der COPD beeinträchtigt sind und somit eine vermehrte Infektion mit Atemwegsviren begünstigt wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die für die Sarkoidose bereits gezeigte Hemmung spezifisch für Adenoviren ist oder auch bei anderen relevanten Atemwegsviren (RSV, Rhinoviren) beobachtet werden kann. Ebenso sollte untersucht werden, ob auch die BAL von COPD Patienten die virale Infektion dieser Atemviren zu hemmen imstande ist.

Es wurden Infektionsmodelle für eine in vitro Infektion mit Rhinovirus, RSV und Adenovirus etabliert. Die Stärke der viralen Infektion konnte mittels quantitativer real-time PCR ermittelt werden. BAL-Material von sechs an Sarkoidose und sechs an COPD erkrankten Patienten wurde aufgereinigt und jeweils vereint. Nach Bestimmung des Proteingehalts in beiden BAL-Vereinigungen konnte die antivirale Aktivität in den drei Infektionsmodellen durch Zugabe von jeweils 20 µg BAL-Protein untersucht werden.

Die Zugabe der BAL-Überstände sowohl der Sarkoidose- als auch der COPD-Patienten konnte die Replikation der untersuchten Atemwegsviren (RSV, HRV und Adenovirus) in vitro verglichen mit Kontrollen signifikant hemmen.

In Anlehnung an die bei den untersuchten Viren unterschiedliche Dauer des Replikationszyklus wurde ein Maximum der Hemmung zu verschiedenen Zeitpunkten nach Versuchsbeginn beobachtet. Ein signifikanter Unterschied im Ausmaß der Hemmung zwischen der Sarkoidose- und der COPD-BAL ließ sich in keinem der Versuche ermitteln.

Es scheinen somit Bestandteile der Epithelial Lining Fluid vorzuliegen, die dem Organismus als erste effektive Barriere gegenüber dem Eindringen verschiedener Atemwegsviren dienen.

Bereits in der Vergangenheit konnten für einige Komponenten antivirale Eigenschaften nachgewiesen werden. Ihre Wirkung wurde dabei im Wesentlichen durch Interaktion mit den Oberflächenproteinen der Viren, welche ihnen als Bindungsrezeptoren für die Wirtszelle dienen, erzielt. Da die verschiedenen Viren jedoch unterschiedliche Oberflächenproteine der Wirte als Rezeptoren benötigen, konnte eine antivirale Aktivität der einzelnen Komponenten jeweils nur gegenüber einem Virus nachgewiesen werden.

Die Surfactant Proteine A und D verhindern beispielsweise ein Eindringen des RSV in den Wirtsorganismus durch Interaktion mit den Glykoproteinen der Virushülle, während das Humane β -Defensin-2 (HBD-2) die Integrität der Virushülle beeinträchtigt.

Beim Rhinovirus konnte für die lösliche Form des interzellulären Adhäsionsmoleküls ICAM-1 (sICAM-1) eine Komplexbildung mit dem Virus gezeigt werden, so dass dieses inaktiviert wird.

Den Ergebnissen dieser Arbeit folgend beruht die vermehrte Empfänglichkeit der COPD-Patienten gegenüber einer viralen Infektion der Atemwege nicht auf einer verminderten Aktivität der Epithelial Lining Fluid, sondern vermutlich eher auf den im Rahmen des chronischen Entzündungsprozesses bestehenden Epitheldefekten. Hierdurch werden die Oberflächenmoleküle der tieferen Epithelschichten den Viren zugänglich, welche diesen oft als Rezeptoren dienen und somit ein Eindringen in den Wirtsorganismus erleichtern. Für das Rhinovirus konnte dieser Sachverhalt bereits mit dem Oberflächenmolekül ICAM-1 nachgewiesen werden. Es sind weitere Untersuchungen nötig, um

diese Vermutung für andere Atemwegsviren, die im Rahmen der COPD-Exazerbationen eine bedeutsame Rolle spielen, nachzuweisen. Auf diese Weise ist es möglich, zukünftig neue therapeutische Ansatzpunkte zur Prävention und Therapie viraler Atemwegserkrankungen zu entwickeln.

