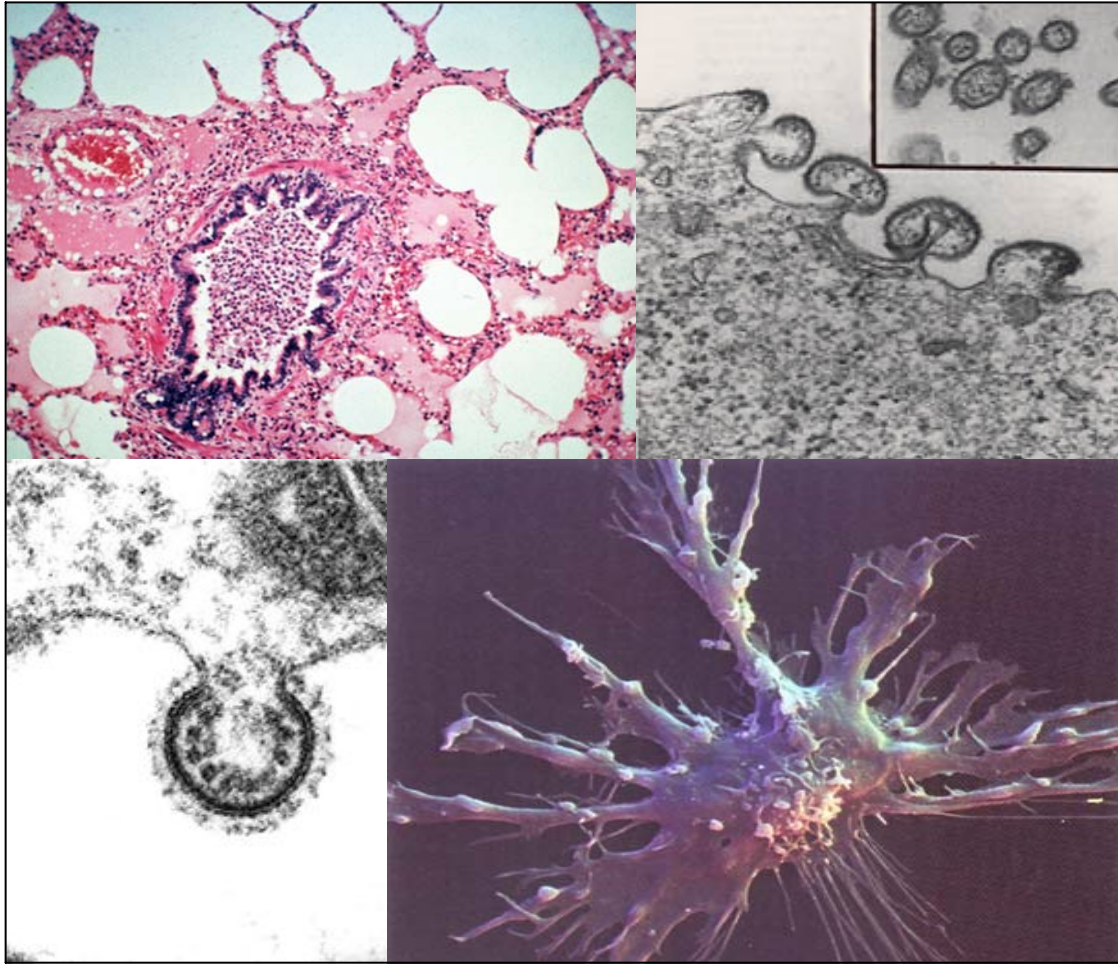


Detectie van het Respiratoir Syncytieel Virus extracellulair en intracellulair bij muis en humane dendritische cellen.



Detectie van het Respiratoir Syncytieel Virus extracellulair en intracellulair bij muis en humane dendritische cellen.

Naam:	Mirte Scherpenisse
Onderwijsinstelling:	Hogeschool Utrecht Faculteit Natuur en Techniek Institute of Life Sciences and Chemistry
Afstudeerrichting:	Moleculaire Biologie
Afstudeerdocent:	Dhr. dr. G.E.J.M. Hoelen
Studiebegeleidster:	Mw. N. Barendsen
Afstudeerperiode:	13 November 2006 – 1 juni 2007
Afstudeerplaats:	Rijks Instituut voor Volksgezondheid en Milieu Laboratorium voor Infectieziekten en Screening Afdeling Immunosurveillance
Afstudeerbegeleiders:	Mw. Drs. Ivette Boogaard
Datum en plaats inleveren:	01-06-07,Utrecht

Voorwoord

Dit verslag is geschreven in het kader van de afstudeeropdracht, als onderdeel van het vierde studiejaar van de opleiding Life Sciences & Chemistry, Faculteit Natuur en Techniek, aan de Hogeschool Utrecht te Utrecht.

Mijn afstudeerstage van 9 maanden heb ik uitgevoerd bij het Rijks Instituut voor Volksgezondheid en Milieu te Bilthoven op het Laboratorium Infectieziekten en Screening.

