

Aus dem Institut für Virologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Jörg Timm

Immunantwort und klinisches Erscheinungsbild bei Infektionen mit dem Humanen
Metapneumovirus, Respiratory Syncytial Virus und Rhinovirus im Kindesalter

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Johanna Katharina Weis
2015

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Erstgutachter: Prof. Dr. Adams

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Schuster

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Adams, O., Weis, J., Jasinska, K., Vogel, M., & Tenenbaum, T. Comparison of human metapneumovirus, respiratory syncytial virus and Rhinovirus respiratory tract infections in young children admitted to hospital. *Journal of medical virology*. 2014 Jul 30. doi: 10.1002/jmv.24025

Liste der verwendeten Abkürzungen

A	Adenin
AAP	American Society of Pediatrics
AK	Antikörper
APV-C	aviäres Metapneumovirus Serotyp C
AS	Aminosäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CCA	<i>chimpanzee coryza agent</i>
cDNA	komplementäre DNA
CPE	cytopathischer Effekt
CTRL	Kontrolle
DGPI	Deutsche Gesellschaft für Pädiatrische Infektiologie
DMEM	<i>Dulbecco's modified Egel's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure x Na ₂ -Salz
ELISA	<i>Enzyme linked immune sorbent assay</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EVK	Evangelisches Krankenhaus
F-Protein	Fusionsprotein
FBS = FCS = FKS	fötales Kälberserum/ fetal bovine serum
Fc	<i>crystallisable fragment</i>
F/M/N/P-Gen	Gen, das für das jeweilige Protein kodiert
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	Guanin
G-Protein	Glykoprotein
GCSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
HHU	Heinrich-Heine-Universität
H-Protein	Hämagglutinationsprotein
Hep-2	humane Larynx-Carcinom-Zelllinie
Hep-G2	humane Leber-Carcinom-Zelllinie

HMPV	humanes Metapneumovirus
HN-Protein	Hämagglutinins-Neuraminidase-Protein
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
IFT	Immunfluoreszenstest
IgA/IgE/IgG/IgM	Immunglobulin A/E/G/M
IL-8	Interleukin-8
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
JAK	Januskinase
kb	Kilobasen
L	Polymerase
LDL-Rezeptor	<i>low-density lipoprotein</i> Rezeptor
L-Protein	<i>large polymerase</i> Protein
M	Marker
M-Protein	Matrixprotein
M2	Regulatorgen für Transkription und Replikation
MIB-1β	<i>Macrophage inflammatory protein-1β</i>
MRC-5	Humane fetale Lungenfibroblasten
N-Protein	Nucleoprotein
NaCl	Natriumchlorid
NS-1-Protein	Nicht-Strukturprotein 1
NS-2-Protein	Nicht-Strukturprotein 2
P-Protein	Phosphoprotein
P 1-3	Polyprotein 1-3
PAM-Matrix	<i>Point Accepted Mutation</i> Matrix
PBI/PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
Pr	Probe
p-Wert	Signifikanzwert
r	Regressionskoeffizient
Regr	Regressionsgrade
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Rotationen pro Minute

RSV	Respiratorisches Synzytialvirus
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SH-Protein	<i>small hydrophobic protein</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
STD	Standard
T	Thymin
TBE	<i>Tris-borate-Ethylendiamintetraacetat</i>
TMB	<i>Tetramethylbenzidin</i>
TNF-α	<i>Tumornekrosefaktor-alpha</i>
VL	<i>Viruslast</i>
VP1-4	<i>Viruspolypeptid 1-4</i>
Vpg	<i>virales genomassoziiertes Protein</i>

Inhaltsverzeichnis:

1	EINLEITUNG	1
1.1	Einleitung	1
1.2	Definition	1
1.3	Einteilung der Viren	2
1.4	Virale Erreger von Respirationstraktinfektionen	2
1.5	Humanes Metapneumovirus	3
1.5.1	Entdeckung und taxonomische Einteilung	3
1.5.2	Viruspartikelbau und Genomstruktur	4
1.5.3	Epidemiologie	6
1.5.4	Klinik	7
1.5.5	Nachweismethoden	8
1.5.6	Therapie	9
1.6	Respiratorisches Synzytialvirus	9
1.6.1	Entdeckung und taxonomische Einteilung	9
1.6.2	Viruspartikelbau und Genomstruktur	10
1.6.3	Epidemiologie	10
1.6.4	Klinik	11
1.6.5	Nachweismethoden	11
1.6.6	Therapie	12
1.7	Rhinovirus	13
1.7.1	Entdeckung und taxonomische Einteilung	13
1.7.2	Viruspartikelbau und Genomstruktur	13
1.7.3	Epidemiologie	14
1.7.4	Klinik	15
1.7.5	Nachweismethoden	16
1.7.6	Therapie	16
1.8	Immunologie	17
1.8.1	Zytokine	17
1.8.1.1	CCL4/MIP-1 β	17
1.8.1.2	IL-8	18
1.8.1.3	GCSF	18

1.8.1.4	TNF- α	18
1.9	Zielsetzung der Arbeit.....	20
2	MATERIAL UND METHODEN.....	21
2.1	Liste der verwendeten Materialien.....	21
2.1.1	Materialien arbeitsplatzübergreifend.....	21
2.1.2	PCR.....	21
2.1.2.1	RNA-Extraktion.....	21
2.1.2.2	<i>One-Step-RT-PCR</i>	21
2.1.2.3	Amplifikation.....	22
2.1.2.4	Gel.....	22
2.1.2.5	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	22
2.1.3	Proteinbestimmung nach Bradford.....	22
2.1.4	IL-8-ELISA.....	22
2.1.5	TNF-α-ELISA.....	23
2.1.6	GCSF-ELISA.....	23
2.1.7	IgG-ELISA.....	24
2.1.8	Zellkultur.....	24
2.1.9	Immunfluoreszenz.....	24
2.1.10	Geräte.....	25
2.1.11	Software.....	26
2.2	Auswahl der Nasopharynxaspirate/Proben.....	27
2.3	<i>One-Step-RT-PCR</i>.....	28
2.3.1	RNA-Extraktion aus den Nasopharynxaspiraten.....	28
2.3.2	Auswahl der Primer.....	29
2.3.3	Umschreiben der RNA in cDNA und Amplifikation.....	29
2.3.4	Zweite Amplifikation („Nested PCR“).....	30
2.3.5	Nachweis der Amplifikate im Agarosegel.....	31
2.3.6	Aufreinigung der PCR-Produkte zur Sequenzierung.....	31
2.4	Proteinbestimmung nach Bradford.....	32
2.4.1	Vorbereitung der Proteinstandards.....	32
2.4.2	Durchführung der Proteinbestimmung.....	32
2.5	IgG-ELISA.....	33
2.6	IL-8-ELISA.....	34

2.6.1	Vorbereitung der ELISA-Platten	34
2.6.2	Durchführung der IL-8-Bestimmung.....	34
2.7	TNF- α - und GCSF-ELISA.....	35
2.8	Zellkultur	36
2.8.1	Zellkulturierung.....	36
2.8.2	Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer	37
2.8.3	Einfrieren von Zellen.....	37
2.8.4	Auftauen von Zellen	38
2.8.5	Virusinfektion von Zelllinien	38
2.8.6	Cytopathischer Effekt und Virusernte.....	39
2.9	Immunfluoreszenz	39
2.9.1	Vorbereitung der Objektträger	39
2.9.2	Durchführung des Antikörpernachweises	40
2.10	Statistische Auswertung.....	41
3	ERGEBNISSE	42
3.1	Auswertung der <i>One-Step-RT-PCR</i>	42
3.1.1	Erstellung eines phylogenetischen Stammbaums des HMPV	43
3.1.2	HMPV: Nukleotid und AS-Divergenzen.....	45
3.2	Auswertung der Zytokin-ELISA.....	46
3.2.1	Auswertung des IL-8-ELISA	46
3.2.2	Auswertung des GCSF- und TNF- α -ELISA	46
3.3	Auswertung der Immunfluoreszenz.....	46
3.3.1	Antikörperverteilung in den einzelnen Kollektiven.....	47
3.3.2	Sensitivität der Immunfluoreszenz	49
3.4	Auswertung des HMPV-Kollektivs.....	50
3.4.1	Korrelation von Subtyp und weiteren ermittelten Parametern	50
3.4.2	Messung von human CCL4/MIP-1 β	50
3.4.3	Immunantwort im zeitlichen Verlauf.....	51
3.5	Auswertung der Vergleichskollektive	52
3.5.1	Saisonale Verteilung der Proben.....	52
3.5.2	Zusammenhang zwischen Viruslast und Infektion	53
3.5.3	Korrelation zwischen IL-8-Konzentration und Virusinfektion.....	54
3.5.4	Zusammenhang zwischen IL-8-Konzentration und Viruslast	55

3.5.5	Korrelation zwischen Viruslast und Alter der Patienten	57
3.5.6	Korrelation von Virusinfektion und Klinik	59
3.5.6.1	Korrelation von klinischer Diagnose und Virusinfektion	59
3.5.6.2	Korrelation klinischer Parameter und Virusinfektion.....	60
4	DISKUSSION	63
4.1	Genetische Analyse der HMPV-Infektion	63
4.2	Zytokinbestimmung im ELISA.....	65
4.2.1	Interpretation der Ergebnisse des IL-8-ELISA.....	65
4.2.2	Interpretation des GCSF- und TNF- α -ELISA.....	65
4.3	Die Immunfluoreszenz.....	66
4.4	Das HMPV-Kollektiv.....	67
4.5	HMPV-, RSV- und Rhinovirusinfektion im Vergleich	67
5	ZUSAMMENFASSUNG	70
6	LITERATUR	71

1 Einleitung

1.1 Einleitung

Respirationstraktinfektionen sind unabhängig vom Lebensalter eine der häufigsten Krankheits- und Todesursachen weltweit. Meist werden diese durch Viren verursacht. Erkrankungen, die durch Respirationstraktviren ausgelöst werden, sind sogar die zweithäufigste Todesursache für Kinder bis zu einem Alter von 5 Jahren (93). Viele virale Krankheitsbilder sind der Menschheit schon lange bekannt. Bereits im „*Corpus Hippocraticum*“ finden sich Beschreibungen von Viruserkrankungen, wie zum Beispiel der Hautläsionen, die durch das *Herpes simplex* Virus hervorgerufen werden (1). Der Virusnachweis, des infektiösen Agens selber, ist allerdings erst mit den technischen Fortschritten, wie der Elektronenmikroskopie, der Zellkultur und molekularbiologischen Techniken, wie zum Beispiel der PCR durchführbar. Durch die Möglichkeit der Pathogenidentifikation wurde die Grundvoraussetzung für eine in Zukunft kausale Therapie dieser oft symptomatisch behandelten Krankheitsbilder geschaffen. Die Relevanz einer gezielten Therapie wird durch epidemiologische Fakten wie oben angeführt und im Folgenden unter anderem erläutert, deutlich.

1.2 Definition

Der Begriff „Virus“ wurde das erste Mal im ersten Jahrhundert vor Christus von Cornelius Aulus Celsus, einem römischen Enzyklopädisten, verwendet. Das Wort Virus stammt aus dem Lateinischen (Virus, Neutrum) und bedeutet so viel wie „Schleim“, „Gift“ oder „Saft“. Celsus bezeichnete den Tierspeichel, durch den die Tollwut übertragen wurde, als giftig.

Viren sind ultrafiltrierbare infektiöse Partikel, die sich extrazellulär verbreiten, zur Vermehrung aber den Zellstoffwechsel einer Wirtszelle benötigen, da sie keinen eigenen Stoffwechsel besitzen (obligate Zellparasiten). Sie infizieren die Zellen von Eukaryoten (Pilze, Pflanzen, Tiere und Menschen) und die von Prokaryoten (Bakterien und Archaeen).

1.3 Einteilung der Viren

Taxonomisch werden Viren anhand von fünf Hauptkriterien eingeteilt: Genomart, Symmetriefform der Capside, Vorhandensein bzw. nicht Existenz einer Membranhülle, Virusgröße und Ort der Virusvermehrung (Zellkern oder Zytoplasma der infizierten Zelle) (92).

1.4 Virale Erreger von Respirationstraktinfektionen

Viren, deren Zielzellen der Infektion die Zellen des Respirationstraktes sind, werden unter dem Begriff Respirationstraktviren zusammengefasst. Erreger dieser Infektionen entstammen aus verschiedenen Virusfamilien. Humanpathogenetisch relevant sind vor allem Viren aus der Familie der Paramyxoviren, Orthomyxoviren, Picornaviren, Adenoviren, Coronaviren und Parvoviren. In Tabelle 1 sind humanmedizinisch relevante Vertreter dieser Gruppe zusammengefasst.

Tabelle 1: humanmedizinisch relevante Pathogene von Respirationstraktinfektionen

Virusfamilie	Unterfamilie	Humanmedizinisch relevante Erreger
Paramyxoviren	Pneumovirus	Respiratorisches Syncytialvirus (RSV) Typ A, B
	Metapneumovirus	Humanes Metapneumovirus (HMPV) Typ A, B
	Respirovirus	Parainfluenzavirus 1, 3
	Rubulavirus	Mumpsvirus
		Parainfluenzavirus 2, 4
Orthomyxoviren	Influenza – A – Virus	Influenza – A – Viren
	Influenza – B – Virus	Influenza – B – Viren
	Influenza – C – Virus	Influenza – C – Viren
Picornaviren	Rhinovirus	Humane Rhinoviren
	Enterovirus	Humane Enteroviren, Serovare 68, 69
Adenoviren	Adenovirus	A-F, Serovare 1-51
Coronaviren	Coronavirus	229 E, OC 43, NL 63, HKU-1
Parvoviren	Bocavirus	Humanes Bocavirus

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit drei Erregern von Respirationstraktinfektionen, auf die im Folgenden genauer eingegangen werden soll: das humane Metapneumovirus (HMPV), das respiratorische Syncytialvirus (RSV) und das Rhinovirus.

1.5 Humanes Metapneumovirus

1.5.1 Entdeckung und taxonomische Einteilung

Im Jahr 2001 wurde von einer holländischen Forschungsgruppe ein neues Virus entdeckt, welches aus den Nasopharynxsekreten von 28 holländischen Kindern über einen Zeitraum von 20 Jahren isoliert werden konnte (139). Durch molekularbiologische Untersuchungen konnte das Virus in die Ordnung der Mononegaviren (Viren mit einem einzelsträngigem RNA-Genom in Negativstrangorientierung) eingeordnet werden. Die Mononegaviren umfassen vier Familien: die Rhabdoviren, Bornaviren, Filoviridae und Paramyxoviren. Letztere werden nochmal in zwei Untergruppen eingeteilt: die Paramyxoviren und die Pneumoviren (37). Zu den Pneumoviren zählen die Pneumoviren mit menschlichen (RSV) und tierischen (bovines RSV) Pathogenen und die Metapneumoviren. Pneumoviren und Metapneumoviren besitzen den gleichen Viruspartikelbau, unterscheiden sich aber im Virusgenomaufbau: Metapneumoviren fehlt das NS-1 und NS-2 Gen, denen Funktionen des Virus, sich der Immunabwehr des Wirtes zu entziehen, zugeschrieben werden. Ob diese Funktionen dem HMPV damit fehlen oder ob sie auf anderen Genombereichen des Virus kodiert werden, kann zurzeit noch nicht abschließend beurteilt werden. Der Genomaufbau von RSV im Vergleich zu HMPV ist in Abbildung 1 dargestellt. Tabelle 3 stellt die Funktion der Virusproteine zusammen. Bis zur Entdeckung des neuen Virus 2001 enthielt die Gruppe der Metapneumoviren nur tierische Pathogene (aviäres Metapneumovirus). Auf Grund der hohen genomischen Ähnlichkeit zum aviären Metapneumovirus, vor allem dem Serotyp C (dargestellt in Tabelle 2) (83) (138) wurde das Virus in die Gruppe der Metapneumoviren eingeordnet und „humanes Metapneumovirus“ (139) genannt.

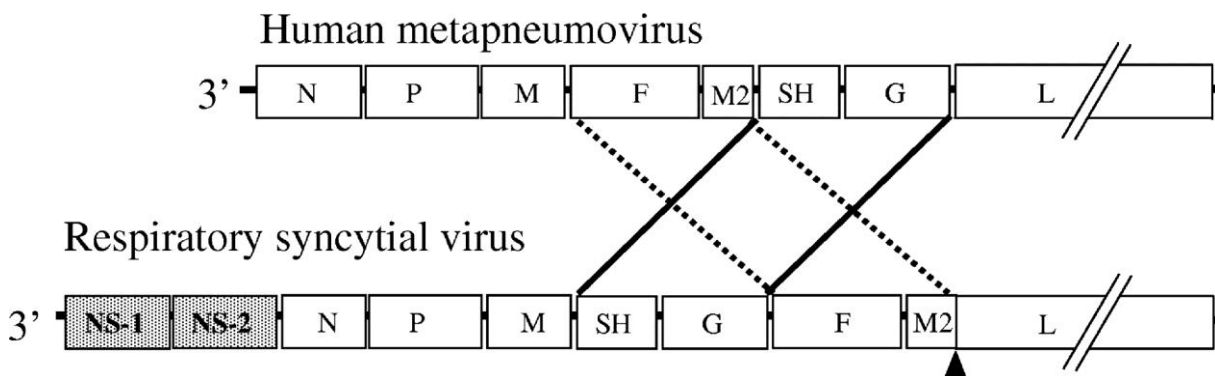


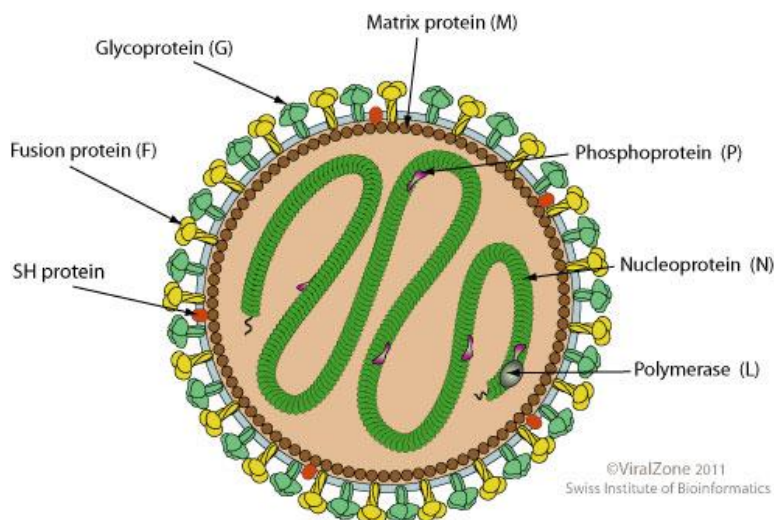
Abbildung 1: Schematische Darstellung der Genomstruktur der Pneumoviren im Vergleich. Dem HMPV fehlen die Proteine NS-1 und NS-2 (71).

Tabelle 2: Sequenzhomogenität zwischen HMPV und APV-C (138)

	Sequenzhomogenität zwischen HMPV und APV-C
N-Gen	88%
P-Gen	68%
M-Gen	76%
F-Gen	81%

1.5.2 Viruspartikelbau und Genomstruktur

Paramyxoviruspartikel haben einen Durchmesser von 150 bis 250 nm. Meist haben sie sphärische, selten filamentöse Form (92). Das HMPV – Viruspartikel ist sphärisch, umhüllt, mit einem Durchmesser von 150 nm. Abbildung 2 zeigt diesen Aufbau schematisch.

**Abbildung 2: Viruspartikelbau HMPV; Viruspartikelbau RSV analog (2)**

HMPV besitzt ein einzelsträngiges RNA-Genom in Negativ-Orientierung mit einer Größe von circa 13 kb. Das Genom enthält Gensequenzen, die für acht Virusproteine kodieren. Deren Abfolge auf dem Genom sind in Abbildung 3 dargestellt. Die Proteine sind von 3' in 5'-Richtung: das Nucleoprotein (N), das Phosphoprotein (P), das Matrixprotein (M), das Fusionsprotein (F), das Regulatorgen für Transkription und Replikation (M_2), das hydrophobe Membranprotein (SH), das Glykoprotein (G) und die Polymerase (L) (138).

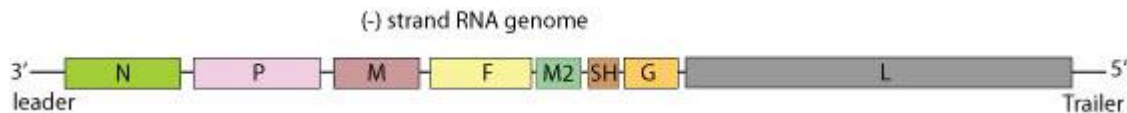


Abbildung 3: Genomstruktur HMPV (3)

Im Gegensatz zu anderen Paramyxoviren besitzen HMPV und RSV weder ein Protein mit Hämagglutinations- noch eines mit Neuraminidaseaktivität. Das Morbillivirus besitzt ein H-Protein, welches die Aufgaben der Adsorption an die Zielzelle und die der Hämagglutination erfüllt. Bei Rubula- und Avulaviren hat das HN-Protein zusätzlich noch die Funktion einer Neuraminidase. Bei HMPV und RSV erfolgt die Anheftung an die Zielzelle über das G-Protein. Bis auf Untersuchungen zum G-Protein gibt es wenige Studien zu der Funktion der Proteine des HMPV. Auf Grund der hohen genomischen Ähnlichkeit zum RSV ist auf diese überwiegend geschlossen worden (Tabelle 3).

Tabelle 3: Virusproteine und ihre Funktion. Man unterscheidet Strukturproteine, die im Virus vorkommen und Nicht-Strukturproteine (NS-1, NS-2), die nur während der Virusreplikation exprimiert werden, im neu gebildeten Virus aber nicht vorhanden sind. F-, G- und M-Proteine sind Membranproteine. N-, P- und L- Proteine sind Proteine des Nucleocapsids und an der Transkription der RNA beteiligt.

Virusproteine	Funktion	
	HMPV	RSV
F-Proteine	Fusion der Virusmembran mit der Zielzellmembran	
G	Adsorption des Viruspartikels an die Zelloberfläche	
M	Bildung der Viruspartikel und Verpackung der viralen RNA im Verlauf der Morphogenese; <i>Virus-Assembly</i>	
M ₂	Regulation von Transkription und Replikation; Förderung von Synthese durchgehender RNA-Stränge (Cofaktor Viruspolymerase L) (38)	
N	Interaktion mit RNA-Genom	
P	Ergänzung der Polymeraseaktivität des L-Proteins (145); Bindung an L- und N-Protein	
L	RNA-abhängige RNA-Polymerase; Bindung an N- und P- Proteine; Proteinkinase	
SH	Kodiert für hydrophobes Membranprotein	
NS-1	Nicht vorhanden	Vermittlung von Resistenz gegenüber Interferon α und β durch Inhibition der Interferongenexpression und damit der antiviralen Wirkung (79) (125)
NS-2	Nicht vorhanden	

Zum G-Protein gibt es einige interessante Erkenntnisse: Es zeigt eine hohe genetische Variabilität und durch Sequenzanalysen konnte nachgewiesen werden, dass es durch Veränderungen des Stopcodons zur Ausbildung von G-Proteinen unterschiedlicher Länge

kommt. In Studien konnten G-Proteine mit einer Länge von 217, 219, 228 und 236 Aminosäuren nachgewiesen werden (13). Die Autoren der Studie schließen daraus, dass das G-Protein des HMPV sich kontinuierlich entwickelt und die genetische Diversität sich ähnlich wie beim RSV in der Antigen-Variabilität widerspiegelt. Es scheint eine wichtige Rolle in der Produktion von neutralisierenden Antikörpern zu spielen (69). Für HMPV sind die Subtypen A und B mit den jeweiligen Genotypen A1 und A2 sowie B1 und B2 beschrieben (13) (17). Die jeweiligen Subtypen existieren parallel, jedoch scheint je nach Saison einer der Subtypen zu dominieren, sodass die Bildung einer Herdenimmunität erschwert ist (8) (9) und es zu Reinfektionen mit einem anderen Subtyp kommen kann. Die Infektion mit einem Subtyp stellt vermutlich keine Immunität für andere Subtypen her. In einem Case Report konnten sogar zwei verschiedene Stämme, die ein Kind infizierten, nachgewiesen werden (109). Antigendrift, wie er für Influenza A und B beschrieben ist, spielt bei HMPV vermutlich keine entscheidende Rolle. In einer Studie mit Proben über einen Zeitraum von 20 Jahren konnte durch Sequenzanalysen keine größere Aminosäurevariation nachgewiesen werden als zwischen den Virustypen in einem Jahr (140).

1.5.3 Epidemiologie

Epidemiologische Studien haben ergeben, dass es sich bei HMPV nicht um ein neues Virus handelt, das kürzlich von einem Tierreservoir auf die menschliche Bevölkerung übertragen wurde - ein aviärer Ursprung wird auf Grund seiner großen genomischen Ähnlichkeit zu APV-C angenommen - sondern, dass es schon über 50 Jahre grassiert (139). HMPV ist weltweit verbreitet und konnte bereits auf allen Kontinenten detektiert werden: in Europa (28) (42) (85), Asien (108) (31) (151), Australien (101) (84), Amerika (99) (27) (33) und Afrika (66) (40) (82). Obwohl HMPV-Infektionen in allen Altersgruppen vorkommen (34) (18), zeigt sich eine Häufung im Kindesalter mit einem Maximum im ersten Lebensjahr. Im höheren Lebensalter ab 65 Jahren lässt sich ein erneuter Anstieg der HMPV-Infektionen trotz hoher Seroprävalenzraten (siehe unten) verzeichnen. Dies zeigt, dass eine durchgemachte HMPV-Infektion keine vollständige Immunität hinterlässt. Diese Interpretation wird auch durch den Nachweis von Reinfektionen (109) unterstützt. Weitere Gruppen, in denen es gehäuft zu Infektionen kommt, sind Immunsupprimierte und Bewohner von Langzeitpflegeeinrichtungen (81). Studien zur Seroprävalenz von HMPV zeigen leichte Unterschiede. Allen gemeinsam sind aber zwei Aussagen: Nahezu alle Erwachsenen haben bis zum 25. Lebensjahr eine HMPV-Infektion

durchgemacht. Die Seroprävalenzraten ab einem Alter von fünf Jahren steigen sehr stark an, sodass bereits in diesem Alter eine Seroprävalenz von über 90% vorliegt (71) (124). In einigen Studien wurde eine Seroprävalenz von nahezu 90% in der Altersgruppe <5 Monate festgestellt. Im Verlauf fällt die Seroprävalenz kontinuierlich bis zu einem Alter von zwei Jahren, um ab da wieder anzusteigen. Dies lässt sich durch einen zunächst vorhandenen Nestschutz erklären (78). HMPV-Infektionen kommen das ganze Jahr über vor, jedoch mit saisonalen Maxima. In europäischen Breitengraden kommt es gehäuft in den Wintermonaten zu Infektionen, auf der Südhalbkugel im Sommer und in den Subtropen im Frühling (120) (108) (8) (9).

1.5.4 Klinik

Obwohl es keine eigenen Studien zum Übertragungsweg von HMPV gibt, ist eine Übertragung durch Aerosole und von Infektionsträgern kontaminierte Sekrete, wie bei RSV nachgewiesen, wahrscheinlich (57). Nosokomiale Infektionen (33) sind beschrieben und vor dem Hintergrund, dass die Therapie überwiegend noch symptomatisch und nicht kausal ist (s. unten), erscheinen Hygienemaßnahmen zur Vermeidung dieser, insbesondere eine sorgfältige Händehygiene, besonders wichtig (56) (58). Nach einer Inkubationszeit von vier bis sechs Tagen entwickelt sich die klinische Symptomatik. Asymptomatische Verläufe, v.a. bei jungen gesunden Erwachsenen sind nicht selten. Das Symptomspektrum einer HMPV-Infektion ist ähnlich einer RSV-Infektion und reicht von leichten Infektionen der oberen Atemwege bis hin zu beatmungspflichtigen Pneumonien. Eine Übersicht über das Spektrum ist in Tabelle 4 zu sehen.

Tabelle 4: Klinische Symptome und Verlauf von HMPV- und RSV-Infektionen von Kindern in der Notaufnahme. Der Virusnachweis erfolgte mittels PCR (116).