6. Literaturverzeichnis

- [1] American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases and Committee of Fetus and Newborn. (1998). Prevention of respiratory syncytial virus infections: Indications for the use of palivizumab and update on the use of RSV-IGIV. *Pediatrics* **102**, 1211-1216
- [2] Arinir, U., Borg, I., Rohde, G., Keller, P., Loesecke, S., Schuermann, A., Wiethage, A., Bufe, A., Schultze-Werninghaus, G. (2002). Rhinovirus infection in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* **20**, 591s
- [3] Bastian, A., Bewig, B. (1999). Inhibition of adenovirus-mediated gene transfer by bronchoalveolar lavage fluid. *Gene Ther* **6**, 637-642
- [4] Bastian, A., Schäfer, H. (2001). Human alpha-defensin 1 (HNP-1) inhibits adenoviral infection in vitro. *Regul Pept* **101**, 157-161
- [5] Beisswenger, C., Bals, R. (2005). Antimicrobial peptides in lung inflammation. *Chem Immunol Allergy* **86**, 55-71
- [6] Benkö, M., Harrach, B., Russell, W. C. (2000). Family adenoviridae. In van Regenmortel, M. V. H., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L. (ed.). *Virus taxonomy*, Academic Press, New York, 227-238
- [7] Bergelson, J. M., Cunningham, J. A., Droguett, G., Kurt-Jones, E. A., Krithivas, A., Hong, J. S., Horwitz, M. S., Crowell, R. L., Finberg, R. W. (1997). Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* **275**, 1320-1323
- [8] Betsuyaku, T., Kuroki, Y., Nagai, K., Nasuhara, Y., Nishimura, M. (2004). Effects of ageing and smoking on SP-A and SP-D levels in bronchoalveolar lavage fluid. *Eur Respir J* **24**, 964-970
- [9] Bingle, C. D., Craven, C.J. (2002). PLUNC: A novel family of candidate host defence proteins expressed in the upper airways and nasopharynx. *Hum Mol Genet* **11**, 937-943

- [10] Borg, I., Rohde, G., Loeseke, S., Bittscheid, J., Schultze-Werninghaus, G., Stephan, V., Bufe, A. (2003). Evaluation of a quantitative real-time PCR for the detection of RSV in pulmonary diseases. *Eur Respir J* **21**, 944-951
- [11] Bradley, J. P., Bacharier, L. B., Bonfiglio, J., Schechtmann, K. B., Strunk, R., Storch, G., Castro, M. (2005). Severity of respiratory syncytial virus bronchiolitis is affected by cigarette smoke exposure and atopy. *Pediatrics* **115**, 7-14
- [12] Brogden, K.A. (2005). Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* **3**, 238-250
- [13] Bromberg, K., Daidone, B., Clarke, L., Sierra, M. F. (1984). Comparison of Immediate and Delayed Inoculation of HEp-2 Cells for Isolation of Respiratory Syncytial Virus. *Journal of Clinical Microbiology* **20**, 123-124
- [14] Collins, P. L. (1991). The molecular biology of human respiratory syncytial virus (RSV) of the genus pneumovirus. in Kingshury, D.W. (ed.). *The Paramyxoviruses*. Plenum Publishing Corp., New York, 103-162
- [15] Collins, P. L., McIntosh, K., Chanock, R. M. (1996). Respiratory syncytial virus. in Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M., Chanock, R. M., Monath, T. P., Melnick, J. L., Roizman, B., Straus, S. E. (ed.). *Fields Virology*, Third ed., Lippincott-Raven, Philadelphia, 1313-1351
- [16] Crouch, E., Hartshorn, K., Ofek, I. (2000). Collectins and pulmonary innate immunity. *Immunol Rev* **173**, 52-65
- [17] Crump, C. E., Arruda, E., Hayden, F. G. (1993). In vitro inhibitory activity of soluble ICAM-1 for the numbered serotypes of human rhinovirus. *Antiviral Chem Chemother* **4**, 323-327
- [18] Diamond, G., Legarda, D., Ryan, L. K. (2000). The innate immune response of the respiratory epithelium. *Immunological Reviews* **173**, 27-38

- [19] Doull, I.J., Lampe, F. C., Smith, S., Schreiber, J., Freezer, N. J., Holgate, S. T. (1997). Effect of inhaled corticosteroids on episodes of wheezing associated with viral infection in school age children: randomised double blind placebo controlled trial. *BMJ* **315**, 858-862
- [20] Eddleston, J., Lee, R. U., Doerner, A. M., Herschbach, J., Zuraw, B. L. (2011). Cigarette smoke decreases innate responses of epithelial cells to rhinovirus infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* **44**, 118-126
- [21] Einarsson, O., Geba, G. P., Zhu, Z., Landry, M., Elias, J. A. (1996). Interleukin-11: stimulation in vivo and in vitro by respiratory viruses and induction of airways hyperresponsiveness. *J Clin Invest* **97**, 915-924
- [22] Englund, J. A., Sullivan, C. J., Jordan, M. C., Dehner, L. P., Vercellotti, G. M., Balfour, H. H. (1988). Respiratory syncytial virus infection in immunocompromised adults. *Ann Intern Med* **109**, 203-208
- [23] Gaggar, A., Shayakhmetov, D. M., Lieber, A. (2003). CD 46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nat Med* **9**, 1408-1412
- [24] Ganz, T., Weiss, J. (1997). Antimicrobial peptides of phagocytes and epithelia. *Semin Hematol* **34**, 343
- [25] Ginsberg, H. S., Prince, G. A. (1994). The molecular basis of adenovirus pathogenesis. *Infect Agents Dis* **3**, 1-8
- [26] Greve, J. M., Davis, G., Meyer, A. M., Forte, C. P., Yost, S. C., Marlor, C. W., Kamarck, M. E., McClelland, A. (1989). The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. *Cell* **56**, 839-847
- [27] Griffin, M., Coffey, C. S., Neuzil, K. M., Mitchel, E. F., Wright, P. F., Edwards, K. (2002). Winter viruses: influenza and respiratory syncytial virus related morbidity in chronic lung disease. *Arch Intern Med* **162**, 1229-1236
- [28] Gropp, R., Frye, M., Wagner, T. O., Bargon, J. (1999). Epithelial defensins impair adenoviral infection: Implication for adenovirus-mediated gene therapy. *Hum Gene Ther* **10**, 957-964

- [29] Gürkan, F., Kiral, A., Dagli, E., Karakoc, F. (2000). The effect of passive smoking on the development of respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Eur J Epidemiol* **16**, 465-468
- [30] Hartsnorn, K. L., White, M. R., Tecle, T., Holmskov, U., Crouch, E. C. (2006). Innate defense against influenza A virus: Activity of human neutrophil defensins and interactions of defensins with surfactant protein D. *J Immunol* **176**, 6962-6972
- [31] Harvey, S. A., Romanowski, E. G., Yates, K. A., Gordon, Y. J. (2005). Adenovirus-directed ocular innate immunity: The role of conjunctival defensin-like chemokines (IP-10, I-TAC) and phagocytic human defensin-alpha. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**, 3657-3665
- [32] Hashimoto, S., Imai, K., Kobayashi, T., Amemiya, E., Takahashi, Y., Tomita, Y., Iwatal, T., Suguro, H., Yamaguchi, M., Yachi, A., Horie, T. (1993). Elevated levels of soluble ICAM-1 in sera from patients with bronchial asthma. *Allergy* **48**, 370-372
- [33] Henderson, F. W. (1987). Pulmoary infections with respiratory syncytial virus and the parainfluenza viruses. *Semin Respir Infect* **2**, 112-121
- [34] Herr, C., Beisswenger, C., Hess, C., Kandler, K., Suttorp, N., Welte, T., Schroeder, J. M., Vogelmeier, C., Bals, R. (2009). Suppression of pulmonary innate host defence in smokers. *Thorax* **64**(2), 144-149
- [35] Hoekstra, D., Kok, J. W. (1989). Entry mechanisms of enveloped viruses. Implications for fusion of intracellular membranes. *Biosci Rep* **9**, 365-394
- [36] Hofer, F. Gruenberger, M., Kowalski, H., Machat, H., Huettinger, M., Kuechler, E., Blaas, D. (1994). Members of the low density lipoprotein receptor family mediate cell entry of a minor-group common cold virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **91**(5), 1839-1842
- [37] Ishii, Y., Kitamura, S. (1995). Elevated Levels of Soluble ICAM-1 in Serum and BAL Fluid in Patients With Active Sarcoidosis. *Chest* **107**, 1636-1640