Klinisches Bild/ Verlauf	HMPV n = 41 Anzahl n (%)	RSV n = 117 Anzahl n (%)
„Common cold“	3 (7.3)	20 (17.1)
Pharyngitis	11 (26.8)	20 (17.1)
Akute Otitis media	5 (12.2)	10 (8.5)
Krupp	3 (7.3)	4 (3.4)
Akute Bronchitis	4 (9.8)	15 (12.8)
Giemen/ Brummen	10 (24.4)	30 (25.7)
Pneumonie	5 (12.2)	18 (15.4)
Hospitalisierung	2 (4.8)	16 (13.7)
Schulfehltag (range)	10 (3-15)	10 (3-12)

Seltener sind Symptome wie: Konjunktivitis, Diarrhoe, Erbrechen oder Hautausschlag (141). Eine Beteiligung von inneren Organen außerhalb des Respirationstraktes ist nicht beschrieben. Tierversuchsmodelle, in denen es nicht gelang HMPV in Proben außerhalb des Respirationstraktes nachzuweisen, stützen die Vermutung, dass HMPV-Infektionen auf den Respirationstrakt limitiert sind (76). Obwohl die Klinik einer HMPV-Erkrankung der einer RSV-Erkrankung sehr ähnlich ist, gibt es leichte Unterschiede: HMPV ist häufiger mit einem Fieberanstieg verbunden, während es bei RSV öfter als bei HMPV zu Rhinorrhoe kommt (14). Vergleicht man die Krankheitsschwere von HMPV und RSV, so scheint weniger das Virus mit dem das Individuum infiziert ist ausschlaggebend zu sein als die Immunkompetenz des Erkrankten. So kommt es zum Beispiel vor allem bei ehemaligen Frühgeborenen zu schweren Krankheitsverläufen (147) (148). Eine Koinfektion von RSV und HMPV führt ebenfalls zu schwereren Verläufen (126). Inwieweit eine HMPV-Infektion einen Risikofaktor zur späteren Entwicklung eines Asthma bronchiale darstellt, ist noch nicht abschließend geklärt. Einige Studien lassen hier einen starken Zusammenhang vermuten (45) (149). Im Gegensatz dazu stehen diejenigen wie zum Beispiel von Rawlinson et al., die keinen statistisch signifikanten Zusammenhang ergeben (118).

1.5.5 Nachweismethoden

Die späte Entdeckung von HMPV erklärt sich dadurch, dass dieses Virus sehr schwer durch klassische Zellkulturmethoden anzüchtbar ist. Erschwerend kommt hinzu, dass eine erfolgreiche Anzucht nur selten durch einen cytopathischen Effekt (im Falle von HMPV: Ausbildung von Polykaryocyten) imponiert. Bei Fehlen dieses CPE muss das Vorhandensein des Virus in der Zellkultur durch PCR oder IFT nachgewiesen werden. Erst mit der Anwendung der letztgenannten molekularbiologischen Labormethoden gelang auch der Nachweis von HMPV. Gerade wegen der aufwendigen Anzucht von HMPV in einer Zellkultur, benutzen viele Labore heute standardmäßig die PCR zum Nachweis, sodass eine Reihe von Versuchsprotokollen mittlerweile etabliert ist. Für serologische Untersuchungen stehen ELISA zur Verfügung (im Laufe der Infektion werden IgM-, IgA- und IgG-Antikörper gebildet).

1.5.6 Therapie

Zurzeit ist die Behandlung einer HMPV-Infektion noch supportiv, da eine kausale Therapie bis jetzt nicht existiert. Bei besonders schweren Krankheitsverläufen werden Ribavirin und Immunglobuline eingesetzt, welche bisher als Therapeutika bei schweren RSV-Verläufen zugelassen sind. Diese Substanzen scheinen in ihrer antiviralen Aktivität bei HMPV eine vergleichbare Wirkung wie bei RSV zu haben (152). Die Entwicklung eines HMPV-Impfstoffes ist in Arbeit. In einem Tiermodell konnte eine protektive Wirkung von einer Immunisierung mit einem lebend-attenuierten bovinen Parainfluenzavirus Typ 3, das das HMPV F-Gen enthält, nachgewiesen werden (135). Ein weiterer Ansatz ist die Immunisierung mit einem genetisch veränderten HMPV-Virus. Eine amerikanische Forschungsgruppe hat Tierversuche mit HMPV-Viren gemacht, bei denen das SH-, G- oder M2-Gen ausgeschaltet wurde und letztere beide als potentielle Impfstoffkandidaten detektiert (16).

1.6 Respiratorisches Synzytialvirus

1.6.1 Entdeckung und taxonomische Einteilung

1956 konnte aus Schimpansen, die an Schnupfen litten, ein Virus isoliert werden, das auf Grund der damit assoziierten Klinik *chimpanzee coryza agent* (CCA) genannt wurde (97). Zunächst war unklar, ob es sich dabei um ein rein tierisches Pathogen handelt. Eine kreuzweise Übertragung vom Menschen auf das Tier und umgekehrt wurde nach der Erkrankung eines Tierpflegers vermutet. Bereits ein Jahr später wurde die humanpathogene Potenz durch die Isolation des gleichen Virus aus den Rachenabstrichen von zwei erkrankten Kindern gezeigt (25). Das Virus wurde in Respiratorisches Syncytialvirus (RSV) umbenannt, was seine Klinik (verursacht Respirationstraktinfektionen, siehe unten) und seine Laboreigenschaften (Syncytienbildung in vitro) in einem Namen vereint. RSV gehört zu den Paramyxoviren, Subfamilie Pneumoviren und Genus Pneumovirus (siehe auch 1.5.1) (37).

1.6.2 Viruspartikelbau und Genomstruktur

Der Viruspartikelbau des RSV ist analog zu dem des HMPV (s. 1.5.2 und Abbildung 2). Es ist ein sphärisches, umhülltes Virus mit einem Durchmesser von 120-300 nm. RSV hat ein einzelsträngiges RNA-Genom in Negativ-Orientierung, welches circa 15 kb groß ist und zehn Gensequenzen enthält, die für elf Virusproteine kodieren. Die Abfolge der Gensequenzen ist in Abbildung 4 dargestellt: Von 3' in 5'- Richtung folgen auf die Sequenzen für das Nicht-Struktur-Protein eins und zwei (NS1 und NS2), die für das Nukleoprotein (N), das Phosphoprotein (P), das Matrixprotein (M), das hydrophobe Membranprotein (SH), das Glykoprotein (G), das Fusionsprotein (F), das Regulatorgen für Transkription und Replikation (M2) und die Polymerase (L). M2 hat zwei überlappende offene Leserahmen und kodiert für zwei verschiedene Proteine M2-1 und M2-2. Die Funktion der Virusproteine ist in Tabelle 3 zusammengestellt.

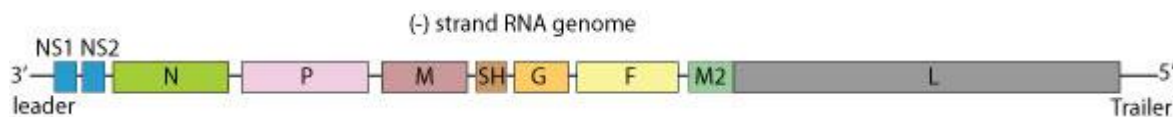


Abbildung 4: Genomstruktur RSV (4)

Im Vergleich zum HMPV-Genom fällt eine leichte Veränderung der Abfolge der Gensequenzen auf, welche in Abbildung 1 zu sehen ist. Für RSV sind zwei Subtypen (98) bekannt, die sich vor allem im G-Protein unterscheiden. Diese Subtypen A und B haben wiederum verschiedene Untertypen (10) (131) (132). Die Subtypen A und B zirkulieren zeitgleich, jedoch dominiert je nach Saison einer der Typen (10).

1.6.3 Epidemiologie

RSV-Infektionen sind ein bedeutendes infektiologisches Problem im Kleinkindesalter. Auffälligerweise sind vor allem Kinder im Alter von sechs Wochen bis sechs Monaten betroffen, vorwiegend Kinder im zweiten Lebensmonat, obwohl diese passiv durch ihre Mutter spezifische gegen RSV gerichtete Antikörper pränatal erhalten. Dies wirft Zweifel über die Wirksamkeit eines Nestschutzes für RSV auf. Bis zu einem Alter von 6 Monaten fallen die Antikörper bis unter die Nachweisgrenze und steigen dann durch durchgemachte Infektionen wieder an (107). Im Alter von zwei Jahren sind bereits über 95% der Kinder seropositiv für RSV. Bei älteren

Patienten und Patienten mit eingeschränktem Immunsystem oder schwerwiegenden Grunderkrankungen, vor allem Herz- und Lungenerkrankungen, spielt RSV wieder eine zunehmende Rolle (36). RSV-Infektionen treten global auf und können prinzipiell das ganze Jahr über vorkommen. In europäischen Breiten sind sie aber im Winter bis ins Frühjahr hinein sehr häufig zu finden und im Sommer nur in Ausnahmen (96). In einigen Studien wurde gezeigt, dass eine durchgemachte RSV-Infektion für ein späteres Asthma bronchiale prädisponiert (128) (129) (103).

1.6.4 Klinik

Die Klinik der RSV-Erkrankung ist unter 1.5.4 und in Tabelle 4 vergleichend zur HMPV-Erkrankung dargestellt.

1.6.5 Nachweismethoden

Heute wird zum Nachweis einer RSV-Infektion regelhaft die RT-PCR genutzt, weil diese Methode viele positive Eigenschaften vereint: Zum einen hat sie eine hohe Spezifität und eine hohe Sensitivität (35) (136) und zum anderen können durch die Verwendung von zusätzlichen *Primern* Subtypen direkt unterschieden werden. Ein weiterer Vorteil ist, dass in einem Testvorgang darüber hinaus noch die Viruslast und andere respiratorische Virusinfektionen nachgewiesen werden können (65) (137) (20). Zum Antigennachweis stehen außerdem auch ELISA und die Virusisolierung zur Verfügung. Der typische cytopathische Effekt (Abbildung 5), den RSV in einer Zellkultur hervorruft, ist unter anderem für seine Benennung verantwortlich. Während einer RSV-Infektion werden IgM-, IgG- und IgA-Antikörper gebildet, die durch ELISA und Immunfluoreszenz detektiert werden können. Mit Hilfe neutralisierender Antikörper gegen das G-Protein lassen sich die Subtypen A und B unterscheiden. Diagnostisch haben diese AN-Nachweise heutzutage aber keine Bedeutung mehr.

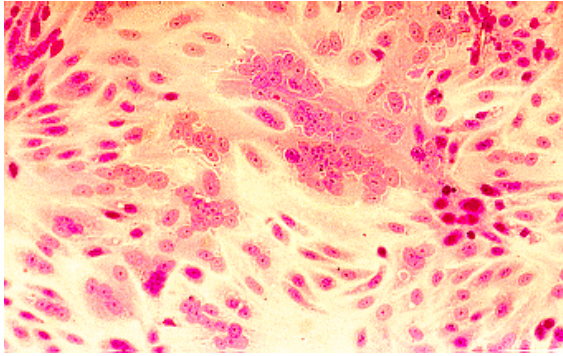


Abbildung 5: Cytopathischer Effekt von RSV: Syncytienbildung in Zellkultur (5)

1.6.6 Therapie

Bis heute existiert keine kausale Therapie (Impfung oder Pharmakotherapie) für RSV-Infektionen. Supportive Maßnahmen, wie unter anderem Fieberkontrolle und Kontrolle des Flüssigkeitshaushaltes sind von primärer Bedeutung (104). Viele pädiatrische Patienten benötigen darüber hinaus keine weitere Therapie. Bei schwerwiegenden klinischen Verläufen kann der zusätzliche Einsatz von Bronchodilatoren, Kortikosteroiden, Antibiotika und Ribavirin als einzige spezifische Therapie versucht werden. Die Studienlage zum therapeutischen Einsatz von Kortikosteroiden ist uneinheitlich. De Boeck et al (29) fanden keine Verbesserung der klinischen Symptomatik. Demgegenüber zeigte eine im Jahr 2000 erschienene Metaanalyse eine kleine, aber statistisch signifikante Milderung der klinischen Symptomatik und Verkürzung der Symptombdauer, sowie des Krankenhausaufenthaltes durch Kortikoide (46). Die Datenlage zum Benefit des Einsatzes von Bronchodilatoren, Antibiotika und Ribavirin ist ähnlich widersprüchlich, sodass es für den Einsatz dieser Substanzen keine generelle Empfehlung gibt. Es bleibt eine Einzelfallentscheidung. Die frühzeitige Therapie mit Ribavirin scheint die Inzidenz schwerwiegender reaktiver Atemwegsinfekte im Verlauf zu senken (32). Für Risikogruppen stehen zwei Prophylaxemöglichkeiten zur Verfügung, die von der American Academy of Pediatrics (AAP) empfohlen werden: Palivizumab (Synagis) und intravenös verabreichbares RSV Immunglobulin (RSV-IG [RespiGam]) (90). Die DGPI empfiehlt in ihren Leitlinien mittlerweile ebenfalls den Einsatz von Palivizumab bei Frühgeborenen und anderen Neugeborenen mit Risikofaktoren wie zum Beispiel angeborenen Herzerkrankungen.

1.7 Rhinovirus

1.7.1 Entdeckung und taxonomische Einteilung

Das Rhinovirus konnte im Jahr 1956 von zwei unabhängigen Forschungsgruppen isoliert werden (110) (115). In den darauffolgenden Jahren wurden in kurzen Zeitabständen viele Subtypen entdeckt, sodass eine einheitliche Klassifikation notwendig wurde, welche 1967 durch ein von Kapikian und seinen Kollegen organisiertes Kooperationsprogramm eingeführt wurde (72). Rhinoviren gehören zur Familie der Picornaviren („kleine“ (pico)-RNA- Viren), Genus Rhinovirus (142). Mittlerweile sind über 100 Subtypen des Rhinovirus bekannt. Man unterscheidet je nach Rezeptorbindung eine *major group* (binden an das ICAM-1-Molekül; 90 Rhinoviren) und eine *minor group* (binden an den LDL-Rezeptor). Ausnahmen sind die Typen 54 und 89, die über Heparansulfat mit den Wirtszellen interagieren.

1.7.2 Viruspartikelbau und Genomstruktur

Der Rhinoviruspartikelbau und die Genomstruktur konnten in den Jahren 1984 und 1985 aufgedeckt werden (121) (130). Rhinoviren sind nicht-umhüllte Partikel mit einem Durchmesser von ca. 30 nm. Das Viruskapsid besteht aus einem dichtgepackten ikosaedrischen Arrangement von 60 Protomeren, die jeweils aus 4 Polypeptiden bestehen: VP1, VP2, VP3 und VP4. VP1-3 liegen an der Außenseite und VP4 an der Innenseite. Schematisch ist dieser Aufbau in Abbildung 6 dargestellt.

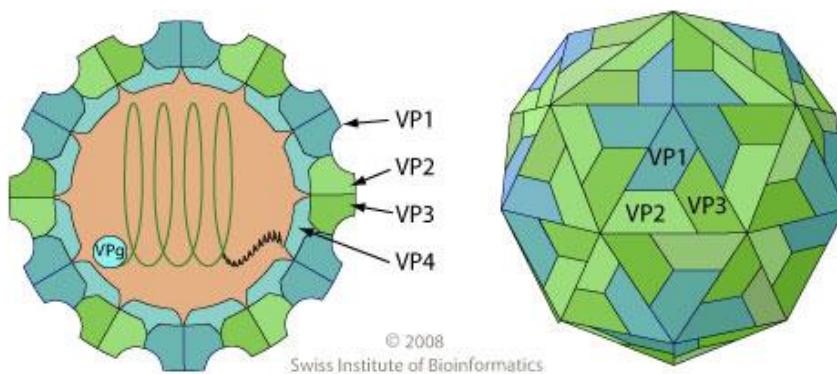


Abbildung 6: Viruspartikelbau Rhinovirus (6)

Das Rhinovirus besitzt ein einzelsträngiges RNA-Genom in Positiv-Strangorientierung mit einer Länge von 7.2-8.5 kb (zum Beispiel bei Rhinovirus Typ 14: 7209 kb). Das 3'-Ende des Genoms ist polyadenyliert und am 5'-Ende befindet sich das virale, genomassoziierte Protein (kurz: Vpg). Das Genom enthält einen großen offenen Leserahmen, welcher für ein Vorläufer - Polyprotein kodiert. Dieses Polyprotein kann in drei Abschnitte eingeteilt werden, die in Abbildung 7 mit P1-P3 bezeichnet sind. Es wird durch die Aktivität der Proteasen 2A und 3C in verschiedene Bestandteile gespalten. Die Region P1 kodiert für die späteren Strukturproteine VP1-4 und die Regionen P2 und P3 für die späteren Nicht-Strukturproteine, die mit dem Virusstoffwechsel assoziiert sind.

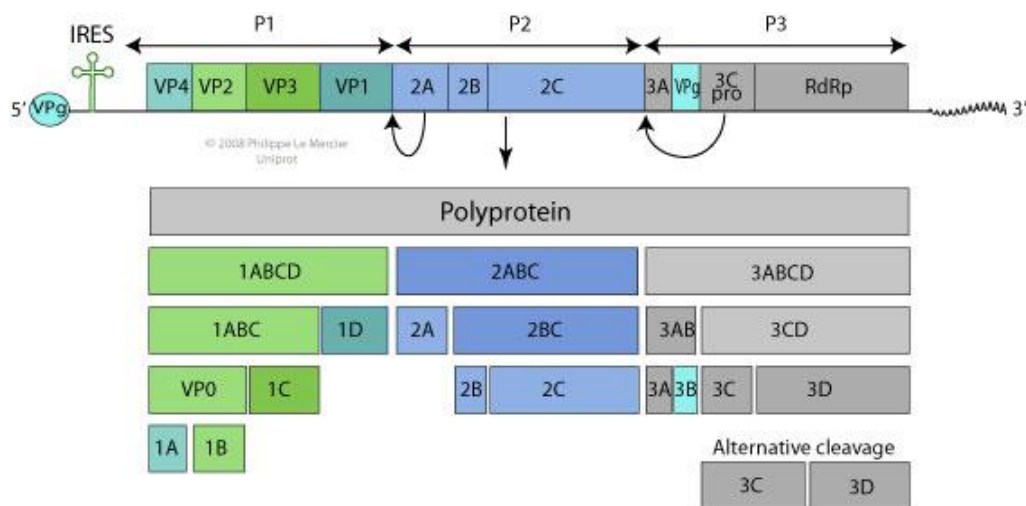


Abbildung 7: Genomstruktur Rhinovirus (7)

1.7.3 Epidemiologie

Rhinoviren sind weltweit verbreitet und eine der häufigsten Ursachen für Erkältungen (86). Im Schnitt macht jeder Mensch ein bis drei Rhinovirusinfekte pro Jahr durch (92). Zu Rhinovirusinfektionen kommt es zeitlich gesehen das ganze Jahr über mit Häufigkeitsgipfeln im Frühjahr und im Herbst (93) (94). Eine Ursache für diese Häufungen sind weniger die kälteren Temperaturen, sondern eher sich ändernde Lebensumstände in diesen Zeiträumen, wie zum Beispiel der Wiederbeginn der Schule nach den Sommerferien. In Studien konnte gezeigt werden, dass Freiwillige, die Kälte ausgesetzt wurden, keine erhöhte Anfälligkeit für eine Rhinovirusinfektion hatten (30), sodass der Begriff „Erkältung“ oder im Englischen „*common cold*“ eher irreführend ist. Rhinovirusinfektionen kommen in allen Altersgruppen (95) vor und

beginnen bereits in der frühen Kindheit, dies wird auch in den Seroprävalenzraten der Rhinovirusantikörper wiedergespiegelt. Die Seroprävalenz nimmt in Kindheit und Jugend rasch zu und bleibt dann bis ins hohe Alter relativ konstant (50). Von ökonomischem Interesse sind Rhinovirusinfektionen auf Grund der damit assoziierten relativ hohen Anzahl an Arbeitsausfällen (74).

1.7.4 Klinik

Rhinoviren sind stabil gebaut und relativ resistent gegenüber Desinfektionsmaßnahmen. Die Infektion mit Rhinoviren erfolgt oftmals indirekt durch Kontakt mit kontaminierten Oberflächen, wie Türklinken (52) und Händen (54). Deshalb ist eine sorgfältige Händehygiene eine der effektivsten Maßnahmen zur Prophylaxe. Nach einer Inkubationszeit von ein bis zwei Tagen kommt es zur Entwicklung von Atemwegserkrankungen, die meist auf die oberen Atemwege limitiert und in der Regel nach einer Woche abgeklungen sind, aber in manchen Fällen bis zu zwei Wochen und länger andauern können (53). Rhinovirusinfektionen können vor allem bei Erwachsenen asymptomatisch verlaufen (111). Eine Übersicht typischer Symptome bei einer Rhinovirusinfektion zeigt Tabelle 5.

Tabelle 5: Klinische Symptome einer Rhinovirusinfektion nach Rao et al. (117)

Symptome	Anteil in % (Patienten n = 139)
Fieber	15
Niesen	55
Rhinorrhoe	75
Nasale Obstruktion	45
Halsschmerzen	80
Husten	48
Kopfschmerzen	54
Malaise	52
Kältegefühl	10

Bekannte Komplikationen einer Rhinovirusinfektion sind die Exazerbation eines Asthma bronchiale (47) (118) und bei bakterieller Superinfektion eine Sinusitis und eine Otitis media (59) (63) (114) (26) (62). Obwohl Rhinoviren oft eine eher harmlose Klinik zugeschrieben wird, gibt es immer mehr Berichte über schwere Infektionen der unteren Atemwege, wie Pneumonien (67) (75) (80), die in einigen Berichten mit Rhinovirustypen der Gruppe C assoziiert sind (153).

1.7.5 Nachweismethoden

Die Diagnose einer Rhinovirusinfektion wird meist klinisch gestellt, wobei eine Differenzierung zwischen den einzelnen Respirationstraktviren auf Grund der von ihnen verursachten ähnlichen Symptomatik (51) schwer ist. Ist der sichere Nachweis einer Rhinovirusinfektion gewünscht, so ist dies labormedizinisch durch Zellkultur und heutzutage viel häufiger und empfindlicher durch molekularbiologische Methoden (PCR) möglich. In der Zellkultur tritt ein klassischer CPE in der Regel nach zwei bis sechs Tagen auf. Wegen der vielen Subtypen und der damit verbundenen großen Anzahl von Virusantigenen ist ein serologischer Nachweis zum Beispiel durch einen Neutralisationstest nur möglich, wenn der infizierende Subtyp bekannt ist oder ein System von sich überschneidenden Antiserumpools benutzt wird (73). Dies ist sehr aufwendig und wird daher in der Routine nicht benutzt, sondern dient nur epidemiologischen Zwecken.

1.7.6 Therapie

Rhinovirusinfektionen werden symptomatisch behandelt. Angesichts der zahlreichen Subtypen gestaltet sich die Entwicklung eines Impfstoffes schwierig, sodass bis heute noch keiner vorliegt (106). Durch Pleconaril kann die Infektionsdauer reduziert werden, jedoch steigt das Risiko der Selektion resistenter Subtypen, sodass dies aktuell keine Standardtherapie darstellt (112) (61). Eine Infektion kann durch die intranasale Gabe von Interferon verhindert werden (60). Bedenkt man aber die Nebenwirkungen einer Interferontherapie (Schleimhautschäden etc.) im Vergleich zu der häufig harmlosen Klinik einer Rhinovirusinfektion, ist dies nur begründeten Einzelfällen vorbehalten.

1.8 Immunologie

1.8.1 Zytokine

Die Infektion von Zellen durch Viren löst eine Immunreaktion aus, in deren Folge es zur Ausschüttung von Zytokinen kommt. Diese Arbeit beschäftigt sich vor allem mit vier Zytokinen, die im Nachfolgenden genauer erläutert werden sollen: IL-8, G-CSF, TNF- α und CCL4. Zytokine sind Regulatorproteine für Zellproliferation und Zellwachstum und Mediatoren für Immunreaktionen. Nach ihrer Funktion kann man fünf Hauptgruppen unterscheiden: Interleukine, Chemokine, Interferone, Tumornekrosefaktoren und Kolonie-stimulierende Faktoren. Interleukine vermitteln, wie die wörtliche Übersetzung des Namens sagt, die Kommunikation zwischen Leukozyten zur gerichteten Abwehr von Infektionserregern und Tumorzellen. Durch Chemokine werden gezielt Abwehrzellen mit passenden Rezeptoren an den Ort der Infektion gelockt (Chemotaxis). Interferone induzieren über die Bindung an ihren spezifischen Rezeptor über den JAK-STAT-Signalweg die Proteinsynthese und entfalten so ihre Wirkung: Es kommt zur vermehrten Bildung von antiviralen Proteinen (u.a. Caspasen) und durch die verstärkte Synthese von Faktoren, die der Infektabwehr dienen, stehen die zellulären Organellen zur Virusproteinsynthese weniger zur Verfügung, was den antiviralen Effekt zusätzlich verstärkt. Tumornekrosefaktoren sind Modulatoren für vielfältige Reaktionen. Sie induzieren u.a. Apoptose, Zelldifferenzierung und –proliferation. Als Kolonie-stimulierende Faktoren bezeichnet man Zytokine, die die Ausdifferenzierung einer pluripotenten Stammzelle zu einer Endzelle der Erythropoese, Thrombopoese oder Leukopoese fördern.

1.8.1.1 CCL4/MIP-1 β

In Kooperation mit der Kinderklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf wurde in einigen der in dieser Arbeit untersuchten Proben CCL4/MIP-1 β bestimmt. Dabei handelt es sich um ein Chemokin aus der CC-Gruppe. Chemokine werden in vier Hauptgruppen, je nach der Anzahl und Position ihrer Cysteinreste am Amino-Ende des Proteins eingeteilt (155). Die Abkürzung CCL4 steht für Chemokine (C-C Struktur) Ligand 4, Synonym MIP-1 β (*Macrophage inflammatory protein-1 β*). CCL4 wirkt chemotaktisch auf viele Zellen des Immunsystems (24). In einigen

Studien konnte bereits eine Ausschüttung von CCL4 bei an RSV erkrankten Kindern nachgewiesen werden (89) (15) (55).

1.8.1.2 IL-8

Im Jahr 1987 wurde von einer Forschungsgruppe um Marco Baggiolini an der Universität von Bern Interleukin-8 (IL-8) entdeckt (12). IL-8 ist ein Chemokin der CXC-Gruppe und wird vor allem von Monozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und Epithelzellen ausgeschüttet. Seine Hauptaufgaben sind die Chemotaxis von Leukozyten (vor allem neutrophiler Granulozyten) und die Angiogenese (11). Interleukin-8 konnte schon in zahlreichen Studien in Proben von HMPV- und RSV- Erkrankten detektiert werden (77). In Studien konnte gezeigt werden, dass Rhinoviren eine starke IL-8-Ausschüttung bewirken (154).

1.8.1.3 GCSF

Die Abkürzung GCSF steht für Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor. GCSF fördert die Bildung von Granulozyten aus unreifen Blutstammzellen (127) und wirkt aktivierend auf reife neutrophile Granulozyten (48). Diese wandern nach der Aktivierung durch Chemotaxis in Infektionsgebiete aus und sind dann an der Infektabwehr im Rahmen der unspezifischen Immunabwehr beteiligt. Bislang existieren noch wenige Studien über GCSF im Zusammenhang mit viralen Respirationstraktinfektionen. In einem Tierversuch mit Mäusen konnte eine Forschergruppe feststellen, dass HMPV im Gegensatz zu RSV eine geringere Ausschüttung von TNF- α (siehe unten), aber dafür einen größeren Anstieg von GCSF induzierte (49).

1.8.1.4 TNF- α

Der Tumornekrosefaktor alpha dient als Aktivitätsmodulator von vielen Zellen des Immunsystems. Er induziert die Apoptose (91), die Zellproliferation und Zelldifferenzierung, stimuliert die Phagozytose und wirkt chemotaxisfördernd auf neutrophile Granulozyten (119) (123). Darüber hinaus verstärkt er die Ausschüttung weiterer Zytokine und hat vielfältige Effekte auf den Stoffwechsel. Lokale Konzentrationserhöhungen von TNF- α rufen die klassischen Entzündungssymptome hervor, systemische können mit einer Schocksymptomatik

einhergehen. Bei RSV- und HMPV- Patienten konnte TNF- α in Nasopharynxaspiraten nachgewiesen werden (77). TNF- α wurde auch in einer großen Studie, in der serienweise nasale Lavagen bei Kindern einer Kindertagesstätte mit Infektionen der oberen Atemwege vorgenommen wurden, detektiert (102).

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Charakterisierung der HMPV-Subtypen und der Immunantwort der im Rahmen einer in den Jahren 2006-2008 durchgeführten prospektiven Pneumonie-Studie in Zusammenarbeit des Instituts für Virologie der HHU, dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der HHU, der Klinik für Allgemeine Pädiatrie, sowie der Pädiatrischen Station des EVK-Düsseldorf gewonnenen HMPV-positiven Nasopharynxaspirate. Als Vergleichskollektive zu den HMPV-positiven Patienten dienen RSV- und Rhinovirus- positive Patienten, die in einer vergleichbaren Altersverteilung zusammengestellt wurden. Im Wesentlichen sollen hierzu drei Fragen beantwortet werden:

1. Zu welchem Subtyp gehören die HMPV-Isolate und besteht eine Korrelation zwischen der Subtypenzugehörigkeit und den weiterhin ermittelten Parametern?
2. Wie gestaltet sich die im Nasopharynxaspirat bestimmte Immunantwort in den HMPV-positiven Proben im Vergleich zu der in RSV- und Rhinovirus- positiven Proben?
3. Besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen bezüglich der gemessenen Viruslast, der Schwere der klinischen Diagnose (oberer respiratorischer Infekt, Bronchitis, Bronchiolitis, Pneumonie) und weiteren klinischen Parametern (Leukozytenzahl, Körpertemperatur).