- [38] Jakiela, B., Brockman-Schneider, R., Amineva, S., Lee, W. M., Gern, J. E. (2008). Basal Cells of Differentiated Bronchial Epithelium Are More Susceptible to Rhinovirus Infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* **38**, 517-523
- [39] Johnston, S. L., Pattemore, P. K., Sanderson, G., Smith, S., Campbell, M. J., Josephs, L. K., Cunningham, A., Robinson, B. S., Myint, S. H., Ward, M. E., Tyrrell, D. A., Holgate, S. T. (1996). The relationship between upper respiratory infections and hospital admissions for asthma: a time-trend analysis. *Am J Respir Crit Care Med* **154**, 654-660
- [40] Johnston, S. L., Pattemore, P. K., Sanderson, G., Smith, S., Lampe, F., Josephs, L., Symington, P., O'Toole, S., Myint, S. H., Tyrrell, D. A., Holgate, S. T. (1995). Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children. *BMJ* **310**, 1225-1228
- [41] Kennedy, S. M., Elwood, R. K., Wiggs, B. J. R., Pare, P. D. (1984). Increased airway mucosal permeability of smokers. *Am Rev Respir Dis* **129**, 143-148
- [42] Kim, Y. J., Hong, J. Y., Lee, H. J., Shin, S. H., Kim, Y. K., Inada, T., Hashido, M., Piedra, P. A. (2003). Genome type analysis of adenovirus types 3 and 7 isolated during successive outbreaks of lower respiratory tract infections in children. *J Clin Microbiol* **41**, 4594-4599
- [43] Kota, S., Sabbah, A., Chang, T. H., Harnack, R., Xiang, Y., Meng, X., Bose, S. (2008). Role of Human β -Defensin-2 during Tumor Necrosis Factor- α /NF- κ B-mediated Innate Antiviral Response against Human Respiratory Syncytial Virus. *J Biolog Chem* **283**, 22417-22429
- [44] Kucejko, W., Chyczewska, E., Naumnik, W., Ossolinska, M. (2009). Concentration of surfactant protein D, Clara cell protein CC-16 and IL-10 in bronchoalveolar lavage (BAL) in patients with sarcoidosis, hypersensitivity pneumonitis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Folia Histochem Cytobiol* **47(2)**, 225-230