Als weiterer Aspekt soll die Frage beantwortet werden, ob es bei den Patienten, von denen zwei sequentielle HMPV-positive Materialien vorhanden sind, einen Zusammenhang zwischen den Veränderungen der Viruslast und den Zytokin-Konzentrationen gibt.

Zur Beantwortung werden folgende Untersuchungen durchgeführt:

Die RNA-Extraktionen der für HMPV positiv getesteten Nasopharynxaspirate sollen im N-Gen amplifiziert, anschließend sequenziert werden und ein phylogenetischer Stammbaum soll erstellt werden. In den Aspiraten werden die Zytokin-Konzentrationen für Interleukin 8 (IL-8), Granulozyten-Zell-Stimulationsfaktor (GCSF) und den Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) bestimmt. Zu diesem Zweck werden Zytokin-ELISAs mit Hilfe kommerzieller *Capture*- und *Detector*-Antikörper für die oben genannten Zytokine etabliert. Darüber hinaus wird in den Aspiraten ein qualitativer Nachweis virusspezifischer Antikörper durchgeführt. Die klinischen Parameter wurden mit Hilfe der Krankenakten der Patienten größtenteils bereits im Rahmen einer früheren Dissertation ermittelt.

2 Material und Methoden

2.1 Liste der verwendeten Materialien

2.1.1 Materialien arbeitsplatzübergreifend

- Sterile Einmalpipetten
 - 5 ml Pipettiervolumen, Cat. No. 4487, Costar, Corning, USA
 - 10 ml Pipettiervolumen, Cat. No. 4488, Costar, Corning, USA
 - 25 ml Pipettiervolumen, Cat. No. 4489, Costar, Corning, USA
- Einkanalpipetten
 - Gilson Pipetman, Frankreich
- Einkanalpipetten
 - Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- 8-Kanalpipette, Eppendorf-Research, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
 - 10 µl-100 µl
 - 30 µl-300 µl
- Pipettenspitzen
 - TipOne Filter Tip, Starlab-GMBH, Ahrensburg, Deutschland
 - 0.1-10 µl Bevelled Filter Tips, Cat. No. S 1121-3810
 - 1-20 µl Bevelled Filter Tips, Cat. No. S 1120-1810
 - 1-200 µl Bevelled Filter Tips, Cat. No. S 1120-8810
 - 101-1000µl Bevelled Filter Tips, Cat. No. S 1126-7810
 - TipOne Filter Tip, Starlab-GMBH, Ahrensburg, Deutschland
 - 1-200 µl Natural Bevelled Tips, Cat. No. S1111-1700
- 1.5 ml-Reaktionsgefäße
 - Safe-Lock Tubes 1,5 ml, Ord. No. 0030 120 086, Eppendorff AG, Hamburg, Deutschland

2.1.2 PCR

2.1.2.1 RNA-Extraktion

- EZ-1-Virus Mini Kit, Cat. No. 955134 Qiagen, Hilden, Germany

2.1.2.2 One-Step-RT-PCR

- *OneStep RT-PCR* Kit No. 210212 (100 reactions), Qiagen, Hilden, Deutschland
 - 5x *OneStep* RT-Puffer (Lot No 130161063)
 - *OneStep* Enzyme Mix (Lot No 130160642)
 - *RNase-free water* (Lot No 130161350)
 - dNTP PCR Nukleotid Mix, Cat. No. 11814362001, Lot. 12779120, 200µl, 10mM je dNTP, Roche Diagnostics GMBH Mannheim, Deutschland
 - *Primer*, 100 µM, Eurofins MWG Operon
 - HMPV-111s (5'-AGA GTC TCA GTA CAC AAT **MAA** AAG-3')

- HMPV-750 as (5'-TGC TTT GCT GCC TGT AGA TGA TGA G-3')

2.1.2.3 Amplifikation

- *PCR-Buffer* 10x conc. mit MgSO₄ für Pwo Pol., Cat. No. 11749021001, Lot. 13219600 und 12622400, Roche Mannheim, Deutschland
- Pwo DNA Polymerase 2x 250 U Ref.: 11644955001 Lot: 13363625, Roche Mannheim, Deutschland
- *Primer*, 100 µM, Eurofins MWG Operon
 - HMPV 114s (5'-AGA GTC TCA GTA CAC AAT MAA AAG RGA TG-3')
 - HMPV 442 as (5'-GCC ATT GTT TTY CTT GCY TC-3')
- dNTP PCR Nukleotid Mix, Cat. No. 11814362001, Lot. 12779120, 200µl, 10mM je dNTP, Roche Diagnostics GMBH Mannheim, Deutschland
- *RNase-free water*, Mat. No. 1012888, Lot. No. 130172003, Qiagen, Hilden, Deutschland

2.1.2.4 Gel

- Biozym DNA Agarose, Biozym Scientific GMBH, 31833 Hess. Oldensdorf, Deutschland
- Tris-Borate-EDTA Puffer 10 Konzentrat, Cat. No. T4415-4L, SIGMA-Aldrich-Chemie, München, Deutschland
- Ethidiumbromid (EtBr), Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
- 1 Kb *DNA-Ladder* Cat. No. 15615-016, Lot. No. 443423, Invitrogen, Carlsbad, USA
- Auftragspuffer: 0.25 % Bromphenolblau, 0.25 % Xylenecyanol und 30 % Glycerol ad H₂O

2.1.2.5 Aufreinigung von PCR-Produkten

- Qiaquick *PCR-Purification-Kit* (250), Cat. No. 28106, Qiagen, Hilden, Deutschland

2.1.3 Proteinbestimmung nach Bradford

- Albumin Fraktion V, Art. No. 8076.3, Carl Roth GMBH, Karlsruhe
- PBS= *Phosphate Buffered Saline* (Dulbecco A), Cat. No. BR0014G, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England
- Nunc-Immunoplate V 96 Maxisorp, No 449824, Nunc GMBH & Co. KG, Langenselbold, Deutschland
- Bradford-Reagenz: BIO-RAD Protein Assay Cat. No. 500-0006

2.1.4 IL-8-ELISA

- *Nunc-Immunoplate V 96 Maxisorp*, No 449824, Nunc GMBH & Co. KG, Langenselbold, Deutschland
- 1. Antikörper: *purified anti-cytokine capture AB*
 - Cat. No. 554716, Lot. 91416,500 µg/ml, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- 2. Antikörper: *biotinylated anti-cytokine detection AB*
 - Cat. No. 554718, Lot. 89211,500 µg/ml, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- Standard: Recombinantes humanes IL-8
 - Cat. No. 554609, Lot 63979, 20 µg, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- Beschichtungspuffer „*binding solution*“
 - M Na₂HPO₄; pH = 9.0

- Blockierungspuffer „*blocking buffer*“
 - Foetal Bovine Serum: Ref: 10270-106, Lot 41F3360K, GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, USA
 - PBS (s.o)
- Streptavidin HRP
 - Cat. No. 554066, Lot. 94987, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- *Blocking Buffer-Tween*
 - PBS s.o.
 - Tween 20, SERVA 37470, Heidelberg, Deutschland
- Substrat
 - TMB *Substrate Reagent Set*, Cat. No.: 555214 Lot.: 87397, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
 - Reagens A 51-2606KC
 - Reagens B 51-2607KC
- Waschpuffer
 - PBS s.o.
 - Tween s.o.
- Stopplösung
 - 0.1 M (53.55 ml Schwefelsäure in 1l dH₂O)

2.1.5 TNF- α -ELISA

- 1. Antikörper: *Purified Mouse Anti-Human TNF monoclonal Antibody*
 - Cat. No. 551220, Lot. 94546, 0.5 mg/ml, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- 2. Antikörper: *Biotin Mouse Anti-Human TNF*
 - Cat. No. 554511, Lot 95044, 0.5 mg/ml, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- Standard: Recombinantes humanes TNF
 - Cat. No. 554618, Lot 98766, 10 μ g/50 μ l, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- ELISA-Platten, Wannen, *Binding Solution*, *Blocking Buffer*, *Blocking-Buffer-Tween*, Waschpuffer, Streptavidin, Substrat und Stopplösung analog zu IL-8-Elisa

2.1.6 GCSF-ELISA

- 1. Antikörper: *Purified Rat Anti-Human GCSF monoclonal Antibody*
 - Cat. No. 551342, Lot. 0000034813, 1.0 mg/ml, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- 2. Antikörper: *Biotin Rat Anti-Human GCSF monoclonal Antibody*
 - Cat. No. 554670, Lot. 74640, 0.5 mg/ml, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- Standard: Recombinantes humanes GCSF
 - Cat. No. G 0407, Lot. 087K1576 , SIGMA-Aldrich-Chemie, München, Deutschland
- ELISA-Platten, Wannen, *Binding Solution*, *Blocking Buffer*, *Blocking-Buffer-Tween*, Waschpuffer, Streptavidin, Substrat und Stopplösung analog zu IL-8-Elisa

2.1.7 IgG-ELISA

- Immunglobulin G ELISA Kit
 - Ref. K6510, Lot. K 6510-080702, Immundiagnostik AG, Bensheim, Deutschland

2.1.8 Zellkultur

- Zellkulturflaschen
 - 175cm² Bodenfläche, Cat. No.159910, Nunc, Roskilde, Dänemark
 - 75cm² Bodenfläche, Cat. No. 90075, TPP, Trasadingen, Schweiz
 - 25cm² Bodenfläche, Cat. No. 90025, TPP, Trasadingen, Schweiz
- Zentrifugenröhrchen
 - 15ml Gefäß, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
 - 50ml Gefäß, Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
- 6-Well-Platten, Cat. No. 92406, TPP, Trasadingen, Schweiz
- Sterile Zellschaber
 - Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
- Neubauerzählkammer
 - Welabo, Düsseldorf, Deutschland
- Zellkulturmedien
 - Sputasol; Oxoid, Hampshire, UK
 - DMEM: 500ml, Cat. No. 41966-029, GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, UK
 - IMDM: 500ml, *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*, Cat. No. BE12-726F, Bio Whittaker Europe, Verviers, Belgien
 - FCS: 500ml, Cat. No. 10270-106, GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, UK
 - Penicillin/Streptomycin: 100ml, 10000U/ml, Cat. No. 15140-122, GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, UK
 - Gentamycin: 10mg/ml, Cat. No. 15710-049 GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, UK
 - Trypsin-EDTA: 100ml, 0,5% Trypsin-EDTA, Cat. No. 25300-054, GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, UK
 - PBS: 500ml, DPBS-Puffer pH 7,3, Cat. No. 14190, GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, UK
 - DMSO: Dimethylsulfoxid, Cat. No. A994.2, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
 - Trypsin acetyliert; Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland

2.1.9 Immunfluoreszenz

- Objektträger für Immunfluoreszenztests, Acetonbeständig, 10 Felder (6 mm)
 - Ref. 75751, bio Mérieux sa 69280 Marcy l'Etoile, Frankreich
- *FITC-Conjugate goat Anti-Human-IgA- alpha chain specific*
 - Code. No. H 14101, Lot. 297429A, SIGMA-Aldrich-Chemie, München, Deutschland
- *FITC-Conjugate goat Anti-Human-IgG (Fc sp.)*
 - Code No. H 10001, Lot. 36021006, SIGMA-Aldrich-Chemie, München, Deutschland
- Evansblue/ PBS
 - 1% Stammlösung vom 2.3.1982
 - PBS s.o.

- *FA Mounting Fluid*, pH 7.2
 - Cat. No. 223291, Lot. 3100509, DIFCO, Bacto TM, Becton Dickinson and Co, Sparks, MD 21152 USA
- Deckgläser für Mikroskopie
 - 24x60 mm, Artikelnummer k12460, Engelbrecht, Edermünden, Deutschland

2.1.10 Geräte

- Gelkammer
 - Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- *Thermocycler*
 - Gene Amp PCR System 9600, Perkin Elmer, Norwalk CT, USA
- Photometer
 - Sunrise, Tecan, Crailsheim, Deutschland
- Zentrifuge
 - Centrifuge 5417C, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Zentrifuge, Zellkultur
 - Megafuge 1.0, Heraeus Instruments, Kleinostheim, Deutschland
- Lumi Imager
 - Lumi-Imager F1, Roche Mannheim, Deutschland
- Thermomixer
 - Modell Comfort, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Vortexer
 - VIBROFIX VF1 Electronic, Janke&Kunkel, IKA Labortechnik, Littau, Schweiz
- Power Supply
 - Consort E122, Consort, Turnhout, Belgien
- Magnetrührer
 - IKAMAG RH, Janke&Kunkel, IKA Labortechnik, Littau, Schweiz
- Werkbank
 - HERAsafe, Heraeus Instruments, Kleinostheim, Deutschland
- Vakuum-Pumpsystem
 - Pipetboy acu, IBS, Integra Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- Einfriercontainer
 - Nalgene Labware, Rochester, NY, USA
- Mikroskop
 - Zeiss Axiovert 40 CFL, Zeiss, Deutschland
 - Leitz, Wetzlar, Deutschland
- Waage
 - Mettler PC 2000, Mettler-GMBH, Giessen, Deutschland
- Inkubator
 - BBD-6220, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
- Digitalkamera
 - Canon Power Shot A620
- Nanodrop
 - Spektrophotometer, ND-1000 UV/Vis, Wilmington, USA

2.1.11 Software

- Magellan
 - Magellan V6.4, Tecan 2007, Crailsheim, Deutschland
- Sequenzen- und Stammbaum
 - BioEdit: Sequence Alignment Editor, Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA
- *Lumi-Software*
 - Lumianalyst 3.1.0, Roche Diagnostics GMBH, Mannheim, Deutschland
- Photos
 - Ulead Photo Explorer 8.0 SE BASIC, Corel Corporation, Ottawa, Kanada, USA
- Statistische Auswertung
 - SigmaPlot Version 10.0
- Phylogenetik: MEGA *Software package*, v.4 (Kumar et al.; 2004)

Geschützte Warennamen werden im Folgenden nicht besonders kenntlich gemacht.

2.2 Auswahl der Nasopharynxaspirate/Proben

Im Universitätsklinikum Düsseldorf wurde von November 2006 bis Oktober 2008 in Zusammenarbeit des Instituts für Virologie (HHU), dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene (HHU), der Klinik für Allgemeine Pädiatrie (HHU), sowie der pädiatrischen Station des EVK-Düsseldorf eine prospektive Pneumonie-Studie durchgeführt, in die 403 pädiatrische Patienten mit respiratorischen Infekten aufgenommen worden sind. Die Studiennummer des Ethikvotums lautete 2837. Alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proben stammten aus einem Zeitraum vom 13.12.2006 bis zum 14.07.2008. Untersuchungsmaterial war dabei Nasopharynxaspirat, das bei allen Patienten bei der Aufnahme entnommen wurde. Die Diagnostik der viralen Erreger wurde mit Hilfe einer von L. Bonzel (21) etablierten *Real-time-PCR* durchgeführt. Die verwendeten *Primer* und Sonden sind in Tabelle 7 angegebenen. Alle positiven Nachweise lagen als quantitative Ergebnisse (Kopien/ml) vor. Die in dieser Arbeit zusammengestellten drei Vergleichskollektive enthielten jeweils Proben von 30 Patienten, die positiv für das untersuchte Virus getestet wurden. Darüberhinaus wurden die drei Vergleichskollektive, wie die Abbildung 8 und die Tabelle 6 zeigen, mit gleicher Altersverteilung zusammengestellt.

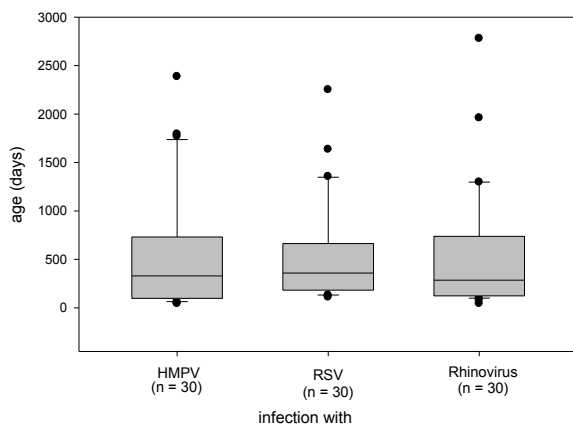


Abbildung 8: Altersverteilung der Vergleichskollektive

Tabelle 6: Altersverteilung der Patientenkollektive: *Kruskal-Wallis One Way of Variance on Ranks*

Gruppe	N	Median	Mittelwert	25%	75%
HMPV-Alter	30	329.000	550	99.000	688.000
RSV-Alter	30	359.000	525	185.000	638.000
Rhino-Alter	30	285.500	522	123.000	736.000

H = 0,818 mit 2 Freiheitsgraden (P = 0.664)

Tabelle 7: Verwendete *Primer* und Sonden für den Nachweis von Respirationstraktviren; Rhi-F, Rhi-R, Rhi-pr aus (20)

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Zielgen	Amplikonlänge
RSVA-F	TCTTAAATCTRAGCACAAATCACATTATC	G (4788-4817)	
RSVA-R	TGATGGCTGCAATTATAAGTGAAGTT	G (4839-4864)	
RSVA-pr	FAM-TGGCAATGATAATCTC-MGB	G (4823-4838)	77 bp
RSVB-F	TTTAAAATCTATAGCACAAATAGCACTATC	G (4789-4818)	
RSVB-R	TTATGGCTGCAATTATGAGAGAGGTT	G (4840-4865)	
RSVB-pr	FAM-TGGCAATGATAATCTC-MGB	G (4824-4839)	77 bp
HMPV A-F	GGGTCAGAGAGAGTACAGCAGATTC	N (277-301)	
HMPV A-R	CCCCAAAGAGTACGTTCTGGTT	N (336-357)	
HMPV A-pr	HEX-AACTCAGGCAGTGAAGTCCAAGYGGTYT-BHQ	N (307-334)	81 bp
HMPV B-F	AAACAATGGTGACTTTGCTAA AGGA	N (452-476)	
HMPV B-R	TTGGTGTGTCTGGTGCTGAAG	N (509-529)	
HMPV B-pr	FAM-TCATCAGGTAACATCCCACAAAACAGAGG-BHQ	N (478-507)	78 bp
Rhi-F	TGGACAGGGTGTGAAGAGC	5'NCR (396-414)	
Rhi-R	CAAAGTAGTCGGTCCCATCC	5'NCR (520-539)	
Rhi-pr	FAM-TCCTCCGGCCCCTGA ATG-BHQ	5'NCR (434-451)	144 bp

2.3 One-Step-RT-PCR

2.3.1 RNA-Extraktion aus den Nasopharynxspiraten

Alle Nasopharynxspirate wurden 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Zur Sekretverflüssigung wurde bei besonders zähen Materialien Sputasol in einem 1:1 Verhältnis hinzugegeben und erneut für 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Danach wurden zur Nukleinsäureextraktion 200 µl des Überstands abpipetiert. Eine Archivierung von Probenresten erfolgte als Rückstellprobe bei -80°C.

Die RNA-Extraktion erfolgte mit Hilfe des EZ-1-Virus Minikit. Dieses ermöglicht die Extraktion viraler DNA und RNA durch Verwendung von Reaktionskassetten mit einem Chemikaliengemisch (unter anderem Proteinase K und Isopropanol). Durch die Bindung der Virus-RNA bzw. -DNA an mit Silica beschichtete Magnetpartikel erfolgt die Extraktion automatisiert durch den EZ-1-BioRobot. Pro Aspirat wurden 60 µl Eluat gewonnen. 5 µl davon wurden je *Well* des PCR-Reaktionsstreifens für die anschließende *One-Step-RT-PCR* verwendet, das restliche Material wurde wie oben beschrieben ebenfalls archiviert.

2.3.2 Auswahl der *Primer*

Die Auswahl der *Primer* erfolgte analog zu einer Publikation von S. Viazov et al. (143). In ihrer Studie haben die Autoren ebenfalls eine Reverse-Transkriptions-PCR für HMPV mit anschließender Sequenzierung durchgeführt, um Aussagen über die Prävalenz und Klinik der HMPV-Infektion von Kindern in Deutschland und der genetischen Heterogenität von HMPV, das in den Patientenproben gefunden wurde, treffen zu können.

2.3.3 Umschreiben der RNA in cDNA und Amplifikation

Da das Humane Metapneumovirus ein RNA-Virus ist, musste dessen RNA zuerst in eine cDNA umgeschrieben werden, die dann in einer Polymerasekettenreaktion amplifiziert werden konnte. Für die cDNA-Synthese wurde der *backward Primer* 750as (5'-TGC TTT GCT GCC TGT AGA TGA TGA G-3') verwendet. Die Bildung der cDNA erfolgte in einem Schritt mit dessen Amplifikation. Zu dieser wurde der gleiche *Primer* wie zur cDNA-Synthese in Kombination mit dem *forward Primer* 111s (5'-AGA GTC TCA GTA CAC AAT **MAA** AAG-3') verwendet. Die fett gedruckten Buchstaben bezeichnen die Positionen, die zur Abdeckung von natürlichen Mutationen mit zwei oder mehr verschiedenen Basen besetzt sind („wobbles“). Das Reaktionsgemisch für die cDNA-Synthese und die ersten 30 Zyklen der Amplifikation ist in der nachfolgenden Tabelle angegeben. Alle Reagenzien (Tabelle 8) wurden in ein auf Eis gelagertes 1.5 ml Eppendorf-Hütchen im Instituts-eigenen DNA-freien *PCR-Master-Mix*-Raum pipettiert und dann auf die *Cups* des PCR-Streifens gleichmäßig verteilt. Der Einsatz des *One-Step Enzyme Mix* erfolgte nach Herstellerangaben. Die Probenzugabe mit einem Volumen von jeweils 5 µl erfolgte in einem anderen Raum unter laufender Werkbank.

Tabelle 8: Reaktionsgemisch *Reverse Transkription* und Amplifikation 1

	1x Ansatz (µl)	Konzentration
5 x <i>OneStep</i> RT-Puffer	10.0	--
dNTP-Mix	2.0	400 µM pro Nukleotid
HMPV-111s (10µM)	3.0	0.6 µM
HMPV-750 as (10µM)	3.0	0.6 µM
<i>OneStep</i> Enzym Mix	2.0	--
RNAse-freies Wasser	25.0	--
Gesamtvolumen	45.0	--

Bei jedem Ansatz wurde eine Negativkontrolle, die aus *aqua dest* bestand mitgeführt. Der *Thermocycler* wurde für die cDNA-Synthese und Amplifikation nach dem in Tabelle 9 aufgeführten Protokoll programmiert.

Tabelle 9: Thermocycler-Protokoll

	<i>Reverse Transkription</i>	Inaktivierung der RT	Denaturierung	Primerhybridisierung	Elongation	
Temperatur	50°C	95°C	94°C	55°C	72°C	72°C
Zeit	30 min	15 min	30 sec	30 sec	60 sec	10 min
Zyklenzahl	1	1	30			1

2.3.4 Zweite Amplifikation („Nestet PCR“)

Die Produkte der *One-Step-PCR* wurden in einer weiteren 30-zyklischen PCR amplifiziert, bei der ein anderes *Primerpaar* als in der ersten Amplifikation eingesetzt wurde. Als *forward Primer* diente der *Primer 114s* (5'-AGA GTC TCA GTA CAC AAT **MAA AAG RGA** TG-3'), *backward Primer* war der *Primer 442as* (5'-GCC ATT GTT TTY CTT GCY TC-3').

Tabelle 10: Codierung der Wobbles

M	R	W	S	Y	K	V	H	D	B	N
AC	AG	AT	GC	CT	GT	AGC	ACT	AGT	GCT	AGCT

Die Pipettierung des Reaktionsgemisches für die zweite PCR erfolgte im *Master-Mix*-Raum in ein auf Eis gelagertes 1.5 ml Eppendorf-Hütchen. Zu diesem Ansatz wurden unter einer anderen laufenden Werkbank pro Vertiefung des PCR-Streifens 2 µl der Produkte der ersten PCR hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch und das *Thermocycler*-Protokoll für die zweite PCR finden sich in Tabelle 11 und Tabelle 12.

Tabelle 11: Reaktionsgemisch Amplifikation 2

	1x Ansatz (µl)	Konzentration
10x Puffer	5.0	--
Pwo-Polymerase	0.5	2.5 U
HMPV 114s (10 µM)	3	0.6 µM
HMPV 442 as (10 µM)	3	0.6 µM
PCR Nukleotid Mix	2	400 µM pro Nukleotid
Aqua dest	34.5	--
Gesamtvolumen	48.0	--

Tabelle 12: Thermocycler-Protokoll 2

		Denaturierung	Hybridisierung	Elongation	
Temperatur	95°C	95°C	55°C	72°C	72°C
Zeit	10 min	30 sec	30 sec	120 sec	10 min
Zyklenzahl	1	30			1

2.3.5 Nachweis der Amplifikate im Agarosegel

Vor der Sequenzierung wurde der Erfolg der PCR durch den Nachweis der richtigen Amplifikate im Agarosegel überprüft. Dazu wurde aus 0.5 g Agarose, 50 ml TBE und 2 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) ein Agarosegel gegossen und bei Raumtemperatur bis zum Festwerden des Agars inkubiert. Einzelne Ethidiumbromid-Moleküle interkalieren zwischen die Basen der DNA, dadurch erhöht sich die Fluoreszenz der Substanz bei Anregung mit UV-Licht. Stellen an denen sich Nukleinsäuren befinden, leuchten im Gegensatz zu den nukleinsäurefreien im Agarosegel hell auf. Die Amplifikate wurden ebenso wie die kB-Leiter im Verhältnis 6:1 mit dem Laufpuffer auf das Gel aufgetragen, bei einer Spannung von 35 mV elektrophoretisch aufgetrennt und mit dem *Lumi Imager* dokumentiert.

2.3.6 Aufreinigung der PCR-Produkte zur Sequenzierung

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit einem kommerziellen Kit (Qiaquick *PCR Purification Kit*). In einem 1.5 ml Eppendorf-Gefäß wurde die Probe mit dem Puffer PBI (mit Guanidinhydrochlorid und Isopropanol) im Verhältnis 1:5 gemischt um die DNA zu fällen. Zur DNA-Bindung an die Membran der QIAquicksäule, wurde das Proben-Puffer-Gemisch in eine QIAquicksäule pipettiert und 60 Sekunden bei 10000 g zentrifugiert. Die durchgeflossene Flüssigkeit wurde verworfen und die Säule durch Zugabe von 750 µl Waschpuffer PE (Ethanolbasis) und Zentrifugation bei 10000 g für 60 Sekunden gewaschen. Nach erneutem Verwerfen der durchgeflossenen Flüssigkeit und Zentrifugieren bei 10000 g für 60 Sekunden, erfolgte die Elution der an die Säule gebundenen DNA. Hierzu wurden 30 µl Puffer EB (Tris-Cl) auf die Säule pipettiert, eine Minute gewartet und im Anschluss daran wurde die Säule für weitere 60 Sekunden bei 10000 g zentrifugiert. Der DNA-Gehalt der Eluate wurde mit Hilfe eines Spektral-Photometers bei 260 nm Wellenlänge gemessen. Zur Sequenzierung wurden die Eluate an die *Sequenzierfacility* des Biomedizinischen Forschungszentrums der Heinrich-Heine-

Universität Düsseldorf gegeben. Dieses verwendet zur Sequenzierung einen ABI-8-Kanal-Kapillar-Sequenzierer.

2.4 Proteinbestimmung nach Bradford

2.4.1 Vorbereitung der Proteinstandards

Aus PBS und FBS wurden Mischungen mit 0 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 60 µg/ml, 80 µg/ml und 120 µg/ml als Endkonzentration hergestellt. Diese Protein-PBS-Gemische wurden als Proteinstandards für die Proteinbestimmung nach Bradford (23) eingesetzt.

2.4.2 Durchführung der Proteinbestimmung

In eine unbeschichtete 96-Loch-Mikrotiterplatte wurde in jede Vertiefung 200 µl des zuvor 1:5 in H₂O verdünnten Bradford-Reagenz (Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau) pipettiert und jeweils 50 µl Standard beziehungsweise Probe hinzu gegeben. Die Proben wurden im Doppelansatz bestimmt.

Tabelle 13: Pipettierschema

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD 1 (0)	Pr 1	Pr 1	Pr 2	Pr 2	...						
B	STD 2 (20)	Pr 1	Pr 1	Pr 2	Pr 2							
C	STD 3 (40)	Pr 1	Pr 1	Pr 2	Pr 2							
D	STD 4 (60)	Pr 1	Pr 1	Pr 2	Pr 2							
E	STD 5 (80)	Pr 1	Pr 1	Pr 2	Pr 2							
F	STD 6 (120)	Pr 1	Pr 1	Pr 2	Pr 2							
G												
H												

Das ungebundene, kationische Bradford-Reagenz (rot) bildet mit den Seitenketten der Proteine Komplexe, wodurch der Farbstoff in seiner blauen, anionischen Form stabilisiert wird. Der Extinktionskoeffizient dieses Komplexes ist höher als der des freien Farbstoffes, somit ist die Absorptionzunahme ein Maß für die Proteinkonzentration der untersuchten Probe.

Unmittelbar nach Farbumschlag wurde die Extinktion mittels Photometer bei einer Wellenlänge von 620 nm bestimmt. Anhand der Proteinstandards konnte die Proteinkonzentration der jeweiligen Probe berechnet werden.

2.5 IgG-ELISA

Die Bestimmung der IgG-Gesamtmenge in den untersuchten Nasopharynxaspiraten erfolgte mit einem kommerziellen Kit (Immunglobulin G ELISA Kit, Immundiagnostik AG, Bensheim, Deutschland).

Die mit polyklonalen Kaninchen-anti-human IgG vorbeschichteten Mikrotiterplatten wurden fünfmal mit 250 µl Waschpuffer je *Well* gewaschen und ausgeschlagen. Anschließend wurden 200 µl NaCl (0.9%) in jede Vertiefung vorgelegt und 10 µl der Proteinstandards (STD), der Kontrollen (CTRL) und der Proben nach folgendem Schema hinzu gegeben: In die Vertiefungen A1 bis E1 wurden die Standards eins bis fünf, beginnend mit dem der höchsten Konzentration, und in das *Well* F1 wurde die Kontrolle pipettiert. Die zuvor in NaCl im Verhältnis 1:100 vorverdünnten Nasopharynxaspirate wurden in die verbliebenen *Wells* im Doppelansatz verteilt. Wenn bei der Extinktionsmessung (s.u.) auffiel, dass die Messwerte nicht innerhalb der Standardgeraden lagen, wurde die Probe in einer anderen Verdünnung erneut getestet. Nach der Probenzugabe inkubierte die Mikrotiterplatte eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Horizontalmischer bei 300 rpm, damit sich das in den Proben enthaltene IgG an die mit Antikörpern beschichtete Platte binden konnte. Im Anschluss daran wurde die Platte geleert und wie oben beschrieben fünfmal gewaschen. Dann wurden 200 µl eines Peroxidase-markierten Antikörpers, der sich ebenfalls an das in den Proben enthaltene IgG bindet pro *Well* pipettiert und die Mikrotiterplatte inkubierte erneut unter den gleichen Bedingungen, wie in der ersten Inkubationszeit. Nach einer Stunde wurde der Inhalt der Platte verworfen und diese fünfmal mit 250 µl Waschpuffer pro *Well* gewaschen. Anschließend wurden 200 µl TMB-Substratlösung in jedes *Well* gefüllt. Dann inkubierte die Mikrotiterplatte zehn bis fünfzehn Minuten unter leichtem Schütteln, bis ein optisch zu differenzierender Farbunterschied aufgetreten ist. Nachdem 50 µl Stopplösung in jede Vertiefung zugegeben wurden, wurde die Extinktion sofort im Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen. Durch die mitgeführten Standards konnte die IgG-Menge in allen Nasopharynxaspiraten quantitativ mittels der Extinktionswerte berechnet werden.

2.6 IL-8-ELISA

2.6.1 Vorbereitung der ELISA-Platten

Zur Vorbereitung der ELISA-Platten wurde der Erstantikörper, der humanes IL-8 bindet (*capture antibody*), in der *Binding Solution* (pH = 9.0) auf eine Konzentration von 2 µg/ml verdünnt. In jedes *Well* der 96-Loch-Mikrotiterplatte wurde ein Volumen von 100 µl pipettiert. Danach wurde die Platte abgedeckt und inkubiert über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurde jedes *Well* der auf Raumtemperatur gebrachten Mikrotiterplatte geleert und mit jeweils 200 µl *Blocking Buffer* (10 % FBS in PBS) gefüllt. Die erneut abgedeckte Platte inkubiert eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde sie dreimal mit dem Waschpuffer (0.5 ml *Tween-20* in 1 l PBS) gewaschen, ausgeschlagen und trocknete bei Raumtemperatur. Die so vorbereiteten ELISA-Platten wurden entweder sofort wie unten beschrieben weiterverarbeitet oder verpackt bei 4°C gelagert.

2.6.2 Durchführung der IL-8-Bestimmung

Die Standards und Proben wurden nach folgendem Schema pipettiert: In die erste Spalte wurden pro *Well* 100 µl Standard, beginnend mit der höchsten Konzentration in A1 pipettiert. In den darunter liegenden *Wells* folgte der jeweils nächst niedriger dosierte Standard. Als negative Kontrolle diente PBS. Dieses wurde in *Blocking Buffer Tween* (0.5 ml *Tween-20* in 1 l *Blocking Buffer*) im jeweils gleichen Verhältnis wie die zu untersuchenden Proben verdünnt und in die 12. Spalte pipettiert. Die ebenfalls in *Blocking Buffer Tween* aufgelösten Proben wurden im Doppelansatz auf die restlichen *Wells* verteilt. Alle getesteten Nasopharynxaspirate wurden zunächst im Verhältnis 1:10 verdünnt. Diejenigen Proben, deren gemessene Extinktion oberhalb der vorgegebenen Standardgerade (s.u.) lag, wurden stärker verdünnt und in einem weiteren Ansatz getestet. Auf diese Weise wurde weiter verfahren, bis für alle Proben ein Messwert innerhalb der Standardgeraden ermittelt werden konnte. Nach Zugabe der Proben und Standards inkubiert die abgedeckte Platte erneut bei 4°C über Nacht. In dieser Zeit konnte sich das IL-8, sofern es in den Proben enthalten war, an die mit IL-8-Antikörpern beschichtete Platte binden. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte geleert und viermal mit Waschpuffer gewaschen. Der Zweitantikörper (*detection antibody*), der ebenfalls an humanes IL-8 bindet,

allerdings an einer anderen Stelle als der Erstantikörper, wurde in *Blocking Buffer-Tween* auf eine Konzentration von 1 µg/ml verdünnt. 100 µl dieser Lösung wurden in jede Vertiefung pipettiert, die Platte erneut abgedeckt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Mikrotiterplatte geleert und viermal mit dem Waschpuffer gewaschen. Von dem zuvor 1:4000 in *Blocking Buffer Tween* verdünnten Streptavidin-HRP wurde in jedes *Well* 100 µl pipettiert. Das Streptavidin-HRP ist ein mit Meerrettichperoxidase gekoppelter Antikörper, der den Fc-Teil des *detection antibody* bindet und bei Zugabe eines passenden Substrates zu einem nachweisbaren Reaktionsprodukt umgesetzt wird (Farbentwicklung). Die Platte wurde für weitere 30 Minuten abgedeckt. Nach dieser Inkubationszeit wurde die Mikrotiterplatte geleert und fünfmal mit dem Waschpuffer gewaschen. Bis zu maximal 15 Minuten vor Zugabe wurde das Substrat vorbereitet. Dazu wurden die Reagenzien A und B des TMB Substrat Reagenzien Sets im Verhältnis 1:1 miteinander vermischt. 100 µl des Substrats wurden pro *Well* pipettiert. Danach inkubierte die Mikrotiterplatte bei Raumtemperatur 10 Minuten im Dunkeln zur Farbentwicklung. Dann wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 100 µl Stopplösung gestoppt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) mittels Photometer gemessen. Mit Hilfe der gemessenen Extinktionswerte der mitgeführten Standardgeraden konnte der IL-8-Gehalt der Nasopharynxaspiraten quantitativ bestimmt werden.

2.7 TNF- α - und GCSF-ELISA

Der Versuchsablauf für den TNF- α - und den GCSF-ELISA ist analog zu dem des IL-8-ELISA. Für den TNF- α - ELISA und den GCSF- ELISA wurden mehrere Kombinationen von verschiedenen Erstantikörper- (*capture antibody*), Zweitantikörper- (*detection antibody*) und Streptavidin-Konzentrationen ausgetestet. Diese sind alle in Tabelle 14 zusammengefasst. Bei der kursiv gedruckten Reagenzienkombination wurde außer der *Binding Solution* mit einem pH von 9.0, die auch schon bei dem IL-8-ELISA eingesetzt wurde, eine *Binding Solution* mit einem pH von 6.0 ausgetestet. Dazu wurde die vorhandene *Binding Solution* mit 0.1 M NaH₂PO₄ auf den niedrigeren pH-Wert titriert.

Tabelle 14: Reagenzienkonzentrationen

TNF- α - ELISA		
<i>Capture antibody</i>	<i>Detection antibody</i>	Streptavidin
1:125	1:250	1:4000
1:125	1:500	1:4000
1:250	1:250	1:4000
1:250	1:500	1:4000
G-CSF- ELISA		
<i>Capture antibody</i>	<i>Detection antibody</i>	Streptavidin
1:500	1:500	1:500
1:500	1:500	1:1000
1:500	1:500	1:2000
1:500	1:500	1:4000

2.8 Zellkultur

2.8.1 Zellkulturierung

Die Zellkulturierung aller Zelllinien erfolgte in Kulturflaschen der Größe T-75 unter Standardbedingungen (37°C und 5% CO₂) im Inkubator. Als Erhaltungsmedium diente zweiprozentiges FKS in DMEM mit einem einprozentigem Zusatz von Penicillin und Streptomycin. Unter dem Lichtmikroskop wurden die Kulturen täglich bezüglich Zellmorphologie und Konfluenz beurteilt. Alle Zelllinien wurden in einem Rhythmus von vier bis fünf Tagen passagiert. Dazu wurde nach Dekantierung des Zellmediums aus der Kulturflasche der Zellrasen mit PBS gewaschen und anschließend durch Zugabe von 1ml 0,5%igem Trypsin-EDTA für 5 Minuten bei 37°C vom Flaschenboden gelöst. Der so gelöste Zellrasen wurde wie in Tabelle 15 angegeben, gesplittet. Danach wurde er in Wachstumsmedium (10% FKS/DMEM) überführt und auf neue T-75-Zellkulturgefäße verteilt.

Tabelle 15 : Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Bezugsquelle	Passagierung konfluenten Kulturen
MRC-5	Organismus: human Organ: Lunge (embryonal) Zellart: Fibroblasten	ATCC; Nr.: CCL-171™	1:2-1:5
Hep-G2	Organismus: human Organ: Leber Zellart: Epithel	O. Schildgen, Bonn	1:20
Hep-2	Organismus: human Organ: Lunge Zellart: epidermoidales Karzinom	ATCC; Nr.: CCL-23™	1:10

2.8.2 Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer

Der Zellrasen wurde abtrypsinisiert, in 10 ml PBS überführt, resuspendiert und anschließend in ein Falcon-Röhrchen gefüllt. 20µl der Zellsuspension wurden in die Neubauerzählkammer gegeben. Durch Bildung des Mittelwerts der Auszählergebnisse aller vier Großquadrate wurde die gesamte Zellzahl ermittelt. Zellsuspension und Medium wurden gemischt und auf ein Zellkulturgefäß in Abhängigkeit vom Zelltyp in einer Dichte von ca. 3×10^4 Zellen/cm² ausgesät.

2.8.3 Einfrieren von Zellen

Zur Archivierung und gegebenenfalls späteren Verarbeitung wurden Zellen mit makelloser Morphologie und in der Zellkultur vollständig konfluentem Zellrasen bei -20°C tiefgefroren gelagert. Nach lichtmikroskopischer Beurteilung der Qualität der Zellen, wurde der Zellrasen abtrypsinisiert (0,5%-iges-Trypsin-EDTA), in 10 ml DMEM mit 10% FKS überführt, für 10 Minuten bei 600 rpm zentrifugiert und das *Pellet* anschließend in das Einfriermedium, welches zu 70% aus DMEM, 20% aus FKS und 10% aus DMSO bestand, gegeben. Von dieser Zellsuspension wurde 1ml in ein auf 4°C vorgekühltes Kryoröhrchen pipettiert. Dieses wurde für die nächsten 24 Stunden bei -80°C gekühlt und anschließend bis zur Weiterverarbeitung bei -180°C in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.8.4 Auftauen von Zellen

Vor dem Auftauen wurde zunächst ein 37°C warmes Wasserbad, sowie 10ml des DMEM/10% FKS-Medium, welches in einem 50ml Falcon auf 37°C vorgewärmt wurde, zurechtgelegt. Nach der Entnahme des Kryoröhrchens aus dem Stickstofftank wurde dieses im Wasserbad soweit aufgetaut, dass es in das vorbereitete Röhrchen mit Medium überführt werden konnte. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 600 rpm wurde das Zellpellet in 20 ml ebenfalls auf 37°C erwärmtem DMEM/10%FKS-Medium resuspendiert und in einer T-75 Zellkulturflasche erneut unter Standardbedingungen im Inkubator kulturiert.

2.8.5 Virusinfektion von Zelllinien

Die Infektion eines Zellrasens mit Rhinovirus und RSV verlief analog. Das bei -80°C gelagerte Virusinokulum (Aliquots à 1ml) wurde bei Raumtemperatur aufgetaut. Es wurden 4ml PBS und 50µl Trypsin-Stocklösung hinzugegeben, sodass eine Endkonzentration von 2,5 µg/ml vorlag. Um den subkonfluenten Zellrasen einer suszeptiblen Zelllinie zu infizieren, wurde das Erhaltungsmedium dekantiert und der Zellrasen mit 5 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde das wie oben beschrieben vorbereitete Virusinokulum auf den Zellrasen pipettiert und die T-75 Zellkulturflasche bei 37°C auf dem Kippschüttler inokuliert. Nach einer Stunde wurde das Virusinokulum durch Waschen des Zellrasens mit PBS entfernt. Nach Zugabe von 25ml Erhaltungsmedium und 250 µl Trypsin wurde die Zellkulturflasche bei 33°C und 5% CO₂ bis zum Vorliegen eines klassischen CPE inkubiert.

Für die Infektion mit HMPV wurden Hep G2-Zellen bis zu einer 30 %igen Dichte auf eine 6-Well-Platte gegeben. In jede Vertiefung wurde 1 ml virushaltiger Zellkulturüberstand pipettiert. Anschließend wurde die Platte bei 2000 rpm zentrifugiert. Nach 15 Minuten wurde die Platte um 180° gedreht und erneut für 15 Minuten zentrifugiert. Nach Zugabe von Erhaltungsmedium wurde die Platte für 14 Tage unter den gleichen Bedingungen wie zur Rhino- und RSV- Infektion im Brutschrank inkubiert. Der virushaltige Überstand wurde nach dieser Zeit analog zu der oben beschriebenen Infektion von Zellen mit RSV und Rhinoviren auf ein T-75-Zellkultur-Gefäß verimpft und für weitere 14 Tage im Brutschrank inkubiert. Der Erfolg der Virusinfektion mit HMPV konnte vor der Weiterverimpfung mittels einer Standard-Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen HMPV überprüft werden.

Tabelle 16 : Verwendete Referenzviren

Virus	Abkürzung	Stamm	Herkunft	Susceptible Zelllinie
Humanes Metapneumovirus	HMPV	hMPV-DIJ-H7-07 (Genotyp B)	Bonn	Hep G2
Respiratory Syncytial Virus Subtyp A	RSV A	<i>long strain</i>	M.A. Bioproducts; Nr.: 30-875 J	Hep-2
Rhinovirus Typ9	Rhi	211-CV13	ATCC; VR-1119	MRC-5

2.8.6 Cytopathischer Effekt und Virusernte

Unter dem Lichtmikroskop wurde der inokulierte Zellrasen täglich morphologisch bezüglich der Ausbildung eines charakteristischen cytopathischen Effekts (

Tabelle 17) für das verimpfte Virus beurteilt. Bei der Anzüchtung des HMPV ergab sich die Besonderheit, dass ein cytopathischer Effekt nicht zu sehen war, daher erfolgte die Virusernte und Objektträgerbeschichtung nach 14 Tagen. Hier konnte zur Sicherheit der Erfolg der Infektion mit HMPV durch eine Immunfluoreszenz kontrolliert werden. Bei Erhalt eines typischen CPE für das Rhinovirus und das Respiratory Syncytial Virus wurde der virushaltige Zellkulturüberstand zur Beschichtung der Objektträger für die Immunfluoreszenz verwendet.

Tabelle 17 : Typischer cytopathischer Effekt sowie Dauer bis zum Auftreten bei den eingesetzten Viren

Virus	CPE	Dauer bis zum Auftreten (Tage)
Humanes Metapneumovirus	nicht zu sehen	--
Respiratory Syncytial Virus	Fusionen	2-4
Rhinovirus	Zelllyse	1-2

2.9 Immunfluoreszenz

2.9.1 Vorbereitung der Objektträger

Infizierte Zellen einer Kultur wurden nach Ablösung mit Trypsin zusammen mit 200 µl PBS in ein Eppendorf-Hütchen überführt. Dieses wurde für zehn Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand bis auf circa 50 µl abgesaugt und das *Pellet* mit einer Pipette auf eine Zelldichte von circa 2×10^4 Zellen/µl resuspendiert. 2 µl dieses Zell-PBS-Gemisches wurden in jedes Loch eines Immunfluoreszenzobjektträgers aufgetragen. Die

Zelldichte wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Bei Hyperkonfluenz der Zellen im Blickfeld musste die Zellsuspension stärker vorverdünnt werden. Nach dem Auftragen lufttrockneten die Objektträger für 30 bis 60 Minuten. Zur Fixierung wurden die trockenen Objektträger in mit eiskaltem Aceton gefüllte Küvetten überführt und darin zehn Minuten belassen. Danach wurden die Objektträger entnommen und erneut luftgetrocknet. Die nun mit Antigen (infizierte Zellen) beladenen Objektträger konnten direkt weiterverarbeitet werden oder wurden bei -20°C gelagert.

2.9.2 Durchführung des Antikörpernachweises

Die Nasopharynxaspirate wurden in PBS jeweils 1:20 und 1:40 vorverdünnt. 20 µl dieser Verdünnung wurden, nach dem in Tabelle 18 angegebenen Pipettierschema, pro *Cup* aufgetragen, dabei sollte die Flüssigkeit eine Halbkugel auf dem Glas bilden. Als positive Kontrolle (CTRL) diente das Serum eines erwachsenen Patienten mit positivem Antikörper-Nachweis.

Tabelle 18: Pipettierschema; Pr = Probe; CTRL = Kontrolle

1	Pr 1	1:20	2	Pr 1	1:40	3	Pr 2	1:20	4	Pr 2	1:40	5	Pr 3	1:20
6	Pr 3	1:40	7	Pr 4	1:20	8	Pr 4	1:40	9	CTRL	1:20	10	CTRL	1:40

Im Anschluss daran inkubierte der Objektträger für 60 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer. In dieser Zeit konnten sich in den Nasopharynxaspiraten enthaltene Antikörper an die mit infizierten Zellen beschichtete Oberfläche des Objektträgers binden. Nach dieser Inkubationszeit wurde der Objektträger zweimal für fünf Minuten in einer mit PBS gefüllten Küvette gewaschen und luftgetrocknet. 20 µl *Anti-human-IgG-FITC-Konjugat* bzw. *Anti-human-IgA-FITC-Konjugat* wurden 1:40 in PBS-*Evansblau* verdünnt und auf jedes Loch gegeben. Dabei konnten sich im Gegensatz zum ersten Inkubationsschritt häufig keine Halbkugeln ausbilden. Der Objektträger inkubierte 45 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer und wurde im Anschluss daran wie bereits oben beschrieben gewaschen. Nach dem Waschen des Objektträgers und anschließender Lufttrocknung, wurden die zu untersuchenden *Cups* mit jeweils einem Tropfen *Mounting fluid* beladen und der Objektträger mit einem Deckglas abgedeckt. Die Auswertung erfolgte unter dem Immunfluoreszenzmikroskop bei 480 nm Anregungslicht. Proben, die positiv für die gesuchten Antikörper waren, zeigten eine leuchtend

grüne Fluoreszenz ($\approx 520\text{nm}$), negative Nasopharynxaspirate nur die Gegenfärbung mit *Evansblue* als dunkelrote Färbung. Mit Hilfe dieses Testverfahrens wurden alle Nasopharynxaspirate auf IgG und IgA für das Humane Metapneumovirus, das Respiratorische Syncytial Virus und das Rhinovirus untersucht. Dafür wurde jeweils eine unterschiedliche Kombination aus FITC-Konjugat und vorbeschichteten Objektträger gewählt.

Tabelle 19: Kombination aus Konjugat und Objektträger

Objektträgerbeschichtung	FITC-Konjugat	Gesuchter Antikörper
HMPV-infizierte Zellen	IgG	HMPV-IgG
HMPV-infizierte Zellen	IgA	HMPV-IgA
RSV-infizierte Zellen	IgG	RSV-IgG
RSV-infizierte Zellen	IgA	RSV-IgA
Rhinovirus-infizierte Zellen	IgG	Rhinovirus-IgG
Rhinovirus-infizierte Zellen	IgA	Rhinovirus-IgA

2.10 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse wurde das PC-Programm SigmaPlot Version 10.0 benutzt. Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben und $p < 0.05$ als signifikant betrachtet. Beim direkten Vergleich zweier Gruppen wurden der Tukey Test und der Mann-Whitney-U-Test benutzt. Sollten mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen werden, wurde der Kruskal-Wallis-Test als parameterfreier statistischer Test eingesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Auswertung der *One-Step-RT-PCR*

Ziel der PCR war die Beantwortung der Frage zu welchen HMPV-Subtypen die 30 Proben des HMPV-Kollektivs gehören. Dazu wurden die HMPV-Materialien im N-Gen amplifiziert und anschließend sequenziert. Die erwartete Länge des mit dem in dieser PCR verwendeten *Primerpaar* erzeugten Amplifikates beträgt 328bp. Der Erfolg der PCR wurde über die Detektion spezifischer Banden mit einer dem Amplifikationsprodukt entsprechenden Größe im Agarosegel bestätigt. Der Bandennachweis im Agarosegel ist in Abbildung 9 exemplarisch dargestellt. Durch die mit den Amplifikaten aufgetragene Kontrollbande (kB-Leiter) kann auf die Größe dieser rückgeschlossen werden. Eine Übereinstimmung der Größe des Fragments im Gel und der erwarteten Amplifikatgröße bestätigt die erfolgreiche Amplifikation der viralen Zielregion.

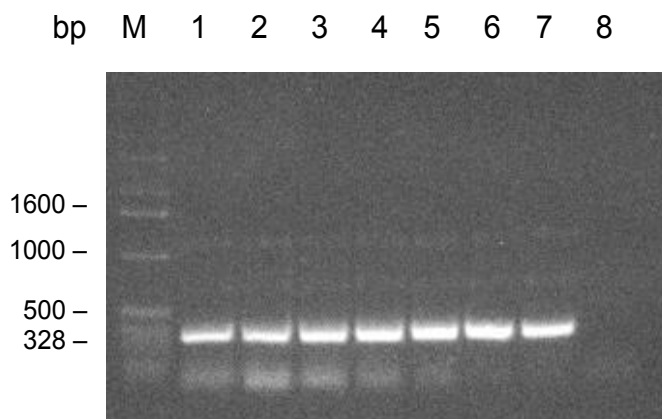


Abbildung 9: PCR-Amplifikate im Agarosegel:

Spur **M**: kB-Leiter. An den Positionen eins bis sieben wurden Amplifikate aufgetragen und an Position Nummer acht die negative Kontrolle. Die Amplifikatgröße von 328 bp bestätigt die erfolgreiche PCR.

Bei einigen PCR-Läufen ergab sich die Besonderheit, dass zusätzlich zu den erwarteten Banden auch unspezifische Banden im Agarosegel detektiert wurden. Diese unspezifischen Banden hatten eine Größe von circa 500 und mehr bp. Da sich bei der späteren Sequenzierung der PCR-Produkte aber keine Schwierigkeiten auf Grund dieser Doppelbanden ergaben, wurden auch diese Produkte aufgereinigt und sequenziert. In Abbildung 10 sieht man exemplarisch das Agarosegel eines dieser PCR-Läufe.

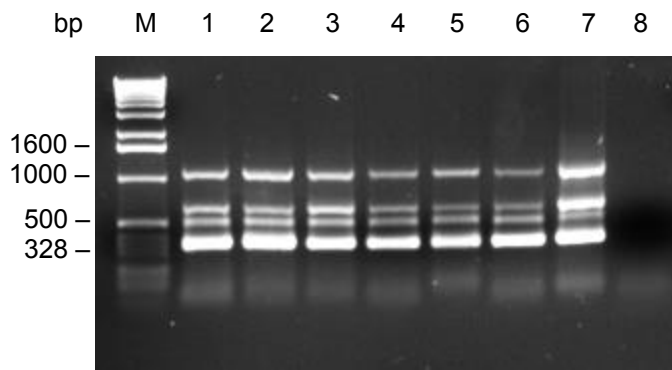


Abbildung 10: PCR-Amplifikate mit Doppelbanden:

Spur **M**: kB-Leiter. An den Positionen eins bis sieben wurden die PCR-Amplifikate aufgetragen. Neben dem erwarteten Amplifikat von 328 bp sieht man unspezifische Banden. Die Negativkontrolle ist an Position acht aufgetragen.

3.1.1 Erstellung eines phylogenetischen Stammbaums des HMPV

Mit Hilfe des *Sequence Alignment Editors* (Ibis Biosciences) wurde ein phylogenetischer Stammbaum der untersuchten Proben erstellt. Von den 30 untersuchten Proben sind fünf dem HMPV-A-Typ zuzuordnen. In Abbildung 11 wurde der HMPV-A-Referenzstamm mit der Bezeichnung DQ843659 eingefügt. Die restlichen 25 Proben waren positiv für den HMPV-B-Typ. Ein entsprechender Referenzstamm ist in der Abbildung 11 mit der Nummer AY297748 gekennzeichnet. Betrachtet man die Subtypen der beiden Stämme, so fällt auf, dass einige mit einer Wahrscheinlichkeit von bis zu 95% sehr nah miteinander verwandt sind. Dies ist zum Beispiel bei den Proben mit der VI-Nummer 41739, 41837 und 42608 der Fall. Auf Grund der VI-Nummer, die im Institut für Virologie nach der Reihenfolge des Probeneingangs vergeben wird, kann man den zeitlichen Abstand der Probenentnahme/des Probeneingangs ermitteln. In diesem exemplarischen Fall sind es vier Tage.

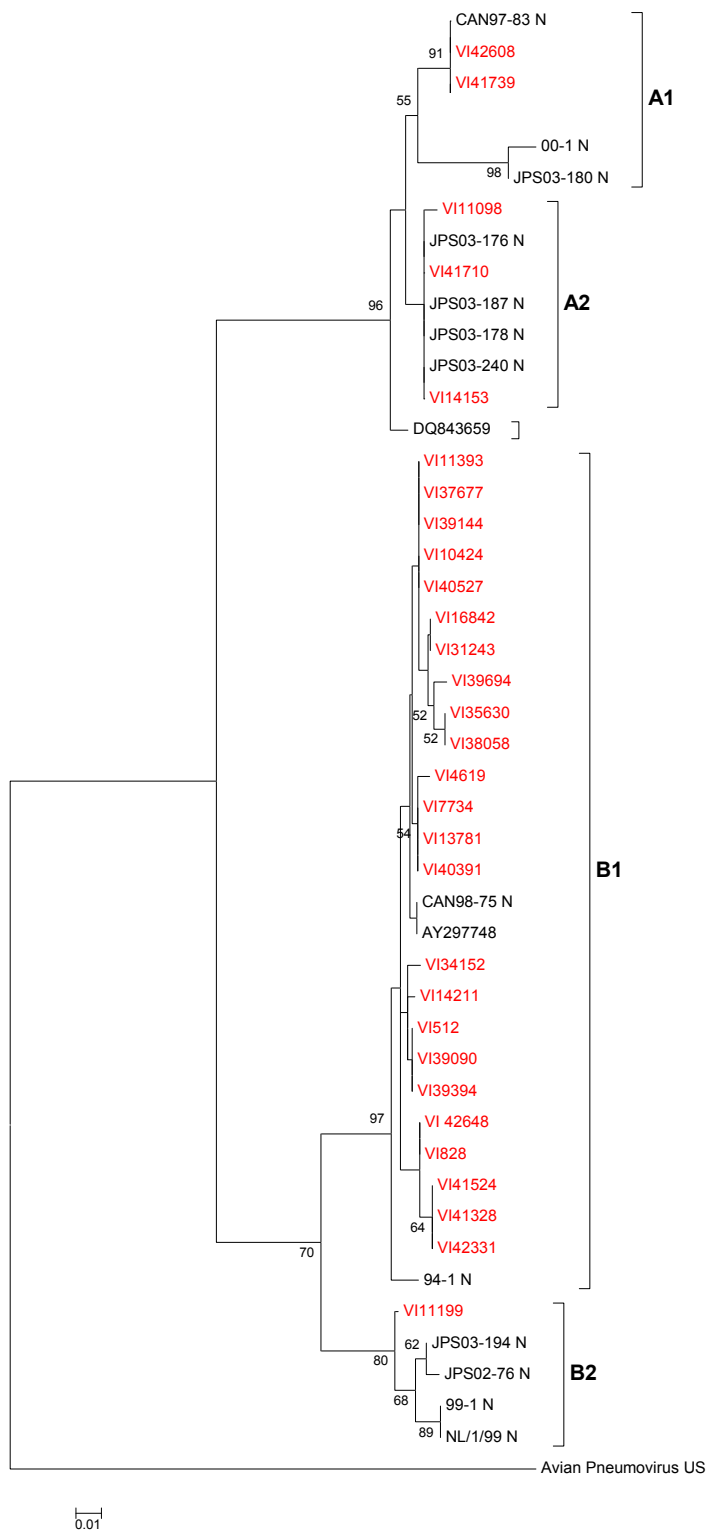


Abbildung 11: Phylogenetischer Stammbaum des HMPV

Anmerkung: Die Phylogenie wurde durch die Nutzung der *Neighbor-Joining Methode* hergestellt (122). Der optimale Stammbaum mit einer Summe von Zweiglängen = 0.42653643 ist dargestellt. Der prozentuale Anteil von Wiederholungsabzweigungen, in welchen die assoziierten Taxa sich anhäufen, im *Bootstrap Test* (500 Wiederholungen), sind an den Abzweigungen dargestellt (39). Der Stammbaum ist maßstabsgetreu gezeichnet: Die Abzweiglänge entspricht der phylogenetischen Distanz. Diese wurde durch Nutzung der *Maximum Likelihood Methode* berechnet. Alle Positionslücken und fehlende Daten wurden vom Datensatz eliminiert (*Complete deletion option*). Insgesamt gab es 726 Positionen im finalen Datensatz. Die phylogenetischen Analysen wurden mit MEGA4 (133) durchgeführt.