- [45] Lamb, R. A. (1993). Paramyxovirus fusion: a hypothesis for changes. *Virology* **197**, 1-11
- [46] Lawson, P. R., Reid, K. B. (2000). The roles of surfactant proteins A and D in innate immunity. *Immunol Rev* **173**, 66-78
- [47] LeVine, A. M., Elliott, J., Whitsett, J. A., Srikiatkachorn, A., Crouch, E., DeSilva, N., Korfhagen, T. (2004). Surfactant Protein-D Enhances Phagocytosis and Pulmonary Clearance of Respiratory Syncytial Virus. *Am J Respir Cell Mol Biol* **31**, 193-199
- [48] LeVine, A. M., Gwozdz, J., Stark, J., Bruno, M., Whitsett, J., Korfhagen, T. (1999). Surfactant protein-A enhances respiratory syncytial virus clearance in vivo. *J Clin Invest* **103**, 1015-1021
- [49] LeVine, A. M., Whitsett, J., Hartshorn, K. L., Crouch, E. C., Korfhagen, T. (2001). Surfactant Protein D Enhances Clearance of Influenza A Virus from the Lung In Vivo. *J Immunol* **167**, 5868-5873
- [50] Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* **25(4)**, 402-408
- [51] Löfdahl, J. M., Wahlström, J., Sköld, C. M. (2006). Different inflammatory cell pattern and macrophage phenotype in chronic obstructive pulmonary disease patients, smokers and non-smokers. *Clin Exp. Immunol* **145(3)**, 428-437
- [52] Lommatzsch, M., Bratke, K., Bier, A., Julius, P., Kuepper, M., Luttmann, W., Virchow, J. C. (2007). Airway dendritic cell phenotypes in inflammatory diseases of the human lung. *Eur Respir J* **30**, 878-886
- [53] Lung Health Study Research Group. (2000). Effect of inhaled triamcinolone on the decline in pulmonary function in chronic obstructive pulmonary disease. *N Eng J Med* **343**, 1902-1909
- [54] Mansbach, J. M., McAdam, A. J., Clark, S., Hain, P. D., Flood, R. G., Acholonu, U., Camargo, C. A. Jr. (2008). Prospective multicenter study

of the viral etiology of bronchiolitis in the emergency department. *Acad Emerg Med* **15(2)**, 111-118

- [55] Marlin, S. D., Staunton, D. E., Springer, T. A., Stratowa, C., Sommergruber, W., Merluzzi, V. J. (1990). A soluble form of intercellular adhesion molecule-1 inhibits rhinovirus infection. *Nature* **344**, 70-72
- [56] Marttila, M., Persson, D., Gustafsson, D., Liszewski, M. K., Atkinson, J. P., Wadell, G., Arnberg, N. (2005). CD46 is a cellular receptor for all species B adenoviruses types 3 and 7. *J Virol* **79**, 14429-14436
- [57] Medzhitov, R., Janeway C. A. (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* **9**, 4-9
- [58] Meuronen, A., Majuri, M. L., Alenius, H., Mäntylä, T., Wolff, H., Piirilä, P., Laitinen, A. (2008). Decreased cytokine and chemokine mRNA expression in bronchoalveolar lavage in asymptomatic smoking subjects. *Respir* **75(4)**, 450-458
- [59] Mosser, A. G., Brockman-Schneider, R., Amineva, S., Burchell, L., Sedgwick, J. B., Busse, W. W., Gern, J. E. (2002). Similar frequency of rhinovirus-infectible cells in upper and lower airway epithelium. *J Infect Dis* **185**, 734-743
- [60] Mukae, H., Ishimoto, H., Yanagi, S., Ishii, H., Nakayama, S., Ashitani, J., Nakazato, M., Kohno, S. (2007). Elevated BALF concentrations of alpha- and beta-defensins in patients with pulmonary alveolar proteinosis. *Respir Med* **104**, 715-721
- [61] Murin, S., Bilello, K. S., Matthay, R. (2000). Other smoking-affected pulmonary diseases. *Clin Chest Med* **21**, 121-137
- [62] Nazir, S. A., Metcalf, J. P. (2005). Innate immune response to adenovirus. *J Invest Med* **53**, 292-304
- [63] Nicholson K. G., Kent, J., Ireland, D. C. (1993). Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults. *BMJ* **307**, 982-986