3.1.2 HMPV: Nukleotid und AS-Divergenzen

Die HMPV-Proben wurden zur Subtypenbestimmung im N-Gen (Nukleoprotein, siehe Abbildung 2) amplifiziert und sequenziert. Mit Hilfe des MEGA4-Programms wurde anschließend die Nukleotiddivergenz im Vergleich zur Aminosäuredivergenz der einzelnen Proben untereinander ausgerechnet. Dabei fällt auf, dass der Prozentsatz der Nukleotiddivergenzen größer als der der Aminosäuredivergenzen (siehe Tabelle 20 und Tabelle 21) ist. Das heißt, dass ein Austausch eines Nukleotids nicht zwangsläufig zur Änderung einer Aminosäure führt. Dies spricht dafür, dass auf das Protein kein immunologischer Selektionsdruck ausgeübt ist.

Tabelle 20: HMPV: Gemittelte Nukleotid- und Aminosäuredivergenzen + SEM:

	Nukleotiddivergenz	SEM	Aminosäuredivergenz	SEM
Alle (n=31)	6,43 %	0.0145	4.75 %	0.0168
B1 (n=26)	3,38 %	0.024	2.09 %	0.0098

Anmerkung: Nukleotid-Substitutionsmodell: *Maximum Composite Likelihood method*; Aminosäure-Substitutionsmodell: *PAM-Matrix*

Tabelle 21: Maximum Composite Likelihood Estimate of the Pattern of Nucleotide Substitution (134)

	A	T	C	G
A	-	<i>1.23</i>	<i>0.76</i>	18.57
T	<i>2.62</i>	-	14.16	<i>1.51</i>
C	<i>2.62</i>	22.9	-	<i>1.51</i>
G	32.13	<i>1.23</i>	<i>0.76</i>	-

Anmerkung: Jeder Eintrag zeigt die Wahrscheinlichkeit der Substitution einer Base (Zeile) durch eine andere Base (Spalte). Transitionale Substitutionen (Pyrimidin in Pyrimidin und Purin in Purin) sind fett gedruckt und transversionale Substitutionen (Pyrimidin in Purin und umgekehrt) sind kursiv gedruckt. Die Nukleotidfrequenzen sind 0.428 (A), 0.201 (T/U), 0.124 (C) und 0.247 (G). Die Transitions-/Transversionsraten – Ratio sind $k_1 = 12.269$ (Purine) and $k_2 = 18.613$ (Pyrimidine). Die Gesamt- Transitions-/Transversions – Bias ist $R = 4.357$, wobei sich R wie folgt berechnet: $R = [A * G * k_1 + T * C * k_2] / [(A + G) * (T + C)]$. Die eingeschlossenen Codon-Positionen waren 1st+2nd+3rd+Noncoding. Alle Positionenlücken und fehlende Daten wurden vom Datensatz eliminiert (*Complete-deletion option*). Insgesamt gab es 218 Positionen im finalen Datensatz. Alle Berechnungen wurden mit MEGA4 (133) vorgenommen.

3.2 Auswertung der Zytokin-ELISA

3.2.1 Auswertung des IL-8-ELISA

Die IL-8 Konzentrationen in allen drei Vergleichskollektiven (HMPV-Gruppe, RSV-Gruppe und Rhinovirusgruppe) wurden mit Hilfe eines quantitativen IL-8-Zytokin-Sandwich-ELISA bestimmt.

3.2.2 Auswertung des GCSF- und TNF- α -ELISA

Bei der Etablierung eines GCSF- und eines TNF- α -Zytokin-Sandwich-ELISAs analog zu dem IL-8-Sandwich-ELISA ergaben sich einige Probleme. Die Kombination aus einem 1:125 vorverdünnten Erstantikörper, einem 1:500 verdünnten Zweitantikörper, einer *Binding Solution* mit einem pH von 9.0 und dem 1:4000 verdünnten Streptavidin, erwies sich für den TNF- α -ELISA als ideal. Die eingesetzten Standards ergaben eine Gerade und der detektierte Hintergrund lag deutlich unter dem Extinktionswert des Standards mit der niedrigsten TNF- α -Konzentration. Jedoch lagen die TNF- α -Werte aller eingesetzten Proben unterhalb der Nachweisgrenze dieses ELISA, sodass keine Werte für eine spätere Interpretation gemessen werden konnten. Genau das gleiche Problem trat bei der Entwicklung eines GCSF-ELISA-Versuchsprotokolls auf. Hier ergab sich für alle getesteten Reagenzienkombinationen das beste Ergebnis, wenn der Erstantikörper 1:500, der Zweitantikörper 1:500 und das Streptavidin 1:2000 verdünnt, eingesetzt wurden. Unter diesen Bedingungen reagierten die Standards linear und die für den Hintergrund gemessenen Extinktionswerte lagen deutlich unter dem kleinsten Standard. Auch bei diesem ELISA war für alle getesteten Proben kein Extinktionswert oberhalb des Hintergrundes und innerhalb der Standardgeraden detektierbar, sodass auch hier davon auszugehen ist, dass die Proben kein GCSF enthalten oder dieses unter der Nachweisgrenze des ELISA liegt. Die untere Nachweisgrenze beider ELISA liegt jeweils bei 15 pg/ml Zytokin.

3.3 Auswertung der Immunfluoreszenz

Die nach dem im Material und Methoden-Teil angegebenen Protokoll gefärbten Objektträger, wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 480 nm Anregungslicht, ausgewertet. Alle drei Kollektive wurden auf IgG- und IgA- Antikörper für HMPV, RSV und Rhinovirus untersucht. Die

für den jeweils gesuchten Antikörper positiven Proben zeigten eine typische grüne Fluoreszenz, die negativen Proben lediglich die Gegenfärbung mit *Evansblue*. Abbildung 12 zeigt exemplarisch eine positive und eine negative Probe. In der Abbildung 13 ist ein repräsentativer Querschnitt von positiven Proben für alle Antikörper zusammengestellt. Einige Proben zeigten in der Immunfluoreszenz Signale, die nicht eindeutig als spezifisch zu beurteilen waren, was insgesamt die Auswertung erschwerte.

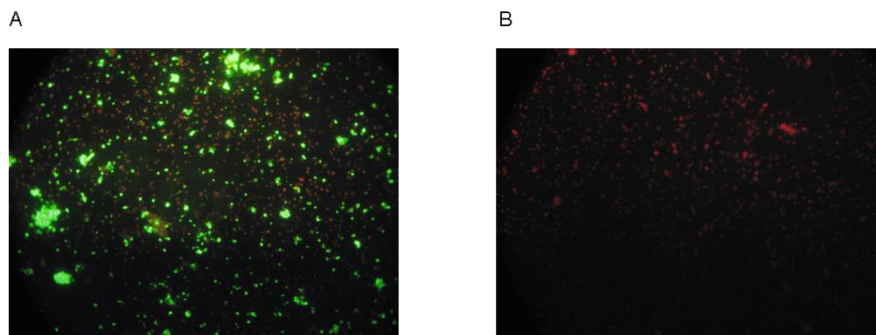


Abbildung 12: Immunfluoreszenz-Fotos:

A zeigt die typische grüne Fluoreszenz, die bei 480 nm Anregungslicht unter dem Fluoreszenzmikroskop zu sehen war. Hier im Beispiel eine für HMPV-IgG positive Patientenprobe. **B** zeigt nur die Gegenfärbung mit *Evansblue* eines negativen Aspirates. Mikroskopie: Zeiss Neofluar 25-fach.

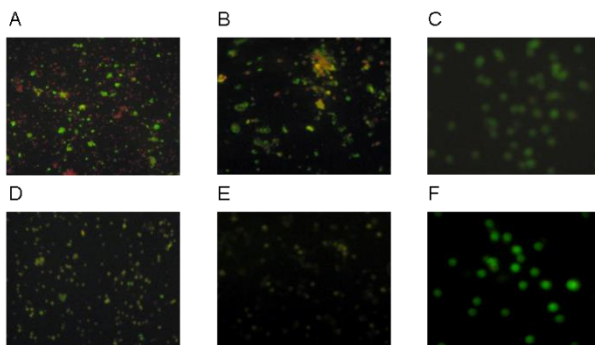


Abbildung 13: RSV-Gruppe-Antikörper:

A bis **C** zeigen Ausschnitte von IgG positiven Aspiraten, von Patienten der RSV-Gruppe, in der Reihenfolge: HMPV-IgG, RSV-IgG und Rhinovirus-IgG. **D** bis **F** zeigen in der gleichen Abfolge IgA-positive Aspirate des RSV-Kollektivs. Mikroskopie: Zeiss Neofluar 25-fach.

3.3.1 Antikörperverteilung in den einzelnen Kollektiven

Betrachtet man die Absolutzahlen der Antikörper positiven und negativen Proben im HMPV-Kollektiv, so zeigt sich ein ausgeglichenes Bild (Abbildung 14). Innerhalb dieses Kollektivs sind 12 Proben positiv für HMPV- Antikörper, 10 positiv für RSV- Antikörper und ebenfalls 10 positiv

für Rhinovirus-Antikörper. Circa zwei Drittel der Proben waren negativ für die jeweils gesuchten Antikörper.

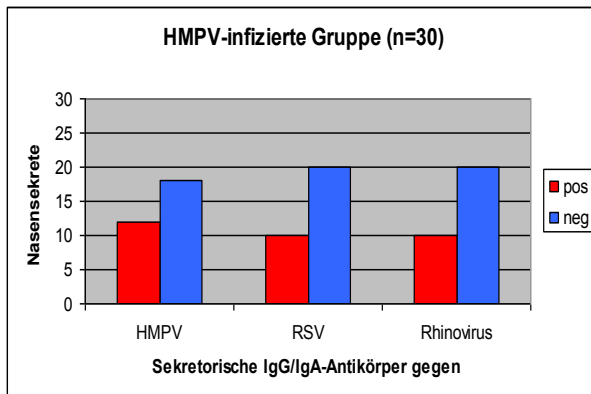


Abbildung 14: HMPV-Gruppe-Antikörperübersicht

In der RSV-Gruppe (Abbildung 15) ist das oben aufgetretene Verteilungsverhältnis genau umgekehrt in Bezug auf die RSV-Antikörper. Mehr als zwei Drittel aller Proben ($n = 22$) sind positiv für RSV-Antikörper. Der Rhinovirus-Antikörperstatus ist mit neun positiven Proben dem des HMPV-Kollektivs annähernd gleich. Besonders auffällig ist der HMPV-Antikörperstatus innerhalb dieser Probe. Lediglich zwei Proben wiesen Antikörper für HMPV auf.

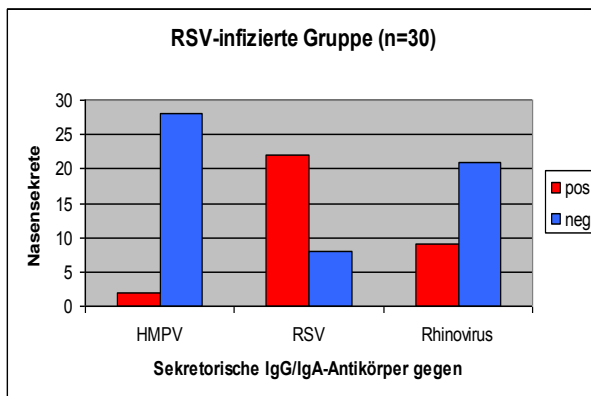


Abbildung 15: RSV-Gruppe-Antikörperübersicht

Mit 13 positiven Proben für RSV zeigt sich im Rhinoviruskollektiv die gleiche Verteilungstendenz wie im HMPV-Kollektiv in Hinblick auf den RSV-Antikörperstatus. Im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen waren in diesem Kollektiv viele Proben positiv für HMPV-Antikörper ($n = 18$). Auffällig ist auch, dass weniger als ein Drittel der Proben Rhinovirus-Antikörper hatten ($n = 8$). Dies ist im Gegensatz zu den beiden anderen Kollektiven, in denen die Anzahl der

antikörperpositiven Proben für das Virus mit dem die Patienten infiziert waren über der Anzahl der antikörperpositiven Proben für die Viren der beiden Vergleichsgruppen lag. Eine Übersicht über die Antikörperverteilung in dieser Gruppe gibt Abbildung 16.

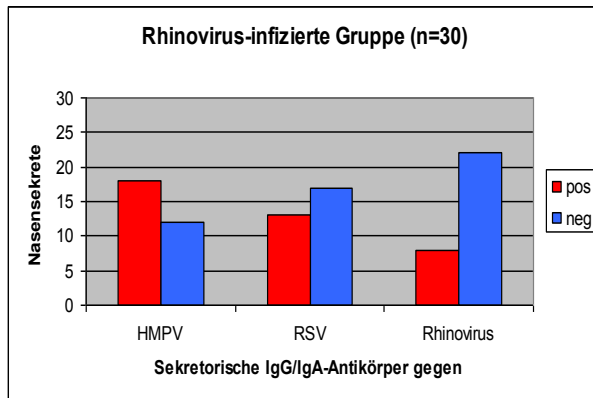


Abbildung 16: Rhinovirus-Gruppe-Antikörperübersicht

3.3.2 Sensitivität der Immunfluoreszenz

Zur Überprüfung der Sensitivität der Immunfluoreszenz wurde ein Kollektiv von Nasensekreten von 15 Erwachsenen Patienten, ohne Virusnachweis für eines der untersuchten Viren zusammengestellt. In dieser Altersgruppe liegt die Durchseuchung für HMPV, RSV und Rhinovirus bei nahezu 100%. Von den 15 untersuchten Proben wiesen alle Antikörper für HMPV und 14 Antikörper für RSV auf. Dieses Ergebnis entsprach den Erwartungen. Jedoch enthielten nur sechs Nasensekrete Rhinovirus- Antikörper. Um sicher zu gehen, dass der Test sensitiv ist, und vorhandene Antikörper wirklich detektiert werden, wurde nach Seren der Patienten, in deren Nasensekreten keine Rhinovirus- Antikörper nachgewiesen werden konnten, recherchiert. Diese Seren waren im Institut für Virologie der Heinrich-Heine-Universität archiviert. Insgesamt konnten 13 Seren gefunden werden, die alle Antikörper für das Rhinovirus enthielten. Mit der obigen Immunfluoreszenz werden also vorhandene Rhinovirus- Antikörper detektiert. Die Frage, warum in den Nasensekreten so vieler erwachsener Patienten keine Antikörper vorhanden waren, obwohl sie eine Rhinovirusinfektion schon durchgemacht haben, was der positive Antikörperbefund in den zugehörigen Seren zeigt, bleibt zu diskutieren. In Abbildung 17 ist der gesamte Antikörperstatus der Erwachsenen- Gruppe zusammengefasst.

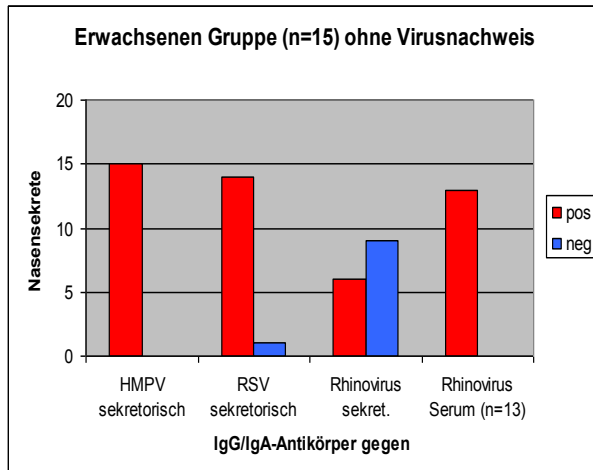


Abbildung 17: Erwachsenen-Gruppe Antikörperübersicht

3.4 Auswertung des HMPV-Kollektivs

3.4.1 Korrelation von Subtyp und weiteren ermittelten Parametern

Durch die Sequenzanalyse zeigt sich, dass von dem untersuchten HMPV-Kollektiv die Proben von fünf Patienten dem HMPV-Subtyp A (zwei Patientenproben A1 und drei A2) und die der restlichen 25 dem Subtyp B (bis auf eine Probe B2 alle B1) zuzuordnen sind. Auf Grund dieser Verteilung ist eine weitere Analyse, in Hinblick der Fragestellung, ob es eine Korrelation zwischen der Subtypenzugehörigkeit und der in dieser Arbeit ermittelten Werte (klinische Diagnose, klinische Parameter, Zytokine und Antikörper) gibt, nicht erfolgt. Die Reliabilität von mathematisch statistisch signifikanten Ergebnissen ist auf Grund des kleinen Vergleichskollektivs des Subtyps B und der Inhomogenität der Gruppengrößen nicht gegeben.

3.4.2 Messung von human CCL4/MIP-1 β

In Kooperation mit der Kinderklinik wurden die Proben der HMPV-Gruppe auf humanes CCL4/MIP-1 β getestet. Bis auf acht Proben waren alle Proben negativ oder die Messwerte lagen unterhalb der Nachweisgrenze. Eine weitere Auswertung erfolgte daher nicht.

3.4.3 Immunantwort im zeitlichen Verlauf

Von 23 der 30 HMPV-Patienten wurde nach einigen Tagen Krankenhausaufenthalt (zeitlicher Abstand der Proben: bis zu vier Tage) eine weitere Probe ins Virologische Institut eingeschickt, sodass bei diesen Patienten die Immunantwort im Nasopharynxaspirat im zeitlichen Verlauf untersucht werden konnte. Bei der statistischen Auswertung der Viruslastwerte während des Infektionsverlaufs, zeigt sich bei einem p-Wert von 0.061, der knapp über der Signifikanzgrenze (0.05) liegt der deutliche Trend, dass diese im Krankheitsverlauf abfallen. Grafisch dargestellt ist dies in Abbildung 18.

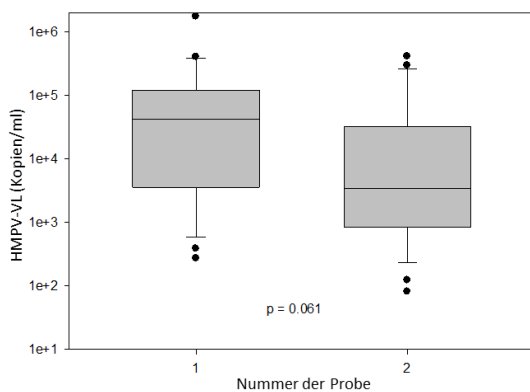


Abbildung 18: HMPV-Viruslastwerte von den 23 Patienten, von denen 2 Proben eingeschickt wurden, im zeitlichen Verlauf. 1 erste Probe, 2 Verlaufsprobe.

Betrachtet man die IL-8-Werte im Verlauf (siehe Abbildung 19), sieht man, dass diese annähernd gleich bleiben, was bei dem kurzen zeitlichen Abstand der Proben auch nicht anders zu erwarten war.

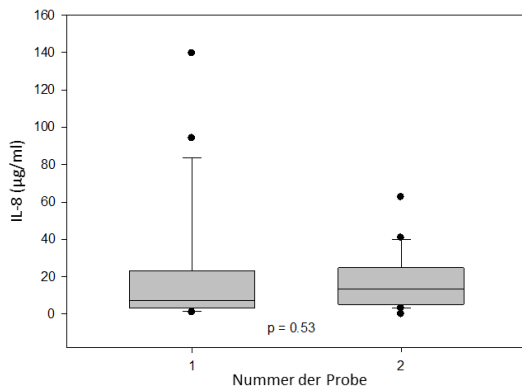


Abbildung 19: IL-8- Werte von den 23 Patienten, von denen 2 Proben eingeschickt wurden, im zeitlichen Verlauf. 1 erste Probe, 2 Verlaufsprobe.

3.5 Auswertung der Vergleichskollektive

3.5.1 Saisonale Verteilung der Proben

In mehreren Studien ist eine saisonale Häufung von RSV- und HMPV-Infektionen, abhängig vom geographischen Infektionsort beschrieben (s. 1.5.3 Einleitung). Die nachfolgende Abbildung fasst die zeitliche Verteilung der in dieser Arbeit untersuchten Proben aller Vergleichskollektive zusammen. Im HMPV- und RSV- Kollektiv sind die Infektionszeitpunkte, wie für unsere Breitengrade zu erwarten in den Wintermonaten und im Frühjahr. Im Hochsommer ging kein für HMPV oder RSV positives Patientenmaterial ein. Im Gegensatz dazu waren in dieser Arbeit Rhinovirusinfektionen das ganze Jahr über zu verzeichnen, mit einer leichten Häufung in den kalten Monaten.

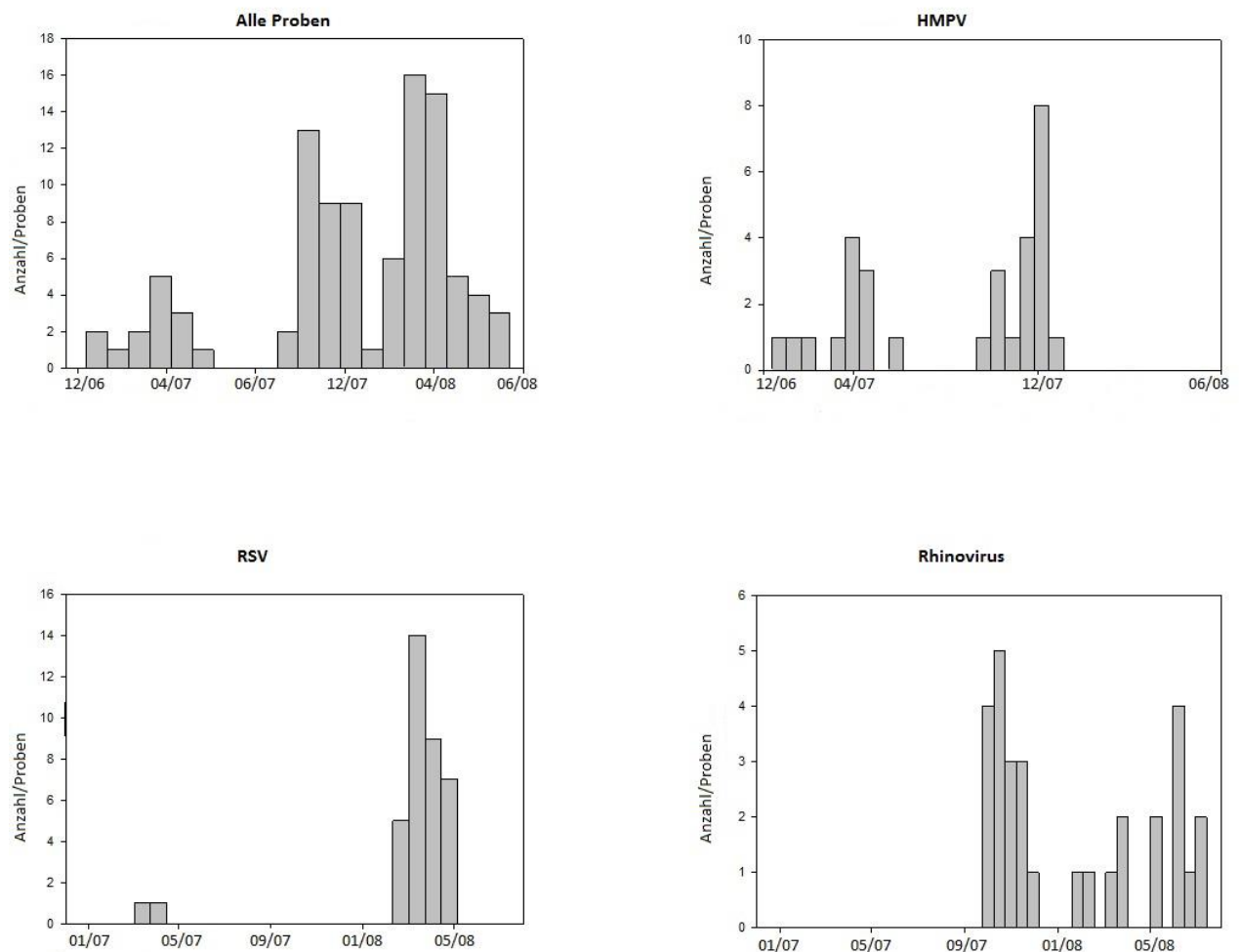


Abbildung 20: Jahreszeitliche Verteilungen des Probeneingangs in den Kollektiven: links oben alle Proben, rechts oben HMPV-Gruppe, links unten RSV-Gruppe, rechts unten Rhinovirusgruppe.

Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte phylogenetische Untersuchung der HMPV-Gruppe ist es möglich, innerhalb dieser Gruppe die saisonale Verteilung subtypenspezifisch anzuschauen. In Tabelle 22 ist der zeitliche Probeneingang zusammen gefasst. Man erkennt, dass alle Subtypen zeitgleich grassieren, jedoch mit dem Vorherrschen eines Subtyps. In dem Zeitraum vom Frühjahr und Herbst 2007, der in dieser Arbeit betrachtet wurde, ist dies der Subtyp B1. Vor allem im November und Dezember 2007 zeigt sich ein Häufigkeitsgipfel dieses Subtyps.

Tabelle 22: Saisonale Verteilung der HMPV-Gruppen subtypenspezifisch

Zeitraum (Monat/Jahr)	Anzahl der Proben je Subtyp			
	A1	A2	B1	B2
12/06	0	0	1	0
01-02/2007	0	0	2	0
03-04/2007	0	2	5	1
05/2007	0	0	1	0
06-08/2007	0	0	0	0
09-10/2007	0	0	3	0
11-12/2007	2	1	11	0
01/08	0	0	1	0

3.5.2 Zusammenhang zwischen Viruslast und Infektion

Die Viruslastdaten der drei Vergleichskollektive wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test für nicht normalverteilte, unverbundene Stichproben ausgewertet. Beim Vergleich der Viruslasten aller Proben der drei Vergleichskollektive, fällt auf, dass der Median der Viruslasten in der Rhinovirusgruppe signifikant ($P = 0.007$) unter der der beiden anderen Kollektive liegt. Diese Beziehung ist in Tabelle 23 und Abbildung 21 dargestellt.

Tabelle 23: Viruslastdaten der Vergleichskollektive: Kruskal-Wallis *One Way Analysis of Variance on Ranks*

Gruppe	N	Median	25%	75%
HMPV-VL	30	10107.014	1749.702	68292.859
RSV-VL	30	18230.329	1461.538	239806.881
Rhino-VL	30	952.840*	38.358	17056.163

H = 10.016 mit 2 Freiheitsgraden ($p = 0.007$)

* statistisch signifikant gegenüber Vergleichsgruppen

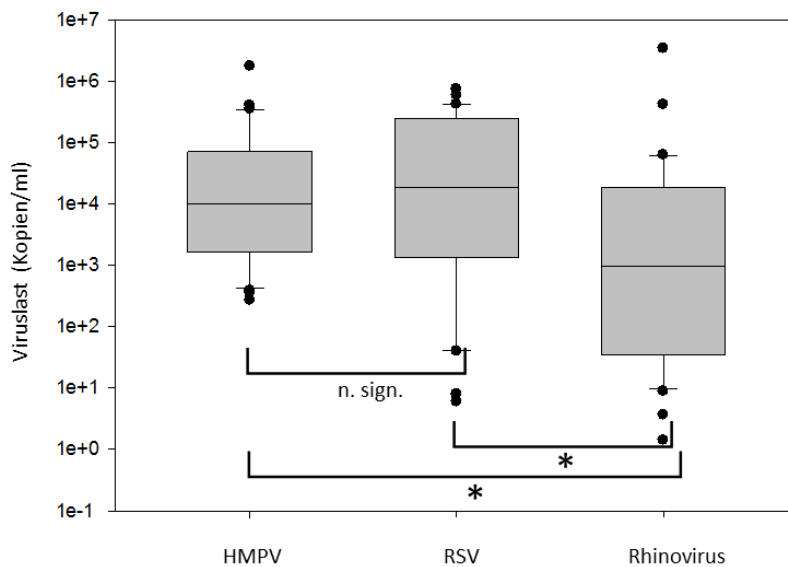


Abbildung 21: Korrelation zwischen Viruslast und Infektion * statistisch signifikant

3.5.3 Korrelation zwischen IL-8-Konzentration und Virusinfektion

Vergleicht man mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests den Median der IL-8-Konzentrationen in allen drei Kollektiven so sieht man, dass dieser mehr differiert, als es durch Zufall zu erwarten ist. Die Differenz zwischen den Gruppen ist mit einem p-Wert von kleiner 0.001 statistisch signifikant. Beim isolierten Vergleich der einzelnen Gruppen mit dem Tukey-Test und dem Mann-Whitney-U-Test ergibt sich ein signifikanter Unterschied in den IL-8-Medianwerten zwischen der Rhinovirus-Gruppe und der HMPV-Gruppe sowie der Rhinovirusgruppe und der RSV-Gruppe. Zwischen der RSV-Gruppe und der HMPV-Gruppe ergibt sich diese Signifikanz nicht. Die im obigen beschriebenen Zusammenhänge sind in der Tabelle 24 bis Tabelle 26 und der Abbildung 22 wiedergegeben.

Tabelle 24: IL-8-Konzentrationen Mediane: Kruskal-Wallis *One Way Analysis of Variance on Ranks*
Normality Test: Failed ($P < 0.050$)

Gruppe	N	Median ($\mu\text{g/ml}$)	25%	75%
HMPV	30	9.136	3.541	23.290
RSV	30	10.809	4.297	14.264
Rhinovirus	30	2.351*	1.314	3.914

H = 22.557 mit 2 Freiheitsgraden ($p \leq 0.001$) * statistisch signifikant gegenüber Vergleichsgruppen

Tabelle 25: Paarweiser Vergleich der einzelnen Kollektive mit dem Tukey Test

Vergleich	Difference of Ranks	q	P < 0.05
HMPV-IL8 vs Rhino-IL8	877.000	6.129	Ja*
HMPV-IL8 vs RSV-IL 8	98.000	0.685	Nein
RSV-IL8 vs Rhino-IL8	779.000	5.444	Ja*

* statistisch signifikant

Tabelle 26: Vergleich der RSV-Gruppe mit der Rhino-Gruppe mit dem Mann-Whitney-U-Test

Gruppe	N	Median	25%	75%
RSV-IL8	30	10.809	4.297	14.264
Rhino-IL8	30	2.351	1.314	3.914

Mann-Whitney U Statistik= 180.000 T = 1185.000 n(*small*)= 30 n(*big*)= 30 (P ≤ 0.001)

Der Unterschied in den Medianwerten der zwei Gruppen ist größer, als es durch Zufall zu erwarten ist. Es existiert ein statistisch signifikanter Unterschied ($p \leq 0.001$)

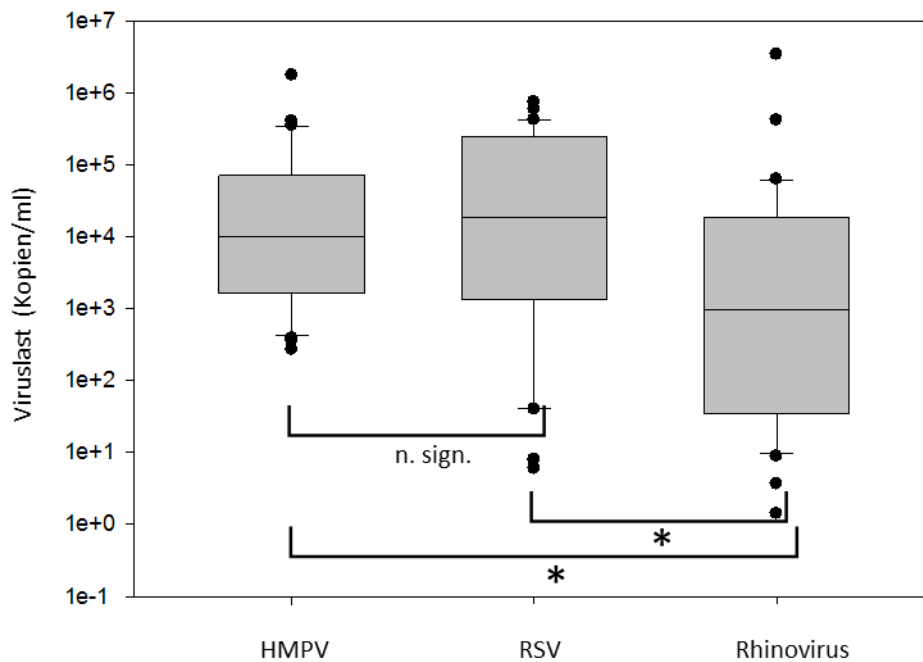


Abbildung 22: IL-8-Konzentration in Abhängigkeit von der Virusinfektion: * statistisch signifikant gegenüber Vergleichsgruppe.

3.5.4 Zusammenhang zwischen IL-8-Konzentration und Viruslast

Bei dem Versuch eine Korrelation zwischen IL-8-Konzentration und Viruslast herzustellen, ergab sich kein signifikanter Zusammenhang. Allerdings war, wie die drei folgenden Abbildungen zeigen, in der HMPV-Gruppe die Tendenz zu sehen, dass mit Abnahme der Viruslast auch die IL-8-Konzentration fällt. Ein solcher Trend war in der RSV-Gruppe und in der Rhinovirusgruppe nicht festzustellen.

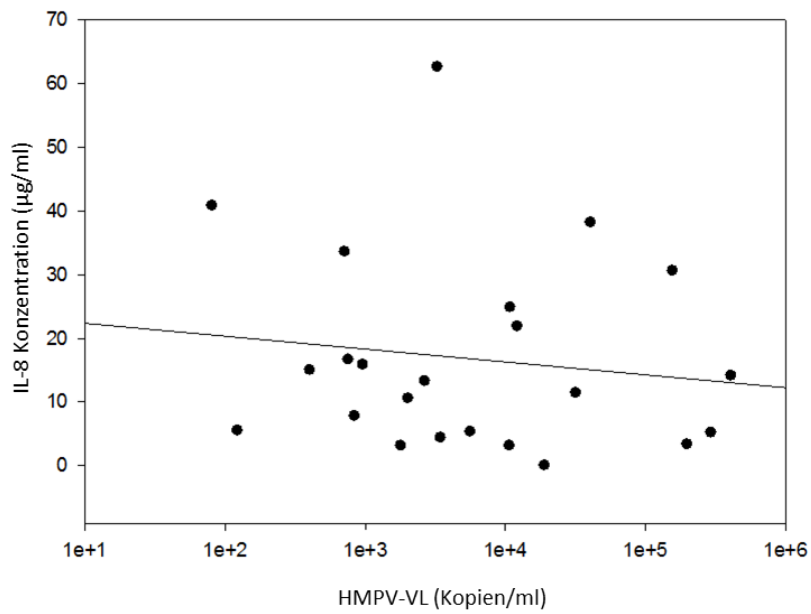


Abbildung 23: IL-8-Konzentration in Abhängigkeit von der HMPV-Viruslast. Der Strich zeigt die errechnete Regressionsgrade. Die Regressionsanalyse ergab ein $r = 0.137$.

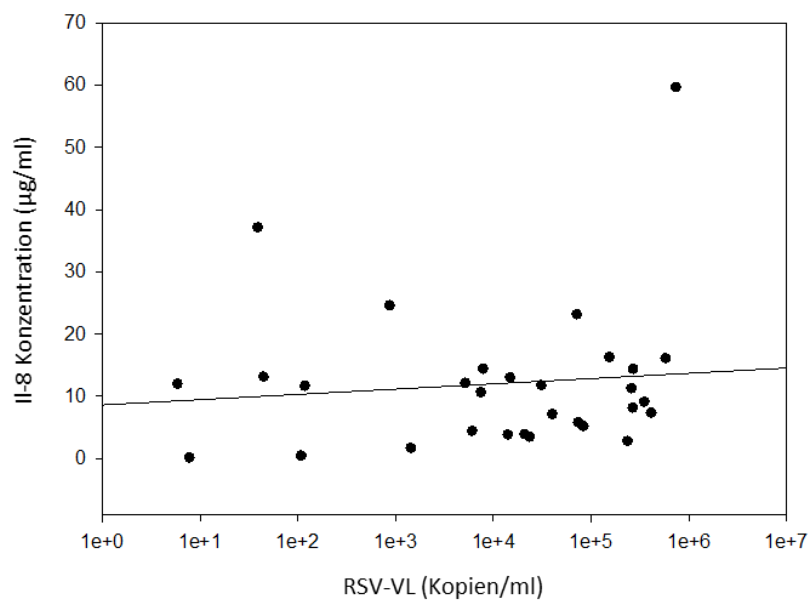


Abbildung 24: IL-8-Konzentration in Abhängigkeit von der RSV-Viruslast. Der Strich zeigt die errechnete Regressionsgrade. Die Regressionsanalyse ergab ein $r = 0,107$.

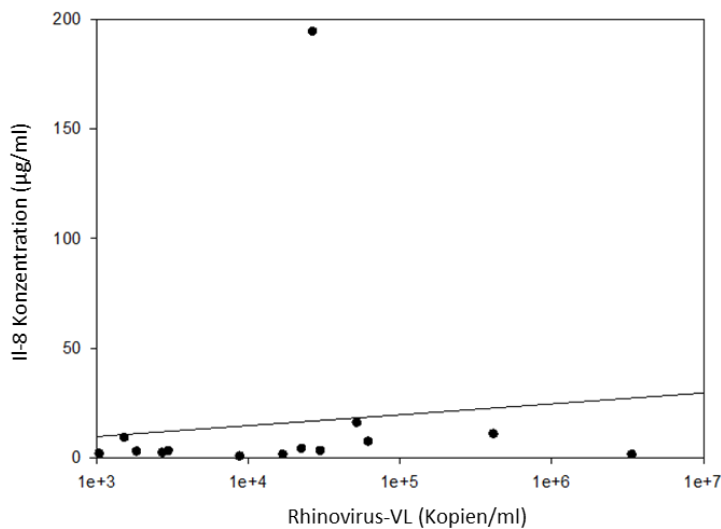


Abbildung 25: IL-8-Konzentration in Abhängigkeit von der Rhinoviruslast. Der Strich zeigt die errechnete Regressionsgrade. Die Regressionsanalyse ergab ein $r = 0,217$.

3.5.5 Korrelation zwischen Viruslast und Alter der Patienten

Wie auch bei dem Versuch einen Zusammenhang zwischen Viruslast und IL-8-Konzentration herzustellen, ergab sich auch für den Bezug der Viruslast auf das Patientenalter für alle drei Versuchskollektive keine signifikante Korrelation, wie die nachfolgenden Abbildungen Abbildung 26 bis Abbildung 28 zeigen. Jedoch zeigt sich die minimale Tendenz, dass die Viruslast mit Zunahme des Patientenalters sinkt, was auf eine im Alter zunehmende Immunkompetenz hindeuten könnte.

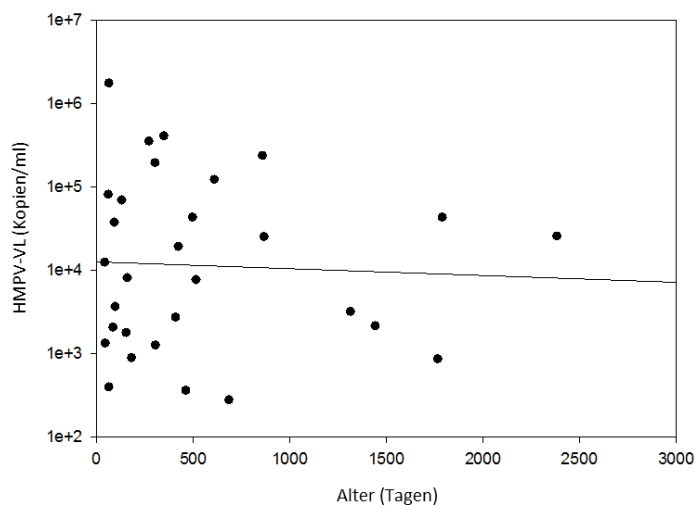


Abbildung 26: HMPV-Viruslast in Abhängigkeit vom Patientenalter. Der Strich zeigt die errechnete Regressionsgrade. Die Regressionsanalyse ergab ein $r = 0.049$.

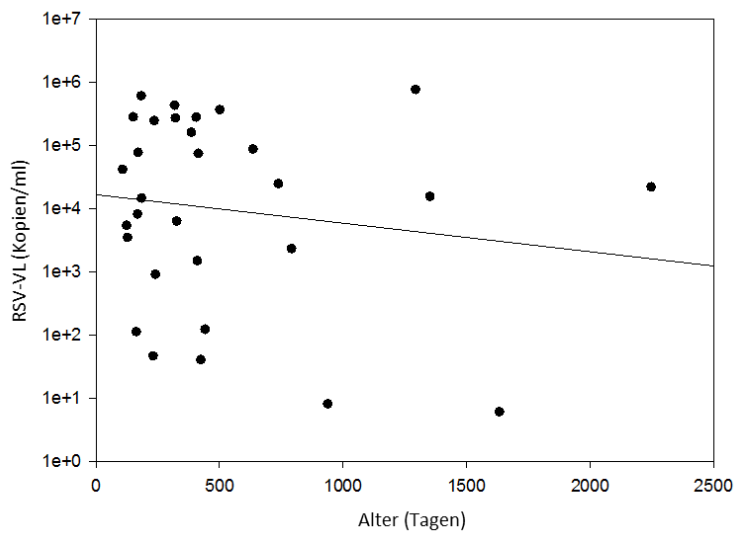


Abbildung 27: RSV-Viruslast in Abhängigkeit vom Patientenalter. Der Strich zeigt die errechnete Regressionsgrade. Die Regressionsanalyse ergab ein $r = 0.145$.

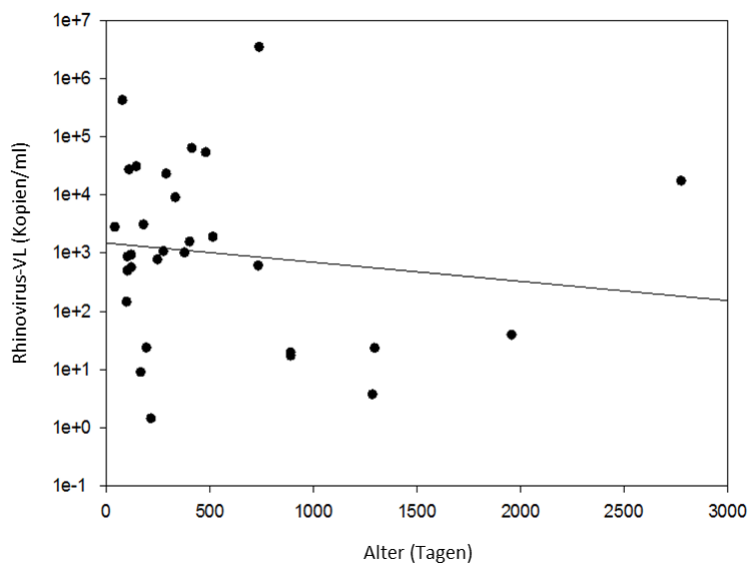


Abbildung 28: Rhinoviruslast in Abhängigkeit vom Patientenalter. Der Strich zeigt die errechnete Regressionsgrade. Die Regressionsanalyse ergab ein $r = 0.133$.

3.5.6 Korrelation von Virusinfektion und Klinik

3.5.6.1 Korrelation von klinischer Diagnose und Virusinfektion

In Tabelle 27 sind die klinischen Diagnosen in den drei Vergleichskollektiven zusammengefasst. Die drei Diagnosen „Pneumonie“, „obstruktive Bronchitis“ und „Bronchitis“ beziehungsweise „akute Bronchitis“ waren in allen Gruppen die häufigsten Diagnosen. Die Summe dieser drei Diagnosen macht in der HMPV- und in der Rhinovirusgruppe knapp drei Viertel (73%) aller Diagnosen aus, in der RSV-Gruppe sogar 90%. Fasst man nur die Anzahl der Pneumonien, der obstruktiven Bronchitiden und Bronchiolitiden, als Ausdruck einer besonders schweren klinischen Symptomatik der Infektion, zusammen, so fällt auf, dass in der RSV-Gruppe 80% der Kinder eine solche schwere Infektion der Atemwege hatten. Im Gegensatz dazu sind es in der HMPV-Gruppe nur 46.6% und in der Rhinovirus-Gruppe 56.6%. Statistisch signifikant war der Unterschied zwischen den Gruppen nicht. Die Abbildungen Abbildung 29 bis Abbildung 31 stellen die prozentuale Verteilung dar.

Tabelle 27: Anzahl der klinischen Diagnosen in den drei Gruppen.

Diagnose	HMPV-Gruppe	RSV-Gruppe	Rhinovirus-Gruppe
Pneumonie	8	14	8
Obstruktive Bronchitis	5	8	9
Bronchiolitis	1	2	0
(akute) Bronchitis	9	5	5
Akute Infektion obere Atemwege	2	1	3
Sonstige Atemwegsinfektion	2	0	0
Unbekannt	3	0	5

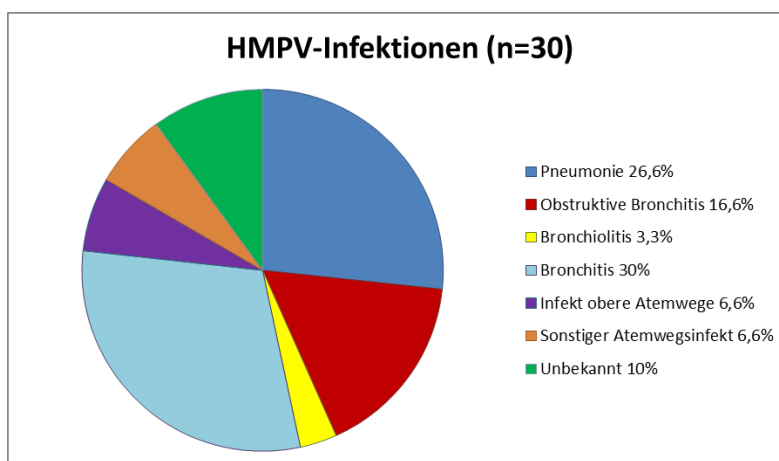


Abbildung 29: Prozentuale Verteilung der klinischen Diagnosen im HMPV-Kollektiv.

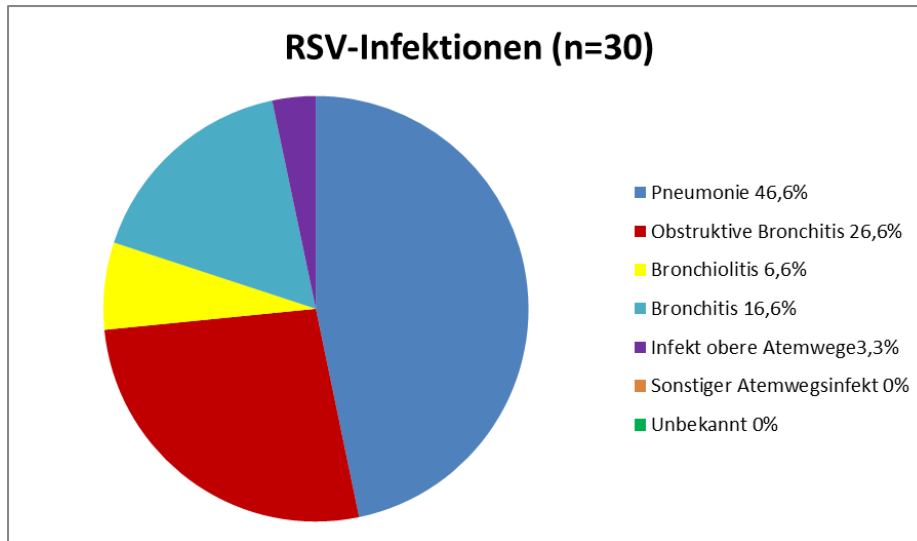


Abbildung 30: Prozentuale Verteilung der klinischen Diagnosen im RSV-Kollektiv.

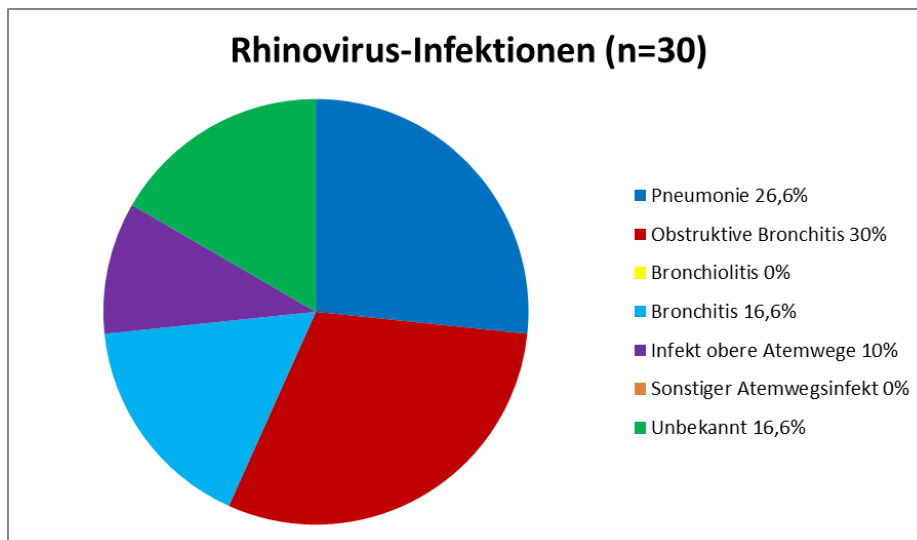


Abbildung 31: Prozentuale Verteilung der klinischen Diagnosen im Rhinovirus-Kollektiv.

3.5.6.2 Korrelation klinischer Parameter und Virusinfektion

Zur Einschätzung der Krankheitsschwere der Patienten wurden die klinischen Parameter maximale Fiebertemperatur (Abbildung 32), maximaler Leukozytenwert (Abbildung 33) und Erhöhung des CRP-Werts während der Infektion zu Grunde gelegt. Darüber hinaus wurde die Länge des Krankenhausaufenthaltes in Tagen ermittelt.

Beim Vergleich der drei Gruppen sieht man, dass der Median der Fiebertemperatur im HMPV- und RSV-Kollektiv annähernd gleich ist und deutlich über dem der Rhinovirusgruppe liegt. Mit einem p-Wert von 0.006 ist dieser Unterschied statistisch signifikant. Betrachtet man die

Leukozytenzahlen, lässt sich ein umgekehrter Trend entdecken, der ebenfalls mit einem p-Wert von 0.035 statistisch signifikant ist. Hier ist der Median in der Rhinovirusgruppe am höchsten. Der der RSV- und der HMPV-Gruppe liegt darunter, aber auch in diesem Vergleich ist der Wert für die beiden Gruppen annähernd gleich.

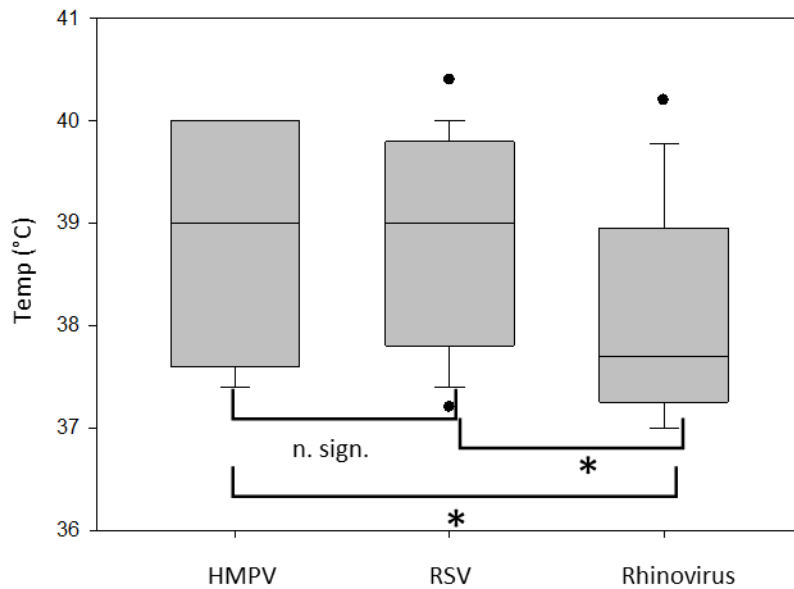


Abbildung 32: Maximale Fiebertemperaturen in den drei Vergleichskollektiven *statistisch signifikant gegenüber Vergleichsgruppen p=0.006

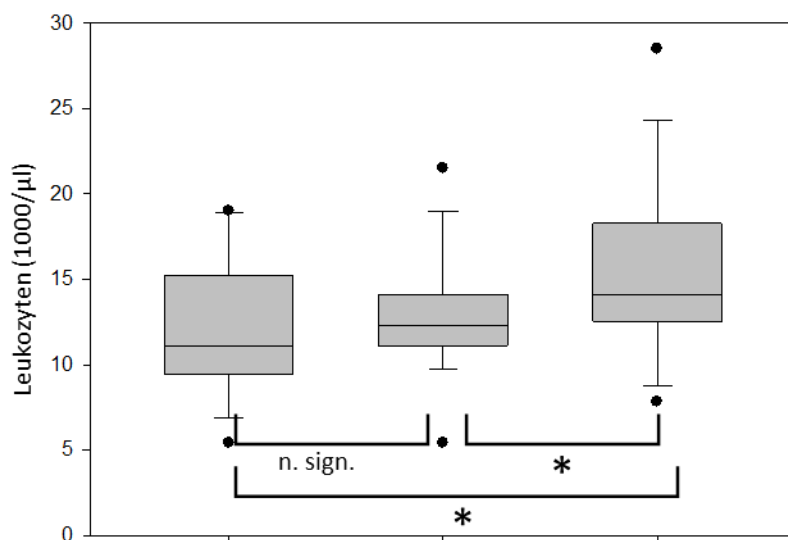


Abbildung 33: Maximale Leukozytenzahlen in den drei Vergleichskollektiven * statistisch signifikant gegenüber Vergleichsgruppen p=0.035

In Bezug auf den während der Infektion gemessenen CRP-Wert fand sich innerhalb der Gruppen kein signifikanter Unterschied, als Cut-off wurde hier ein CRP-Wert größer oder gleich 0,5 mg/dl festgelegt. Ein Wert oberhalb dieser Grenze fand sich bei 59% der HMPV-infizierten, bei 66% der RSV-infizierten und bei 74% der Rhinovirus-infizierten Kinder ($p=0.574$). Die Länge des Krankenhausaufenthaltes unterschied sich im Vergleich der drei Kollektive nicht statistisch signifikant mit einem p-Wert von 0.387, es zeigte sich jedoch die Tendenz eines insgesamt kürzeren Krankenhausaufenthaltes bei Kindern mit einer Rhinovirusinfektion. Diese blieben im Median drei Tage im Krankenhaus, gegenüber RSV-Infizierten (4 Tage) und HMPV-Infizierten (5,5 Tage). Eine Korrelation zwischen der Höhe der Viruslast und Krankheitsschwere (Höhe des Fiebers etc.) konnte nicht gefunden werden.

4 Diskussion

4.1 Genetische Analyse der HMPV-Infektion

Zur Subtypenanalyse des HMPV wurden die untersuchten Proben in einer *One-Step-RT-PCR* im N-Gen amplifiziert und anschließend sequenziert. Auf der Grundlage der Sequenzen wurde eine Phylogenie erstellt. In dem Untersuchungszeitraum (Dezember 2006 bis Januar 2008) wurden alle vier Subtypen, mit einer ganz klaren Prädominanz des Subtyps B1 (24 von 30 Proben), detektiert. Die Aussage, dass alle Subtypen zeitgleich, aber mit Vorherrschen eines Subtyps, grassieren, deckt sich mit den Studienergebnissen von Aberle (8). Seine Ergebnisse sind in Abbildung 34 zusammengefasst.