- [64] Numata, M., Chu, H. W., Dakahama, A., Voelker, D. R. (2010). Pulmonary surfactant phosphatidylglycerol inhibits respiratory syncytial virus-induced inflammation and infection. *Proc Natl Acad Sci USA* **107(1)**, 320-325
- [65] Papadopoulos, N. G., Bates, P. J., Bardin, P. G., Papi, A., Leir, S. H., Fraenkel, D. J., Meyer, J., Lackie, P. M., Sanderson, G., Holgate, S. T., Johnston, S. L. (2000). Rhinoviruses infect the lower airways. *J Infect Dis* **181**, 1875-1884
- [66] Papi, A., Papadopoulos, N. G., Degitz, K., Holgate, S. T., Johnston, S. L. (2000). Corticosteroids inhibit rhinovirus-induced intercellular adhesion molecule-1 up-regulation and promoter activation on respiratory epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol* **105**, 318-326
- [67] Perez-Yarza, E. G., Moreno, A., Lazaro, P., Mejias, A., Ramilo, O. (2007). The association between respiratory syncytial virus infection and the development of childhood asthma: a systematic review of the literature. *Pediatr Infect Dis J* **26**, 733-739
- [68] Proud, D., Sanders, S. P., Wiehler, S. (2004). Human rhinovirus infection induces airway epithelial cell production of human β -defensin-2 both in vitro and in vivo. *J Immunol* **172**, 4637-4645
- [69] Proud, D., Turner, R. B., Winther, B., Wiehler, S., Tiesman, J. P., Reichling, T. D., Juhlin, K. D., Fulmer, A. W., Ho, B. Y., Walanski, A. A., Poore, C. L., Mizoguchi, H., Jump, L., Moore, M. L., Zukowski, C. K., Clymer, J. W. (2008). Gene Expression Profiles during in Vivo Human Rhinovirus Infection. *Am J Respir Crit Care Med* **178**, 962-968
- [70] Reddel, H., Ware, S., Marks, G., Salome, C., Jenkins, C., Woolcock, A. (1999). Differences between asthma exacerbations and poor asthma control. *Lancet* **353**, 364-369
- [71] Riise, G. C., Larsson, S., Löfdahl, C-G., Andersson, B. A. (1994). Circulating cell adhesion molecules in bronchial lavage and serum in COPD patients with chronic bronchitis. *Eur Respir J* **7**, 1673-1677

- [72] Roelvink, P. W., Lizonova, A., Lee, J. G., Li, Y., Bergelson, J. M., Finberg, R. W., Brough, D. E., Kovesdi, I., and Wickham, T. J. (1998). The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J Virol* **77**, 7909-7915
- [73] Rohde, G., Borg, I., Arinir, U., Kronsbein, J., Rausse, R., Bauer, T. T., Bufe, A., Schultze-Wernighaus, G. (2005). Relevance of human metapneumovirus in exacerbations of COPD. *BMC Respiratory Research* **6**, 150
- [74] Rohde, G., Wiethage, A., Borg, I., Arinir, U., Schürmann, A., Löseke, S., Kauth, M., Bufe, A., Schultze-Werninghaus, G. (2001). Influenza A virus in exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* **18**, 152s
- [75] Rohde, G., Wiethage, A., Borg, I., Kauth, M., Bauer, T. T., Gillissen, A., Bufe, A., Schultze-Werninghaus, G. (2003). Respiratory viruses in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease requiring hospitalization - a case-control study. *Thorax* **58**, 37-42
- [76] Rohde, G., Wiethage, A., Borg, I., Löseke, S., Kauth, M., Gillissen, A., Bufe, A., Schultze-Werninghaus, G. (2001). Group C Adenoviruses in exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* **163**, A349
- [77] Sabounchi-Schütt, F., Aström, J., Hellman, U., Eklund, A., Grunewald, J. (2003). Changes in bronchoalveolar lavage fluid proteins in sarcoidosis: a proteomics approach. *Eur Respir J* **21**, 414-420
- [78] Salik, E., Tyorkin, M., Mohan, S., George, I., Becker, K., Oei, E., Kalb, T., Sperber, K. (1999). Antigen trafficking and accessory cell function in respiratory epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **21**, 365-379
- [79] Samuel, C. E. (2001). Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* **14**, 778-809

- [80] Sanders, S. P., Proud, D., Siekierski, E. S., Yachechko, R., Liu, M. C. (2004). Role of nasal nitric oxide in the resolution of experimental rhinovirus infection. *J Allergy Clin Immunol* **113**, 697-702
- [81] Schleimer, R. P. (2004). Glucocorticoids suppress inflammation but spare innate immune responses in airway epithelium. *Proc Am Thorac Soc* **1**, 222-230
- [82] Schnapp, D., Harris, A., (1998). Antibacterial peptides in bronchoalveolar lavage fluid. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **19** 352-356
- [83] Schutte, B. C., McCray, P. B. J. (2002). β -defensins in lung host defense. *Annu Rev Physiol* **64**, 709
- [84] Seemugul, T., Donaldson, G. C., Paul, E. A., Bestall, J. C., Jeffries, D. J., Wedzicha, J. A. (1998). Effect of exacerbation on quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* **157**, 1418-1422
- [85] Seemungal, T., Harper-Owen, R., Bhowmik, A., Moric, I., Sanderson, G., Message, S., Maccallum, P., Meade, T. W., Jeffries, D. J., Johnston, S. L., Wedzicha, J. A. (2001). Respiratory Viruses, Symptoms, and Inflammatory Markers in Acute Exacerbations and Stable Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* **164**, 1618-1623
- [86] Segerman, A., Atkinson, J. P., Marttila, M., Dennerquist, V., Wadell, G., Arnberg, N. (2003). Adenovirus type 11 uses CD46 as a cellular receptor. *J Virol* **77**, 9183-9191
- [87] Sethi, S. (2000). Infectious etiology of acute exacerbations of chronic bronchitis. *Chest* **117**, 380-385
- [88] Shenk, T. (2001). Adenoviridae: the viruses and their replication. in Knipe, D. M., Howley, P. M., Griffin, D. E., Lamb, R. A., Martin, M. A., Roizman, B., Straus, S. E. (ed.). *Fields Virology*, Fourth ed., vol. 2. Lippincott-Raven, Philadelphia, 2265-2300

- [89] Short, J. J., Pereboev, A. V., Kawakami, Y., Vasu, C., Holterman, M. J., Curiel, D. T. (2004). Adenovirus serotype 3 utilizes CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) as cellular attachment receptors. *Virology* **322**, 349-359
- [90] Smith, J. G., Nemerow, G. R. (2008). Mechanism of Adenovirus Neutralization by Human α -Defensins. *Cell Host & Microbe* **3**, 11-19
- [91] Spurzem, J. R., Rennard, S. I. (2005). Pathogenesis of COPD. *Semin Respir Crit Care Med* **26**, 142-153
- [92] Subauste, M. C., Jacoby, D. B., Richards, S. M., Proud, D. (1995). Infection of a human respiratory epithelial cell line with rhinovirus. Induction of cytokine release and modulation of susceptibility to infection by cytokine exposure. *J Clin Invest* **96**, 549-557
- [93] Takizawa, H. (2005). Bronchial epithelial cells in allergic reactions. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **4**, 305-311
- [94] Tomko, R. P., Xu, R., Philipson, L. (1997). HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 3352-3356
- [95] Turner, R. B., Wecker, M. T., Pohl, G., Witek, T. J., McNally, E., St. George, R., Winther, B., Hayden, F. G. (1999). Efficacy of tremacamra, a soluble intercellular adhesion molecule 1, for experimental rhinovirus infection: a randomized clinical trial. *JAMA* **281**, 1797-1804
- [96] van Wetering, S., Sterk, P. J., Rabe, K. F., Hiemstra, P. S. (1999). Defensins: key players or bystanders in infection, injury and repair in the lung. *J Allergy Clin Immunol* **104**, 1131
- [97] Wadell, G., Hammarskjöld, M. L., Winberg, G., Varsanyi, M., Sundell, G. (1980). Genetic variability of adenoviruses. *Ann N. Y. Acad Sci* **354**, 16-42