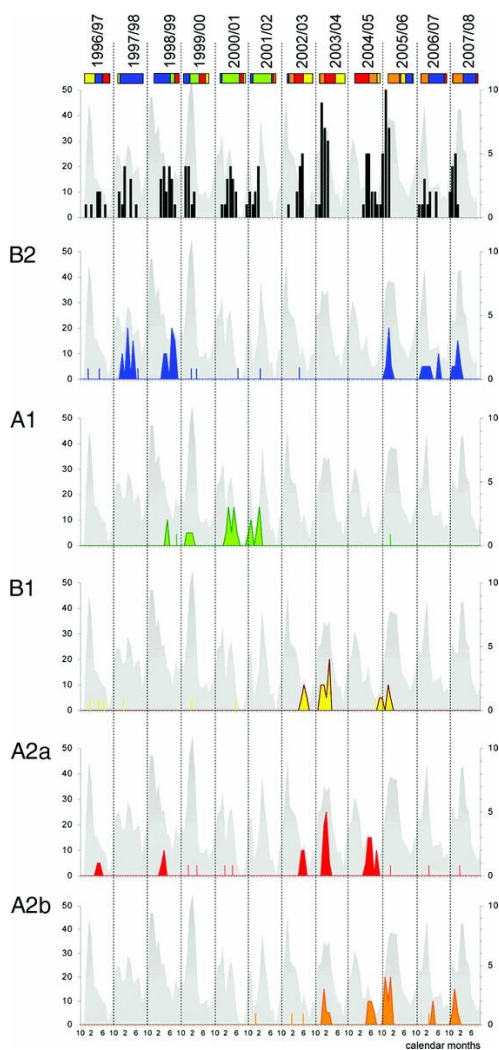


Abbildung 34: Saisonaltät der HMPV-Subtypen nach Aberle (8)

Aberle hat weiterhin festgestellt, dass dieser Subtyp alle ein bis drei Jahre durch einen anderen ersetzt wird. Für eine solche Auswertung ist der im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Studienzeitraum zu klein, es wäre aber eine interessante Frage für weitere Untersuchungen. Bei der Betrachtung der Abbildung 34 fällt auf, dass in dem hier untersuchten Zeitraum in der Studie von Aberle und Co vor allem der Subtyp B2 detektiert worden ist. Dies deckt sich nicht mit dem Subtyp unseres Kollektivs, allerdings untersuchte Aberle Proben von australischen Kindern. Man kann also die Aussage Aberles dahingehend erweitern, dass in einer Saison ein Subtyp dominiert, es aber geographische Unterschiede gibt. Zu RSV A und B gibt es ähnliche Untersuchungen: In einigen Studien wurde wie auch in unserem Kollektiv ein Überwiegen eines Subtyps in einer Saison beschrieben, jedoch ist auch eine Kozirkulation beider Subtypen in einer Saison, wenn auch weniger häufig, möglich (105) (43) (68). Dies zeigt eine weitere Gemeinsamkeit von HMPV und RSV, welche auch bezüglich des Genoms sehr nah miteinander verwandt sind. In Studien zu Rhinovirussubgruppen, in denen Bevölkerungsgruppen verglichen wurden, fiel auf, dass die zahlreichen Subtypen (mittlerweile sind über 100 bekannt) kozirkulieren und einzelne Subtypen sich in sehr kurzen Zeiträumen (vier bis sechs Wochen) häufen (113). Dieser natürliche Subtypenwechsel könnte dadurch erklärt werden, dass es ein Mechanismus der Viren ist, die Herstellung einer Herdenimmunität zu erschweren. Eine andere Erklärung wäre, dass die Bevölkerung dadurch, dass sie eine Immunität für einen bestimmten Subtyp aufbaut, vulnerabler für eine Infektion mit einem anderen Subtyp wird und so ein natürlicher Wechsel der prädominierenden Subtypen entsteht.

Bei der Auswertung des phylogenetischen Stammbaumes fiel die nahe Verwandtschaft mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% vor allem der Proben mit den VI-Nummern 41739, 41837 und 42608 auf. Diese Proben gingen in einem Abstand von nur vier Tagen im Institut für Virologie ein, sodass sich die Frage stellt, ob die Kinder, von denen die Proben stammen eventuell in Kontakt standen (gleiches Zimmer in der Kinderklinik) und es sich daher um eine nosokomiale Infektion handelt. Daraus würde folgen, dass die in dieser Arbeit angewandte Methodik in Zukunft auch für die Abklärung einer möglichen nosokomialen Infektionskette in der Klinik dienen könnte. Eine weitere mögliche Interpretation der Daten ist, dass gleiche Subtypen des Virus zu bestimmten Zeiten und in einer Region grassieren und somit zu einer subtypengleichen Infektion führen.

Da die HMPV-Proben für die Phylogenie im N-Gen sequenziert wurden, war eine Untersuchung der Nukleotid- und Aminosäure-Divergenzen des N-Gens über den Untersuchungszeitraum

möglich. Auffällig war, dass der Prozentsatz der Nukleotiddivergenzen größer als der der Aminosäuredivergenzen (siehe Tabelle 20 und Tabelle 21) war. Das heißt, dass ein Austausch eines Nukleotids nicht zwangsläufig zur Änderung einer Aminosäure führt. Dies spricht dafür, dass auf das Protein kein immunologischer Selektionsdruck ausgeübt wird. Das wäre bei einem internen Virusprotein aber auch nicht zu erwarten gewesen, sondern wird regelmäßig bei Proteinen auf der Oberfläche des Virus beobachtet. Bei umhüllten Viren sind dies die Glykoproteine, d.h. im Falle des HMPV das G bzw. F-Protein.

Bei einigen PCR-Läufen traten wie oben beschrieben unspezifische Banden auf. Gewöhnlich tritt dies durch eine zu niedrige *Annealing*-Temperatur auf. Viazov (143) inkubierte die identischen PCR-*Primer* bei 60°C und damit 5°C höher als in der hier vorliegenden Studie ohne unspezifische Banden zu beschreiben. Der Hersteller der Polymerase empfiehlt die hier verwendete Temperatur. Warum Viazov trotzdem eine höhere *Annealing*-Temperatur gewählt hat, ist der Publikation nicht zu entnehmen, ein Auftreten von unspezifischen Banden ist nicht beschrieben.

4.2 Zytokinbestimmung im ELISA

4.2.1 Interpretation der Ergebnisse des IL-8-ELISA

Die Interpretation der Ergebnisse des IL-8-ELISA erfolgt unter dem Punkt 4.5.

4.2.2 Interpretation des GCSF- und TNF- α -ELISA

Keine der oben untersuchten Proben war für GCSF oder TNF- α positiv. In Tierversuchen konnten GCSF- und TNF- α -Anstiege bei RSV- und HMPV-Infektionen nachgewiesen werden (49), jedoch scheint dies nicht einfach auf den Menschen übertragbar zu sein. In einer großen Studie, in der genauso wie in dieser Dissertation Nasopharynxaspirate von Patienten mit Respirationstraktinfektionen untersucht wurden, konnten zahlreiche Zytokine detektiert werden. GCSF wurde aber, da gemessene Werte nur knapp oberhalb der Nachweisgrenze lagen, aus der Auswertung genommen. Der Nachweis von GCSF in Nasopharynxaspiraten

scheint also problematisch zu sein. Für TNF- α konnten in der gleichen Studie hohe Werte detektiert werden (15). Eine mögliche Erklärung dafür, warum in der Studie TNF- α messbar war und in dieser Arbeit nicht, ist die Verwendung von unterschiedlichen Test-Kits. In dieser Arbeit wurde ein kommerziell erhältliches *Kit*, das ursprünglich für Serumproben entwickelt wurde, verwendet und angepasst (siehe Material und Methodenteil). Offen bleibt die Frage, ob GCSF auf Grund der Methodik nicht gemessen werden konnte, es bei RSV-, HMPV- und Rhinovirusinfektionen nicht vermehrt gebildet wird oder ob dieses zwar gebildet, aber nicht im Nasopharynxaspirat nachweisbar ist. Dies könnte mit einem experimentellen Ansatz, in dem Nasopharynxaspirate und Serumproben von Patienten auf GCSF parallel untersucht werden, geklärt werden.

4.3 Die Immunfluoreszenz

In an das Thema dieser Dissertation anschließenden späteren Untersuchungen wurden teilweise die gleichen RSV-positiven Proben untersucht, dabei konnten nicht alle oben genannten Ergebnisse bestätigt werden: Zuvor als positiv detektierte Aspire wurden später negativ auf die oben aufgeführten Antikörper getestet. Eine weitere Interpretation erscheint daher nicht sinnvoll. Das unter 3.3.1 beschriebene Phänomen der niedrigen HMPV-Antikörperprävalenz bei RSV-infizierten Kindern steht damit unter methodischen Vorbehalten und sollte in späteren Studien gezielt untersucht werden. Das Nasopharynxaspirat ist für Immunfluoreszenzuntersuchungen grundsätzlich ein schwieriges Material, bei dem unspezifisch fluoreszierende Partikel schnell zu unspezifischen Ergebnissen führen können. Neben diesen Spezifitätsproblemem wurde auch die Sensitivität der Immunfluoreszenz wie unter 3.3.2 beschrieben untersucht und als mögliche Ursache für die fehlende Reproduzierbarkeit in Betracht gezogen. Eine mögliche Erklärung dafür, dass die ursprünglichen Testergebnisse nicht reproduziert werden konnten ist, dass die Proben im Rahmen der Testverfahren mehrfach aufgetaut und wieder eingefroren wurden, dies könnte die Proteinstruktur der Antikörper zerstört haben. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der Antikörpernachweis im Nasensekret im IFT als problematisch anzusehen ist und für einen validen Einsatz weitere technische Verfeinerung vonnöten wäre.

4.4 Das HMPV-Kollektiv

Bei 23 der 30 HMPV-infizierten Patienten wurde ein zweites Nasopharynxaspirat eingesendet, sodass die Viruslast und die IL-8-Konzentration im zeitlichen Verlauf von einigen Tagen beurteilt werden konnte. Dabei konnte der Trend beobachtet werden, dass die Viruslast im Verlauf der Infektion abfällt. Allerdings ist dieses Ergebnis mit einem p-Wert von 0.061 knapp nicht statistisch signifikant. In einer mit einer größeren Gruppengröße designten Studie zeigt sich der gleiche Verlauf bezüglich der Viruslast, jedoch statistisch signifikant (41). Bislang gibt es wenige Studien zum Verlauf der Viruslast. Aktuellere Untersuchungen konnten aber eine deutliche Korrelation zwischen der Höhe der Viruslast und der Krankheitsschwere feststellen: je höher die Viruslast, desto schwerer die klinische Symptomatik (70) (22) (64) (88). Ein solcher Zusammenhang ist auch hier zu vermuten, da die zweite Probe in der Regel am Entlassungstag, also bei in der Regel sichtbarer Verbesserung der klinischen Symptomatik, entnommen wurde. Die IL-8-Konzentration blieb in dem kurzen Zeitraum zwischen den Entnahmen - maximaler zeitlicher Abstand vier Tage – konstant, was vermuten lässt, dass die Normalisierung der serologischen Parameter der Verbesserung der klinischen Symptomatik hinterherhängt. Zum Verlauf des IL-8-Spiegels bei HMPV gibt es bislang kaum Daten, dies wäre eine interessante weitere Fragestellung insbesondere im Vergleich zu RSV. Allerdings existiert eine Dissertation, die sich mit dem Verlauf des IL-8 bei bakteriellen Infektionen beschäftigt: Hier zeigt sich bereits ein Abfall nach 12 Stunden (100).

4.5 HMPV-, RSV- und Rhinovirusinfektion im Vergleich

Die saisonale Verteilung der Proben ergab ein Bild, wie es in vielen Publikationen beschrieben wurde: Die in dieser Arbeit auf RSV und HMPV positiv getesteten Proben gingen im Winter und Frühjahr im Institut für Virologie ein und die für Rhinovirus positiven Proben das ganze Jahr über, jedoch überwiegend in den kalten Monaten (120) (96) (94) (93). Es ist jedoch zu betonen, dass die Untersuchung der Saisonalität nicht das primäre Ziel dieser Studie war.

Die Viruslast im RSV- und im HMPV-Kollektiv war annähernd gleich, aber statistisch signifikant oberhalb derer des Rhinoviruskollektivs. In einer Studie von García et al werden die Konzentrationen von verschiedenen Zytokinen, die in Nasopharynxaspiraten von an RSV und Rhinovirus erkrankten Kindern gemessen wurden, verglichen. Analog zu dem Ergebnis in dieser

Dissertation lag die IL-8-Konzentration in den RSV-positiven Proben oberhalb derjenigen in den Rhinovirus-positiven Proben (44).

Laham et al haben festgestellt, dass die IL-8-Konzentration bei Patienten mit HMPV-Infektionen statistisch signifikant unter der von RSV-Patienten liegt. Dies widerspricht unseren Ergebnissen, in denen die IL-8-Konzentrationen von RSV und HMPV nahezu gleich waren, allerdings statistisch signifikant oberhalb der bei Rhinovirusinfektionen liegt (77). Das wirft die Frage auf, woher dieser Unterschied kommt. Da innerhalb der HMPV-Gruppe dieser Arbeit der Subtyp B1 deutlich vorherrschend war, könnte eine Erklärung sein, dass die unterschiedlichen HMPV-Subtypen unterschiedlich hohe IL-8-Werte verursachen, analog zu einer verschiedenen Krankheitsschwere von HMPV A und B, von der in einigen Publikationen berichtet wurde (144). Eine Subtypenuntersuchung hat bei Laham et al nicht stattgefunden. Darüber hinaus ist das Patientenkollektiv auf Grund eines Altersunterschiedes nicht komplett vergleichbar. Bei Laham et al waren die in die Studie eingeschlossenen Patienten maximal ein Jahr alt. Ebenfalls hat ein *Altersmatching* zur Minimierung eben jeder Alterseffekte wie in dieser Arbeit nicht stattgefunden.

Ein statistischer Zusammenhang zwischen der IL-8-Konzentration und der Viruslast konnte nicht gefunden werden. Im Infektionsverlauf sollte beides abfallen, jedoch ist der zeitliche Verlauf des IL-8-Spiegels noch nicht ganz klar (siehe auch 4.4).

In allen drei Gruppen sank mit zunehmendem Alter die Viruslast, was durch die mit dem Alter der Patienten steigenden Immunität und damit der Ausbildung des spezifischen Immunsystems erklärt werden könnte.

Bei dem Vergleich der klinischen Diagnosen in den drei Kollektiven fiel auf, dass besonders Kinder mit RSV-Infektionen vermehrt eine komplizierte/schwerwiegende Klinik boten: Eine schwere Atemwegsinfektion (Pneumonie, obstruktive Bronchitis und Bronchiolitis) hatten (80%) der RSV-Infizierten, gefolgt von Rhinoviren (56.6%) und zuletzt HMPV (46.6%). Der hohe Anteil an „schwerwiegenden Diagnosen“ in der RSV-Gruppe stützt die Vermutung einiger Arbeiten, dass es durch RSV zu einer größeren Krankheitsschwere als durch HMPV und Rhinoviren kommt, wie zum Beispiel in einer Publikation von Boivin et al (19). Jedoch ist die Studienlage dazu widersprüchlich.

In anderen Arbeiten wurde für RSV und HMPV eine ähnliche Krankheitsschwere festgestellt: (150) (147) (146). C. Marguet et al kamen bei dem Vergleich der Krankheitsschwere in ihrer Studie zu dem Ergebnis, dass RSV-infizierte Personen zwar länger hospitalisiert waren, jedoch

HMPV-infizierte Patienten häufiger sauerstoffpflichtig wurden (87). Bei der Betrachtung der hier untersuchten Vergleichskollektive, insbesondere in Hinblick auf die klinischen Parameter (Temperatur, Leukozytenzahlen, CRP und Länge des Krankenhausaufenthaltes), wird dies auch bestätigt. Es konnte kein signifikanter Unterschied im klinischen Verlauf einer HMPV- und RSV-Infektion gefunden werden: Die Fieberwerte der RSV- und der HMPV-Gruppe waren fast gleich und lagen statistisch signifikant über denen der Rhinovirusgruppe. Im Gegensatz dazu hatten Kinder mit Rhinovirusinfektionen eine Leukozytose im Vergleich zu denen der anderen beiden Gruppen. Die Leukozytenzahlen von den HMPV- und RSV-Infizierten unterschieden sich kaum. Bei dem Vergleich der Länge des Krankenhausaufenthaltes zeigte sich die Tendenz eines insgesamt kürzeren Krankenhausaufenthaltes bei Kindern mit einer Rhinovirusinfektion gegenüber denen mit einer HMPV- oder RSV-Infektion, was für einen milderen Verlauf der Rhinovirusinfektion spricht, mit einer passend dazu niedrigeren Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokin IL-8. Die demgegenüber erhöhten Leukozytenwerte sprechen dafür, dass lokale und systemische Immunreaktionen unterschiedlich zu sein scheinen, was in gezielten Studien weiter geklärt werden könnte.

Zusammenfassend kann man also festhalten, dass HMPV-, RSV- und Rhinovirusinfektionen an Hand des klinischen Bildes nicht sicher differenziert werden können. Dies ist nur durch molekulare Techniken, wie zum Beispiel der RT-PCR möglich. Während Rhinovirusinfektionen einen scheinbar milderen Verlauf haben, sind RSV- und HMPV-Infektionen vom klinischen Bild sehr ähnlich und verdienen daher die gleiche klinische Beachtung.

5 Zusammenfassung

Virusinfektionen des Respirationstraktes sind eine der häufigsten Krankheits- und Todesursachen im Kindesalter. Eine Vielzahl humanpathogener Viren ist bereits seit Jahrzehnten bekannt, das humane Metapneumovirus (HMPV) wurde jedoch erst im Jahre 2001 entdeckt. Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich zum einem mit dem Nachweis verschiedener Subtypen des HMPV sowie mit dem Vergleich der Immunantwort und der Schwere des klinischen Verlaufs zwischen HMPV-, RSV- und Rhinovirusinfektionen. Ein phylogenetischer Stammbaum der HMPV-positiven Proben konnte mittels einer RT-PCR und anschließender Sequenzierung des N-Gens erstellt werden. Im Untersuchungskollektiv konnten alle vier Subtypen des HMPV nachgewiesen werden mit einer deutlichen Prädominanz des Subtyps B1 (80% der Proben). Darüber hinaus wurden Zytokin-ELISA für die Detektion von IL-8, GCSF und TNF- α , sowie Immunfluoreszenztests zur Messung von IgG und IgA der untersuchten drei Viren im Nasopharynxaspirat etabliert. Im Vergleich der drei Kollektive zeigte sich, dass die Viruslast bei RSV- und HMPV-Infektionen annähernd gleich und statistisch signifikant oberhalb derer von Rhinovirusinfektionen lag (analog zu der IL-8-Konzentration). Die Diagnose eines schweren Atemwegsinfektes war bei RSV am häufigsten (80%), gefolgt von Rhinovirus (56.6%) und HMPV (46.6%). Die Fieberwerte der RSV- und HMPV-Gruppe waren fast gleich und lagen statistisch signifikant über denen der Rhinovirusgruppe. Im Gegensatz dazu hatten Kinder mit einer Rhinovirusinfektion höhere Leukozytenwerte gegenüber denen mit einer HMPV oder RSV-Infektion. Anhand von sequentiellen Proben von HMPV erkrankten Kindern konnte gezeigt werden, dass in einem relativ kurzem Zeitraum von ca. 4 Tagen die Viruslast abfällt, die IL-8-Konzentration jedoch konstant bleibt. Die saisonale Verteilung der Infektionen ergab folgendes Bild: RSV und HMPV-Infektion kamen im Winter und Frühjahr deutlich gehäuft vor, während Rhinovirusinfektionen über das ganze Jahr mit einer zusätzlichen Häufung in den kalten Monaten zu finden waren. Zusammenfassend kann man sagen, dass RSV, HMPV sowie Rhinovirusinfektionen im Einzelfall weder klinisch noch durch Routine-Laborparameter unterscheidbar sind, sich aber bei vergleichender Betrachtung der Kollektive einige signifikante Unterschiede nachweisen lassen. Klar zu unterscheiden sind diese Infektionen nur durch den spezifischen Virusnachweis, der heutzutage meist mit Hilfe molekularer Diagnostik erfolgt.

6 Literatur

Reference List

1. **Corpus Hippocraticum: De mulierum affectibus 1,90**
2. **E. de Castro, C. Hulo, P. Masson, P. Le Mercier, Swiss Institute of Bioinformatics, http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/89.html, Zugriffsdatum: 17.08.2014**
3. **E. de Castro, C. Hulo, P. Masson, P. Le Mercier, Swiss Institute of Bioinformatics, http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/89.html, Zugriffsdatum: 16.08.2014**
4. **E. de Castro, C. Hulo, P. Masson, P. Le Mercier, Swiss Institute of Bioinformatics, http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/90.html, Zugriffsdatum: 17.08.2014**
5. **L. Stannard, <http://virology-online.com/viruses/RSV.htm>, Zugriffsdatum: 17.08.2014**
6. **E. de Castro, C. Hulo, P. Masson, P. Le Mercier, Swiss Institute of Bioinformatics, http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/33.html, Zugriffsdatum: 17.08.2014**
7. **E. de Castro, C. Hulo, P. Masson, P. Le Mercier, Swiss Institute of Bioinformatics, http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/33.html, Zugriffsdatum: 16.08.2014**
8. **Aberle, J. H., S. W. Aberle, M. Redlberger-Fritz, M. J. Sandhofer, and T. Popow-Kraupp. 2010. Human metapneumovirus subgroup changes and seasonality during epidemics. The Pediatric infectious disease journal 29:1016.**
9. **Aberle, S. W., J. H. Aberle, M. J. Sandhofer, E. Pracher, and T. Popow-Kraupp. 2008. Biennial spring activity of human metapneumovirus in Austria. The Pediatric infectious disease journal 27:1065.**
10. **Åkerlind, B. and E. Norrby. 1986. Occurrence of respiratory syncytial virus subtypes A and B strains in Sweden. Journal of medical virology 19:241-247.**
11. **Baggiolini, M. and I. Clark-Lewis. 1992. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. FEBS letters 307:97-101.**
12. **Baggiolini, M., A. Walz, and S. L. Kunkel. 1989. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. Journal of Clinical Investigation 84:1045.**
13. **Bastien, N., L. Liu, D. Ward, T. Taylor, and Y. Li. 2004. Genetic variability of the G glycoprotein gene of human metapneumovirus. Journal of clinical microbiology 42:3532.**
14. **Beneri, C., C. C. Ginocchio, R. Manji, and S. Sood. 2009. Comparison of clinical features of pediatric respiratory syncytial virus and human metapneumovirus infections. Infection control and hospital epidemiology 30:1240-1242.**
15. **Bermejo-Martin, J. F., M. C. Garcia-Arevalo, A. Alonso, R. O. De Lejarazu, M. Pino, S. Resino, A. Tenorio, D. Bernardo, A. J. Leon, and J. A. Garrote. 2007. Persistence of proinflammatory response after severe respiratory syncytial virus disease in children. The Journal of allergy and clinical immunology 119:1547.**

16. **Biacchesi, S., Q. N. Pham, M. H. Skiadopoulos, B. R. Murphy, P. L. Collins, and U. J. Buchholz. 2005. Infection of nonhuman primates with recombinant human metapneumovirus lacking the SH, G, or M2-2 protein categorizes each as a nonessential accessory protein and identifies vaccine candidates. *Journal of virology* 79:12608.**
17. **Biacchesi, S., M. H. Skiadopoulos, G. Boivin, C. T. Hanson, B. R. Murphy, P. L. Collins, and U. J. Buchholz. 2003. Genetic diversity between human metapneumovirus subgroups. *Virology* 315:1-9.**
18. **Boivin, G., Y. Abed, G. Pelletier, L. Ruel, D. Moisan, S. Côté, T. C. T. Peret, D. D. Erdman, and L. J. Anderson. 2002. Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *Journal of Infectious Diseases* 186:1330.**
19. **Boivin, G., G. De Serres, S. Côté, R. Gilca, Y. Abed, L. Rochette, M. G. Bergeron, and P. Déry. 2003. Human metapneumovirus infections in hospitalized children. *Emerging infectious diseases* 9:634.**
20. **Bonzel, L., T. Tenenbaum, H. Schrotten, O. Schildgen, S. Schweitzer-Krantz, and O. Adams. 2008. Frequent detection of viral coinfection in children hospitalized with acute respiratory tract infection using a real-time polymerase chain reaction. *The Pediatric infectious disease journal* 27:589.**
21. **Bonzel, L., T. Tenenbaum, H. Schrotten, O. Schildgen, S. Schweitzer-Krantz, and O. Adams. 2008. Frequent detection of viral coinfection in children hospitalized with acute respiratory tract infection using a real-time polymerase chain reaction. *Pediatr.Infect.Dis.J.* 27:589-594. doi:10.1097/INF.0b013e3181694fb9 [doi].**
22. **Bosis, S., S. Esposito, A. D. Osterhaus, E. Tremolati, E. Begliatti, C. Tagliabue, F. Corti, N. Principi, and H. G. Niesters. 2008. Association between high nasopharyngeal viral load and disease severity in children with human metapneumovirus infection. *J.Clin.Virol.* 42:286-290. doi:S1386-6532(08)00126-1 [pii];10.1016/j.jcv.2008.03.029 [doi].**
23. **Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72:248-254. doi:S0003269776699996 [pii].**
24. **Bystry, R. S., V. Aluvihare, K. A. Welch, M. Kallikourdis, and A. G. Betz. 2001. B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. *Nature immunology* 2:1126-1132.**
25. **CHANOCK, R., B. ROIZMAN, and R. MYERS. 1957. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization. *American journal of hygiene* 66:281.**
26. **Chonmaitree, T., K. Revai, J. J. Grady, A. Clos, J. A. Patel, S. Nair, J. Fan, and K. J. Henrickson. 2008. Viral upper respiratory tract infection and otitis media complication in young children. *Clinical infectious diseases* 46:815.**
27. **Cuevas, L. E., A. M. B. Nasser, W. Dove, R. Q. Gurgel, J. Greensill, and C. A. Hart. 2003. Human metapneumovirus and respiratory syncytial virus, Brazil. *Emerging infectious diseases* 9:1626.**

28. Døllner, H., K. Risnes, A. Radtke, and S. A. Nordbø. 2004. Outbreak of human metapneumovirus infection in Norwegian children. *The Pediatric infectious disease journal* 23:436.
29. De Boeck, K., N. Van Der Aa, S. Van Lierde, L. Corbeel, and R. Eeckels. 1997. Respiratory syncytial virus bronchiolitis: a double-blind dexamethasone efficacy study. *The Journal of pediatrics* 131:919-921.
30. Douglas Jr, R. G., K. M. Lindgren, and R. B. Couch. 1968. Exposure to cold environment and rhinovirus common cold. *New England Journal of Medicine* 279:742-747.
31. Ebihara, T., R. Endo, H. Kikuta, N. Ishiguro, M. Yoshioka, X. Ma, and K. Kobayashi. 2003. Seroprevalence of human metapneumovirus in Japan. *Journal of medical virology* 70:281-283.
32. Edell, D., V. Khoshoo, G. Ross, and K. Salter. 2002. Early Ribavirin Treatment of Bronchiolitis*. *Chest* 122:935-939.
33. Esper, F., D. Boucher, C. Weibel, R. A. Martinello, and J. S. Kahn. 2003. Human metapneumovirus infection in the United States: clinical manifestations associated with a newly emerging respiratory infection in children. *Pediatrics* 111:1407.
34. Falsey, A. R., D. Erdman, L. J. Anderson, and E. E. Walsh. 2003. Human metapneumovirus infections in young and elderly adults. *Journal of Infectious Diseases* 187:785.
35. Falsey, A. R., M. A. Formica, and E. E. Walsh. 2002. Diagnosis of respiratory syncytial virus infection: comparison of reverse transcription-PCR to viral culture and serology in adults with respiratory illness. *Journal of clinical microbiology* 40:817.
36. Falsey, A. R. and E. E. Walsh. 2000. Respiratory syncytial virus infection in adults. *Clinical Microbiology Reviews* 13:371.
37. Fauquet, C. 2005. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: eighth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*. Academic Press.
38. Fearn, R. and P. L. Collins. 1999. Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. *Journal of virology* 73:5852.
39. Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 783-791.
40. Fodha, I., L. Legrand, A. Vabret, T. Jrad, N. Gueddiche, A. F. Trabelsi, and F. Freymuth. 2004. Detection of human metapneumovirus in two Tunisian children. *Annals of Tropical Paediatrics: International Child Health* 24:275-276.
41. Franz, A., O. Adams, R. Willems, L. Bonzel, N. Neuhausen, S. Schweizer-Krantz, J. U. Rugeberg, R. Willers, B. Henrich, and H. Schrotten. 2010. Correlation of viral load of respiratory pathogens and co-infections with disease severity in children hospitalized for lower respiratory tract infection. *Journal of clinical virology* 48:239-245.
42. Freymuth, F., A. Vabret, L. Legrand, N. Eterradossi, F. Lafay-Delaire, J. Brouard, and B. Guillois. 2003. Presence of the new human metapneumovirus in French children with bronchiolitis. *The Pediatric infectious disease journal* 22:92.

43. Galiano, M. C., C. Palomo, C. M. Videla, J. Arbiza, J. A. Melero, and G. Carballal. 2005. Genetic and antigenic variability of human respiratory syncytial virus (groups a and b) isolated over seven consecutive seasons in Argentina (1995 to 2001). *Journal of clinical microbiology* 43:2266.
44. García, C., A. Soriano-Fallas, J. Lozano, N. Leos, A. M. Gomez, O. Ramilo, and A. Mejias. 2012. Decreased Innate Immune Cytokine Responses Correlate With Disease Severity in Children With Respiratory Syncytial Virus and Human Rhinovirus Bronchiolitis. *The Pediatric infectious disease journal* 31:86.
45. García-García, M. L., C. Calvo, I. Casas, T. Bracamonte, A. Rellan, F. Gozalo, T. Tenorio, and P. Pérez Breña. 2007. Human metapneumovirus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma at age 5. *Pediatric pulmonology* 42:458-464.
46. Garrison, M. M., D. A. Christakis, E. Harvey, P. Cummings, and R. L. Davis. 2000. Systemic corticosteroids in infant bronchiolitis: a meta-analysis. *Pediatrics* 105:e44.
47. Gern, J. E. and W. W. Busse. 1999. Association of rhinovirus infections with asthma. *Clinical Microbiology Reviews* 12:9.
48. Gomez-Cambronero, J., J. Horn, C. C. Paul, and M. A. Baumann. 2003. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a chemoattractant cytokine for human neutrophils: involvement of the ribosomal p70 S6 kinase signaling pathway. *The Journal of Immunology* 171:6846.
49. Guerrero-Plata, A., A. Casola, and R. P. Garofalo. 2005. Human metapneumovirus induces a profile of lung cytokines distinct from that of respiratory syncytial virus. *Journal of virology* 79:14992.
50. Gwaltney Jr, J. M. 1975. Rhinoviruses. *The Yale journal of biology and medicine* 48:17.
51. Gwaltney Jr, J. M., J. O. Hendley, G. Simon, and W. S. Jordan Jr. 1966. Rhinovirus infections in an industrial population. *New England Journal of Medicine* 275:1261-1268.
52. Gwaltney, J. M. and J. Hendley. 1982. Transmission of experimental rhinovirus infection by contaminated surfaces. *American Journal of Epidemiology* 116:828.
53. Gwaltney, J. M., J. O. Hendley, G. Simon, and W. S. Jordan. 1967. Rhinovirus infections in an industrial population. *JAMA: the journal of the American Medical Association* 202:494.
54. Gwaltney, J. M., P. B. Moskalski, and J. O. Hendley. 1978. Hand-to-hand transmission of rhinovirus colds. *Annals of Internal Medicine* 88:463.
55. Haeberle, H. A., W. A. Kuziel, H. J. Dieterich, A. Casola, Z. Gatalica, and R. P. Garofalo. 2001. Inducible expression of inflammatory chemokines in respiratory syncytial virus-infected mice: role of MIP-1 {alpha} in lung pathology. *Journal of virology* 75:878.
56. Hall, C. B., R. G. Douglas Jr, J. M. Geiman, and M. K. Messner. 1975. Nosocomial respiratory syncytial virus infections. *New England Journal of Medicine* 293:1343-1346.
57. Hall, C. B., R. G. Douglas, and J. M. Geiman. 1980. Possible transmission by fomites of respiratory syncytial virus. *Journal of Infectious Diseases* 141:98.

-
58. Hall, C. B., J. M. Geiman, R. G. Douglas, and M. P. Meagher. 1978. Control of nosocomial respiratory syncytial viral infections. *Pediatrics* 62:728.
 59. Hamory, B. H., M. A. Sande, A. Sydnor, D. L. Seale, and J. M. Gwaltney. 1979. Etiology and antimicrobial therapy of acute maxillary sinusitis. *Journal of Infectious Diseases* 139:197.
 60. Hayden, F. G. and J. M. Gwaltney. 1983. Intranasal interferon + β 2 for prevention of rhinovirus infection and illness. *Journal of Infectious Diseases* 148:543.
 61. Hayden, F. G., D. T. Herrington, T. L. Coats, K. Kim, E. C. Cooper, S. A. Villano, S. Liu, S. Hudson, D. C. Pevear, and M. Collett. 2003. Efficacy and safety of oral pleconaril for treatment of colds due to picornaviruses in adults: results of 2 double-blind, randomized, placebo-controlled trials. *Clinical infectious diseases* 36:1523.
 62. Heikkinen, T. and T. Chonmaitree. 2003. Importance of respiratory viruses in acute otitis media. *Clinical Microbiology Reviews* 16:230.
 63. Hickner, J. M., J. G. Bartlett, R. E. Besser, R. Gonzales, J. R. Hoffman, and M. A. Sande. 2001. Principles of appropriate antibiotic use for acute rhinosinusitis in adults: background. *Annals of Internal Medicine* 134:498-505.
 64. Houben, M. L., F. E. Coenjaerts, J. W. Rossen, M. E. Belderbos, R. W. Hofland, J. L. Kimpen, and L. Bont. 2010. Disease severity and viral load are correlated in infants with primary respiratory syncytial virus infection in the community. *J.Med.Virol.* 82:1266-1271. doi:10.1002/jmv.21771 [doi].
 65. Hu, A., M. Colella, J. S. Tam, R. Rappaport, and S. M. Cheng. 2003. Simultaneous detection, subgrouping, and quantitation of respiratory syncytial virus A and B by real-time PCR. *Journal of clinical microbiology* 41:149.
 66. Ijpma, F. F. A., D. Beekhuis, M. F. Cotton, C. H. Pieper, J. L. L. Kimpen, B. G. van den Hoogen, G. J. J. van Doornum, and D. M. E. Osterhaus. 2004. Human metapneumovirus infection in hospital referred South African children. *Journal of medical virology* 73:486-493.
 67. Imakita, M., K. Shiraki, C. Yutani, and H. Ishibashi-Ueda. 2000. Pneumonia caused by rhinovirus. *Clinical infectious diseases* 30:611.
 68. Imaz, M. S., M. D. Sequeira, C. Videla, I. Veronessi, R. Cociglio, E. Zerbini, and G. Carballal. 2000. Clinical and epidemiologic characteristics of respiratory syncytial virus subgroups A and B infections in Santa Fe, Argentina. *Journal of medical virology* 61:76-80.
 69. Ishiguro, N., T. Ebihara, R. Endo, X. Ma, H. Kikuta, H. Ishiko, and K. Kobayashi. 2004. High genetic diversity of the attachment (G) protein of human metapneumovirus. *Journal of clinical microbiology* 42:3406.
 70. Jansen, R. R., J. Schinkel, I. Dek, S. M. Koekkoek, C. E. Visser, M. D. De Jong, R. Molenkamp, and D. Pajkrt. 2010. Quantitation of respiratory viruses in relation to clinical course in children with acute respiratory tract infections. *The Pediatric infectious disease journal* 29:82.
 71. Kahn, J. S. 2006. Epidemiology of human metapneumovirus. *Clin.Microbiol.Rev.* 19:546-557. doi:19/3/546 [pii];10.1128/CMR.00014-06 [doi].

-
72. Kapikian, A. Z., R. M. Conant, V. V. Hamparian, R. M. Chanock, P. J. Chapple, E. C. Dick, J. D. Fenters, J. M. Gwaltney Jr, D. Hamre, and J. C. Holper. 1967. Rhinoviruses: a numbering system. *Nature* 213:761-762.
 73. KENNY, G. E., M. K. COONEY, and D. J. THOMPSON. 1970. Analysis of serum pooling schemes for identification of large numbers of viruses. *American Journal of Epidemiology* 91:439.
 74. Kirkpatrick, G. L. 1996. The common cold. *Primary Care: Clinics in Office Practice* 23:657-675.
 75. Krilov, L., L. Pierik, E. Keller, K. Mahan, D. Watson, M. Hirsch, V. Hamparian, and K. McIntosh. 1986. The association of rhinoviruses with lower respiratory tract disease in hospitalized patients. *Journal of medical virology* 19:345-352.
 76. Kuiken, T., B. G. van den Hoogen, D. A. J. van Riel, J. D. Laman, G. van Amerongen, L. Sprong, R. A. M. Fouchier, and A. D. M. E. Osterhaus. 2004. Experimental human metapneumovirus infection of cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) results in virus replication in ciliated epithelial cells and pneumocytes with associated lesions throughout the respiratory tract. *The American journal of pathology* 164:1893.
 77. Laham, F. R., V. Israele, J. M. Casellas, A. M. Garcia, C. M. Lac Prugent, S. J. Hoffman, D. Hauer, B. Thumar, A. Pascual, and N. Taratutto. 2004. Differential production of inflammatory cytokines in primary infection with human metapneumovirus and with other common respiratory viruses of infancy. *Journal of Infectious Diseases* 189:2047.
 78. Leung, J., F. Esper, C. Weibel, and J. S. Kahn. 2005. Seroepidemiology of human metapneumovirus (hMPV) on the basis of a novel enzyme-linked immunosorbent assay utilizing hMPV fusion protein expressed in recombinant vesicular stomatitis virus. *Journal of clinical microbiology* 43:1213.
 79. Lo, M. S., R. M. Brazas, and M. J. Holtzman. 2005. Respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 mediate inhibition of Stat2 expression and alpha/beta interferon responsiveness. *Journal of virology* 79:9315.
 80. Louie, J. K., A. Roy-Burman, L. Guardia-LaBar, E. J. Boston, D. Kiang, T. Padilla, S. Yagi, S. Messenger, A. M. Petru, and C. A. Glaser. 2009. Rhinovirus associated with severe lower respiratory tract infections in children. *The Pediatric infectious disease journal* 28:337.
 81. Louie, J. K., D. P. Schnurr, C. Y. Pan, D. Kiang, C. Carter, S. Tougaw, J. Ventura, A. Norman, V. Belmusto, and J. Rosenberg. 2007. A summer outbreak of human metapneumovirus infection in a long-term-care facility. *Journal of Infectious Diseases* 196:705.
 82. Ludewick, H. P., Y. Abed, N. van Niekerk, G. Boivin, K. P. Klugman, and S. A. Madhi. 2005. Human metapneumovirus genetic variability, South Africa. *Emerg Infect Dis* 11:1074-1078.
 83. Lwamba, H. C., R. Alvarez, M. G. Wise, Q. Yu, D. Halvorson, M. K. Njenga, and B. S. Seal. 2005. Comparison of the full-length genome sequence of avian metapneumovirus subtype C with other paramyxoviruses. *Virus Res.* 107:83-92. doi:S0168-1702(04)00284-9 [pii];10.1016/j.virusres.2004.07.002 [doi].
 84. Mackay, I. M., S. Bialasiewicz, K. C. Jacob, E. McQueen, K. E. Arden, M. D. Nissen, and T. P. Sloots. 2006. Genetic diversity of human metapneumovirus over 4 consecutive years in Australia. *Journal of Infectious Diseases* 193:1630.

85. Maggi, F., M. Pifferi, M. Vatteroni, C. Fornai, E. Tempestini, S. Anzilotti, L. Lanini, E. Andreoli, V. Ragazzo, M. Pistello, S. Specter, and M. Bendinelli. 2003. Human metapneumovirus associated with respiratory tract infections in a 3-year study of nasal swabs from infants in Italy. *J.Clin.Microbiol.* 41:2987-2991.
86. Makela, M. J., T. Puhakka, O. Ruuskanen, M. Leinonen, P. Saikku, M. Kimpimaki, S. Blomqvist, T. Hyypia, and P. Arstila. 1998. Viruses and bacteria in the etiology of the common cold. *Journal of clinical microbiology* 36:539.
87. Marguet, C., M. Lubrano, M. Gueudin, P. Le Roux, A. Deschildre, C. Forget, L. Couderc, D. Siret, M. D. Donnou, and M. Bubenheim. 2009. In very young infants severity of acute bronchiolitis depends on carried viruses. *PLoS One* 4:e4596.
88. Martin, E. T., J. Kuypers, J. Heugel, and J. A. Englund. 2008. Clinical disease and viral load in children infected with respiratory syncytial virus or human metapneumovirus. *Diagn.Microbiol.Infect Dis* 62:382-388. doi:S0732-8893(08)00347-7 [pii];10.1016/j.diagmicrobio.2008.08.002 [doi].
89. McNamara, P. S., B. F. Flanagan, C. A. Hart, and R. L. Smyth. 2005. Production of chemokines in the lungs of infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Journal of Infectious Diseases* 191:1225.
90. Meissner, H. C. and S. S. Long. 2003. Revised indications for the use of palivizumab and respiratory syncytial virus immune globulin intravenous for the prevention of respiratory syncytial virus infections. *AAP Policy* 112:1447.
91. Micheau, O. and J. Tschopp. 2003. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114:181-190.
92. Modrow, S. and D. Falke. 1998. *Molekulare Virologie*. Spektrum Akad. Verl..
93. Monto, A. S. 2002. Epidemiology of viral respiratory infections. *The American journal of medicine* 112:4-12.
94. Monto, A. S. 2002. The seasonality of rhinovirus infections and its implications for clinical recognition. *Clinical therapeutics* 24:1987-1997.
95. Monto, A. S., E. R. Bryan, and S. Ohmit. 1987. Rhinovirus infections in Tecumseh, Michigan: frequency of illness and number of serotypes. *Journal of Infectious Diseases* 156:43.
96. Monto, A. S. and J. J. Cavallaro. 1971. The Tecumseh study of respiratory illness. II. Patterns of occurrence of infection with respiratory pathogens, 1965-1969. *American Journal of Epidemiology* 94:280.
97. Morris, J. A., Blount Jr, R. E., and Savage, R. E. Recovery of Cytopathogenic Agent from Chimpanzees with Goryza. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)* 92(3), 544-549. 1956. Royal Society of Medicine.
98. Mufson, M. A., Orwell, B. Rafnar, and E. Norrby. 1985. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. *Journal of General Virology* 66:2111.

-
99. Mullins, J. A., D. D. Erdman, G. A. Weinberg, K. Edwards, C. B. Hall, F. J. Walker, M. Iwane, and L. J. Anderson. 2004. Human metapneumovirus infection among children hospitalized with acute respiratory illness. *Emerg Infect Dis* 10:700-705.
 100. Münzenmaier, M. 2005. Hochsensitive Messung des C-reaktiven Proteins (hsCRP): Wertigkeit in der Diagnostik von bakteriellen early-onset Infektionen (EOBI). Dissertation Uni Tübingen.
 101. Nissen, M. D., D. J. Siebert, I. M. Mackay, T. P. Sloots, and S. J. Withers. 2002. Evidence of human metapneumovirus in Australian children. *Medical Journal of Australia* 176:188.
 102. Noah, T. L., F. W. Henderson, I. A. Wortman, R. B. Devlin, J. Handy, H. S. Koren, and S. Becker. 1995. Nasal cytokine production in viral acute upper respiratory infection of childhood. *Journal of Infectious Diseases* 171:584.
 103. OPENSHAW, P. J. M., G. S. DEAN, and F. J. CULLEY. 2003. Links between respiratory syncytial virus bronchiolitis and childhood asthma: clinical and research approaches. *The Pediatric infectious disease journal* 22:S58.
 104. PANITCH, H. B. 2003. Respiratory syncytial virus bronchiolitis: supportive care and therapies designed to overcome airway obstruction. *The Pediatric infectious disease journal* 22:S83.
 105. Papadopoulos, N. G., D. Gourgiotis, A. Javadyan, A. Bossios, K. Kallergi, S. Psarras, M. N. Tsolia, and D. Kafetzis. 2004. Does respiratory syncytial virus subtype influences the severity of acute bronchiolitis in hospitalized infants? *Respiratory medicine* 98:879-882.
 106. Papi, A. and M. Contoli. 2011. Rhinovirus vaccination: the case against. *European Respiratory Journal* 37:5.
 107. PARROTT, R. H., H. W. H. A. KIM, J. O. ARROBIO, D. S. HODES, B. R. Murphy, C. D. BRANDT, E. N. A. Camargo, and R. M. Chanock. 1973. Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in Washington, DC. *American Journal of Epidemiology* 98:289.
 108. Peiris, J. S. M., W. H. Tang, K. H. Chan, P. L. Khong, Y. Guan, Y. L. Lau, and S. S. Chiu. 2003. Children with respiratory disease associated with metapneumovirus in Hong Kong. *Emerging infectious diseases* 9:628.
 109. Pelletier, G., P. Déry, Y. Abed, and G. Boivin. 2002. Respiratory tract reinfections by the new human metapneumovirus in an immunocompromised child. *Emerging infectious diseases* 8:976.
 110. Pelon, W., Mogabgab, W. J., Phillips, I. A., and Pierce, W. E. A cytopathogenic agent isolated from naval recruits with mild respiratory illnesses. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)* 94(2), 262-267. 1957. Royal Society of Medicine.
 111. Peltola, V., M. Waris, R. Osterback, P. Susi, O. Ruuskanen, and T. Hyypiä. 2008. Rhinovirus transmission within families with children: incidence of symptomatic and asymptomatic infections. *Journal of Infectious Diseases* 197:382.
 112. Pevear, D. C., F. G. Hayden, T. M. Demenczuk, L. R. Barone, M. A. McKinlay, and M. S. Collett. 2005. Relationship of pleconaril susceptibility and clinical outcomes in treatment of common colds caused by rhinoviruses. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49:4492.

113. Phillips, C. A., S. Riggs, J. L. Melnick, and C. A. Grim. 1965. Rhinoviruses associated with common colds in a student population. *JAMA: the journal of the American Medical Association* 192:277.
114. Pitkäranta, A., M. Starck, S. Savolainen, T. Pöyry, I. Suomalainen, T. Hyypiä, O. Carpen, and A. Vaheri. 2001. Rhinovirus RNA in the maxillary sinus epithelium of adult patients with acute sinusitis. *Clinical infectious diseases* 33:909.
115. Price, W. H. 1956. The isolation of a new virus associated with respiratory clinical disease in humans. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 42:892.
116. Principi, N., S. Bosis, and S. Esposito. 2006. Human metapneumovirus in paediatric patients. *Clinical microbiology and infection* 12:301-308.
117. Rao, S. S., J. O. Hendley, F. Hayden, and J. M. Gwaltney. 1995. Symptom expression in natural and experimental rhinovirus colds. *American Journal of Rhinology* 9:49-52.
118. Rawlinson, W. D., Z. Waliuzzaman, I. W. Carter, Y. C. Belessis, K. M. Gilbert, and J. R. Morton. 2003. Asthma exacerbations in children associated with rhinovirus but not human metapneumovirus infection. *Journal of Infectious Diseases* 187:1314.
119. Roach, D. R., A. G. D. Bean, C. Demangel, M. P. France, H. Briscoe, and W. J. Britton. 2002. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *The Journal of Immunology* 168:4620.
120. Robinson, J. L., B. E. Lee, N. Bastien, and Y. Li. 2005. Seasonality and clinical features of human metapneumovirus infection in children in Northern Alberta. *Journal of medical virology* 76:98-105.
121. Rossmann, M. G., E. Arnold, J. W. Erickson, E. A. Frankengerger, J. P. Griffith, H. J. Hecht, J. E. Johnson, G. Kamer, M. Luo, and A. G. Mosser. 1985. Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses. *Nature* 317:145.
122. Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution* 4:406-425.
123. Saunders, B. M., S. Tran, S. Ruuls, J. D. Sedgwick, H. Briscoe, and W. J. Britton. 2005. Transmembrane TNF is sufficient to initiate cell migration and granuloma formation and provide acute, but not long-term, control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *The Journal of Immunology* 174:4852.
124. Schildgen, V., B. van den Hoogen, R. Fouchier, R. A. Tripp, R. Alvarez, C. Manoha, J. Williams, and O. Schildgen. 2011. Human Metapneumovirus: Lessons Learned over the First Decade. *Clinical Microbiology Reviews* 24:734-754.
125. Schlender, J., B. Bossert, U. Buchholz, and K. K. Conzelmann. 2000. Bovine respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 cooperatively antagonize alpha/beta interferon-induced antiviral response. *Journal of virology* 74:8234.
126. Semple, M. G., A. Cowell, W. Dove, J. Greensill, P. S. McNamara, C. Halfhide, P. Shears, R. L. Smyth, and C. A. Hart. 2005. Dual infection of infants by human metapneumovirus and human

- respiratory syncytial virus is strongly associated with severe bronchiolitis. *Journal of Infectious Diseases* 191:382.
127. Sieff, C. A. 1987. Hematopoietic growth factors. *Journal of Clinical Investigation* 79:1549.
 128. Sigurs, N., R. Bjarnason, F. Sigurbergsson, and B. Kjellman. 2000. Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. *American journal of respiratory and critical care medicine* 161:1501.
 129. Sigurs, N., P. M. Gustafsson, R. Bjarnason, F. Lundberg, S. Schmidt, F. Sigurbergsson, and B. Kjellman. 2004. Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy and asthma and allergy at age 13. *American journal of respiratory and critical care medicine* 200406-7300Cv1.
 130. Skern, T., W. Sommergruber, D. Blaas, P. Gruendler, F. Fraundorfer, C. Pieler, I. Fogy, and E. Kuechler. 1985. Human rhinovirus 2: complete nucleotide sequence and proteolytic processing signals in the capsid protein region. *Nucleic acids research* 13:2111.
 131. Storch, G. A., L. J. Anderson, C. S. Park, C. Tsou, and D. E. Dohner. 1991. Antigenic and genomic diversity within group A respiratory syncytial virus. *Journal of Infectious Diseases* 163:858.
 132. Sullender, W. M., M. A. Mufson, L. J. Anderson, and G. W. Wertz. 1991. Genetic diversity of the attachment protein of subgroup B respiratory syncytial viruses. *Journal of virology* 65:5425.
 133. Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular biology and evolution* 24:1596-1599.
 134. Tamura, K., M. Nei, and S. Kumar. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 101:11030.
 135. Tang, R. S., J. H. Schickli, M. MacPhail, F. Fernandes, L. Bicha, J. Spaete, R. A. M. Fouchier, A. D. M. E. Osterhaus, R. Spaete, and A. A. Haller. 2003. Effects of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus antigen insertion in two 3'proximal genome positions of bovine/human parainfluenza virus type 3 on virus replication and immunogenicity. *Journal of virology* 77:10819.
 136. Templeton, K. E., S. A. Scheltinga, M. F. C. Beersma, A. C. M. Kroes, and E. C. J. Claas. 2004. Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4. *Journal of clinical microbiology* 42:1564-1569.
 137. Templeton, K. E., S. A. Scheltinga, M. F. C. Beersma, A. C. M. Kroes, and E. C. J. Claas. 2004. Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4. *Journal of clinical microbiology* 42:1564-1569.
 138. van den Hoogen, B. G., T. M. Bestebroer, A. D. Osterhaus, and R. A. Fouchier. 2002. Analysis of the genomic sequence of a human metapneumovirus. *Virology* 295:119-132. doi:10.1006/viro.2001.1355 [doi];S0042682201913558 [pii].

-
139. van den Hoogen, B. G., J. C. de Jong, J. Groen, T. Kuiken, G. R. de, R. A. Fouchier, and A. D. Osterhaus. 2001. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat.Med.* 7:719-724. doi:10.1038/89098 [doi];89098 [pii].
 140. van den Hoogen, B. G., S. Herfst, L. Sprong, P. A. Cane, E. Forleo-Neto, R. L. de Swart, A. D. Osterhaus, and R. A. Fouchier. 2004. Antigenic and genetic variability of human metapneumoviruses. *Emerg Infect Dis* 10:658-666.
 141. van den Hoogen, B. G., D. M. E. Osterhaus, and R. A. M. Fouchier. 2004. Clinical impact and diagnosis of human metapneumovirus infection. *The Pediatric infectious disease journal* 23:S25.
 142. Van Regenmortel, M. H. and C. M. Fauquet. 2000. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.
 143. Viazov, S., F. Ratjen, R. Scheidhauer, M. Fiedler, and M. Roggendorf. 2003. High prevalence of human metapneumovirus infection in young children and genetic heterogeneity of the viral isolates. *J.Clin.Microbiol.* 41:3043-3045.
 144. Vicente, D., M. Montes, G. Cilla, E. G. Perez-Yarza, and E. Perez-Trallero. 2006. Differences in clinical severity between genotype A and genotype B human metapneumovirus infection in children. *Clinical infectious diseases* 42:e111.
 145. Villanueva, N., R. Hardy, A. Asenjo, Q. Yu, and G. Wertz. 2000. The bulk of the phosphorylation of human respiratory syncytial virus phosphoprotein is not essential but modulates viral RNA transcription and replication. *Journal of General Virology* 81:129.
 146. Wilkesmann, A. 2006. Humane-Metapneumovirus-und Respiratory-Syncytial-Virus-Infektionen. Ein Vergleich des klinischen Verlaufes bei hospitalisierten Kindern.
 147. Wilkesmann, A., O. Schildgen, A. M. Eis-Hübinger, T. Geikowski, T. Glatzel, M. J. Lentze, U. Bode, and A. Simon. 2006. Human metapneumovirus infections cause similar symptoms and clinical severity as respiratory syncytial virus infections. *European journal of pediatrics* 165:467-475.
 148. Wilkesmann, A., O. Schildgen, A. M. Eis-Hübinger, M. J. Lentze, U. Bode, and A. Simon. 2007. Das humane Metapneumovirus als Erreger von Atemwegsinfektionen bei hospitalisierten Kindern-eine Übersicht Human Metapneumovirus in Hospitalized Children-A Review. *Klin Padiatr* 219:58-65.
 149. Williams, J. V., J. E. Crowe Jr, R. Enriquez, P. Minton, R. S. Peebles Jr, R. G. Hamilton, S. Higgins, M. Griffin, and T. V. Hartert. 2005. Human metapneumovirus infection plays an etiologic role in acute asthma exacerbations requiring hospitalization in adults. *Journal of Infectious Diseases* 192:1149.
 150. Wolf, D. G., D. Greenberg, D. Kalkstein, Y. Shemer-Avni, N. Givon-Lavi, N. Saleh, M. D. Goldberg, and R. Dagan. 2006. Comparison of human metapneumovirus, respiratory syncytial virus and influenza A virus lower respiratory tract infections in hospitalized young children. *The Pediatric infectious disease journal* 25:320.

-
151. Wolf, D. G., Z. Zakay-Rones, A. Fadeela, D. Greenberg, and R. Dagan. 2003. High seroprevalence of human metapneumovirus among young children in Israel. *Journal of Infectious Diseases* 188:1865.
 152. Wyde, P. R., S. N. Chetty, A. M. Jewell, G. Boivin, and P. A. Piedra. 2003. Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by ribavirin and immune serum globulin in vitro. *Antiviral research* 60:51-59.
 153. Xiang, Z., R. Gonzalez, Z. Xie, Y. Xiao, L. Chen, Y. Li, C. Liu, Y. Hu, Y. Yao, and S. Qian. 2008. Human rhinovirus group C infection in children with lower respiratory tract infection. *Emerging infectious diseases* 14:1665.
 154. Zhu, Z., W. Tang, J. M. Gwaltney Jr, Y. Wu, and J. A. Elias. 1997. Rhinovirus stimulation of interleukin-8 in vivo and in vitro: role of NF- κ B. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 273:L814-L824.
 155. Zlotnik, A. and O. Yoshie. 2000. Chemokines: A New Classification Review System and Their Role in Immunity. *Immunity* 12:121-127.

Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Johanna Katharina Weis

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wäre nicht ohne die Unterstützung, den Rat und die Geduld zahlreicher Personen möglich gewesen, bei denen ich mich im nachfolgenden herzlich bedanken möchte.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. med. Ortwin Adams für die Überlassung der interessanten Fragestellung, die außerordentlich gute Betreuung über viele Jahre, die unermüdliche Hilfsbereitschaft, die stets gute Erreichbarkeit und die vielen Stunden, die er auch am Wochenende und abends mit Korrekturlesen verbracht hat oder für anregende Diskussionen zur Verfügung stand.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern und MTAs des Instituts für Virologie, die mir bei Fragen jederzeit mit Rat und Tat beiseite standen und für die methodische Einarbeitung unersetzlich waren.

Der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für das wundervolle überaus freundschaftliche Arbeitsklima, die zahlreichen Diskussionen über wissenschaftliche und minder wissenschaftliche Themen sowie die vielfältigen gemeinsamen Aktivitäten, die weit über eine gewöhnliche Zusammenarbeit hinausgingen und die meine „Laborzeit“ zu einem unvergesslichen Erlebnis machten.

Für das sorgfältige Korrekturlesen und konstruktive Kritik möchte ich mich bei dem einen ganz besonderen Menschen bedanken, der mir stets ein Lächeln aufs Gesicht zaubern kann.

Nicht zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern und meiner Familie bedanken, die diese Arbeit in allen Phasen mit jeder möglichen Unterstützung bedacht haben. Danke, für die vielen Aufmunterungen, Anregungen und das Appellieren an mein Durchhaltevermögen.