- [98] Walters, J. A. E., Walters, E. H., Wodd-Baker, R. (2005). Oral corticosteroids for stable chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev* **2**, CD005374
- [99] Wark, P. A., Grissell, T., Davies, B., See, H., Gibson, P. G. (2009). Diversity in the bronchial epithelial cell response to infection with different rhinovirus strains. *Respirology* **14(2)**, 180-186
- [100] Wark, P. A., Johnston, S. L., Bucchieri, F., Powell, R., Puddicombe, S., Laza-Stanca, V., Holgate, S. T., Davies, D. E. (2005). Asthmatic bronchial epithelial cells have a deficient innate immune response to infection with rhinovirus. *J Exp Med* **201**, 937-947
- [101] Whitsett, J. A. (2002). Intrinsic and innate defenses in the lung: intersection of pathways regulating lung morphogenesis, host defense, and repair. *J Clin Invest* **109**, 565-569
- [102] Yamaya, M., Nishimura, H., Hatachi, Y., Yoshida, M., Fujiwara, H., Asada, M., Nakayama, K., Yasuda, H., Deng, X., Sasaki, T., Kubo, H., Nagatomi, R. (2011). Procaterol inhibits rhinovirus infection in primary cultures of human tracheal epithelial cells. *Eur J Pharmacol* **650(1)**, 431-444

7. Danksagung

An dieser Stelle gilt mein besonderer Dank Herrn Professor Dr. Gernot Rohde für die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit sowie die Motivierung und sehr gute Betreuung im Verlauf.

Frau Andrea Wagner danke ich für die Heranführung an die praktischen Fertigkeiten der Laborarbeit und die wertvollen Tipps bei methodischen Fragestellungen. Ohne sie wäre die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Bei Frau Melanie Ulbrich und Frau Birgit Schärpling möchte ich mich besonders für die vielfältige Unterstützung bei Fragen der Laborarbeit und gute Zusammenarbeit bedanken.

Danken möchte ich auch ganz herzlich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Pneumologie, die mir wertvolle Tipps für die praktische Durchführung der Arbeiten gegeben haben.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern und meinen Geschwistern Angela und Katharina, die mich jederzeit geduldig und motivierend unterstützt haben. Meiner Schwester Angela bin ich dankbar für die Korrektur dieser Arbeit und die wertvollen Anregungen.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname	Suermann, Matthias
Geburtsdatum, -ort	25. Mai 1983, Bochum
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Religionszugehörigkeit	römisch-katholisch

Schulbildung

09/1989 – 07/1993	Gemeinschafts-Grundschule Heggen
09/1993 – 06/2002	St.-Ursula-Gymnasium Attendorn
06/2002	Abitur

Zivildienst

07/2002 – 04/2003	Werthmann-Werkstätten, Attendorn
-------------------	----------------------------------

Hochschulstudium

10/2003 – 11/2009	Studium der Humanmedizin, Ruhr-Universität Bochum
09/2005	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08/2008 – 07/2009	Praktisches Jahr, Berufsgenossenschaftliches Universitätsklinikum Bergmannsheil Bochum
	Wahlfach: Anästhesie
11/2009	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Beruflicher Werdegang

Seit 01/2010	Assistenzarzt in der Medizinischen Klinik III Pneumologie, Allergologie, Schlaf- und Beatmungsmedizin Berufsgenossenschaftliches Universitätsklinikum Bergmannsheil GmbH Direktor: Prof. Dr. med. G. Schultze-Werninghaus
--------------	--