Ik heb met erg veel plezier gewerkt aan het onderzoek naar het detecteren van het Respiratoir Syncytieel Virus in muis en humane dendritische cellen. Tijdens mijn stage heb ik veel geleerd over de immunologie, het kweken van verschillende cellijnen en verschillende immunologische technieken. Graag wil ik mijn stagebegeleidster Ivette Boogaard bedanken voor al haar tijd, hulp en uitleg. Na 9 maanden kan ik trots zijn op het eindresultaat.

Mirte Scherpenisse

Samenvatting

Het Respiratoir Syncytieel Virus (RSV) induceert celfusie en syncytia formatie in cel cultuur. RSV is de belangrijkste oorzaak van luchtweginfecties bij jonge kinderen en de voornaamste verwekker van bronchiolitis. Bronchiolitis is een acuut verkregen perifere luchtwegobstructie met crepitaties, veroorzaakt door slijm en vocht. Bijna ieder kind maakt de infectie op zeer jonge leeftijd door. RSV infecties zijn seizoensgebonden en vinden voornamelijk in de winter plaats. Ongeveer de helft van de patiënten die een RSV bronchiolitis hebben ontwikkeld, hebben nog restverschijnselen in de vorm van luchtweghyperreactiviteit en een gestoorde longfunctie als tiener.

RSV infecteert het luchtwegepitheel en hierin ontstaan de syncytia. Onder het luchtwegepitheel bevinden zich dendritische cellen. De dendritische cel zou, door zijn ligging, de eerste antigeen presenterende cel zijn die in aanraking komt met RSV. De dendritische cel heeft een centrale rol in het immuunsysteem. Door de uitscheiding van bepaalde cytokines regelt hij het T-helper 1 (Th₁) en T-helper 2 (Th₂) milieu. Het verloop van een Th₁ immuunreactie is mild, terwijl het verloop van een Th₂ immuunreactie ernstige bijverschijnselen veroorzaakt.

In deze studie wordt onderzoek gedaan naar RSV detectie in muis en humane dendritische cellen en in hep2 cellen. Door middel van extracellulaire en intracellulaire fluorescentie flowcytometrie kleuring wordt gekeken naar de binding, entree en replicatie van het virus.

De cellen geïnfecteerd met RSV zijn 2h na infectie gewassen. De intensiteit van α -RSV-FITC extracellulair bij hep2 cellen is verhoogd. RSV bindt aan het celmembraan. De intensiteit van α -RSV-FITC intracellulair bij hep2 cellen is verhoogd tot 24h. In hep2 cellen vindt replicatie plaats van RSV. De intensiteit van α -RSV-FITC intracellulair bij muis DC's is licht verhoogd. Intracellulair vindt bij DC's een afname van α -RSV-FITC intensiteit plaats. In muis DC's vindt geen replicatie plaats van RSV, deze cellen zijn ook minder vatbaar voor RSV. Andere studies wijzen uit, dat replicatie wel plaats vindt in humane DC's.

Abstract

The Respiratory Syncytial Virus (RSV) induces cell fusion and syncytia formation in cell cultures. RSV is the most important source of respiratory tract infections by young children and it causes bronchiolitis. Bronchiolitis is an acute peripheral respiratory obstruction with crepitations through mucus and edema. Almost all children are infected on a young age. RSV infections are season bound, and take place in the winter. Half of all the patients, who develop a RSV bronchiolitis, has some rest symptoms like respiratory hyper reactivity or a disorder in lung function as teenager.

RSV infects the respiratory epithelial cells and causes syncytia formation. Dendritic cells (DC's) are antigen presenting cells (APC's), which lie directly underneath the mucosal epithelium. The DC would be the first APC, which encounter RSV, and it's possible that it could be infected with RSV. The DC plays a central role in the immune system. By the release of cytokines DC's influence the T-helper 1 (Th₁) and T-helper 2 (Th₂) immune response. A Th₁ environment results in a mild infection, whereas a Th₂ environment will result in a severe infection because of the immunopathologic side effects.

This study focused on the detection of RSV in mouse and human DC's and in hep2 cells. Using an extracellular and intracellular fluorescent flowcytometry staining binding, entry and replication of the virus is detected.

Hep2 cells and DC's are stimulated with RSV for a period of 2h. The intensity of extracellular α -RSV-FITC on hep2 cells increases. RSV binds the cellmembrane of hep2 cells. The intensity of intracellular α -RSV-FITC on hep2 cells increases till 24h. In hep2 cells there is replication. The intensity of extracellular α -RSV-FITC on murine DC's increases, whereas the intensity of intracellular α -RSV-FITC decreases. In mouse DC's there is no replication, these cells are less susceptible for RSV. Other studies show that there is RSV replication in human DC's.

Lijst met afkortingen

APC's:	antigeen presenterende cellen
CCA:	chimpansee coryza agent
CD:	cluster of differentiation system
DC's:	dendritische cellen
DMSO:	dimethylsulfoxide
F- protein:	fuse protein
FACS:	fluorescence-activated cell sorter
G- protein:	guanine nucleotide binding protein
GAG's;	glycosaminoglycan
G-CSF:	granulocyte colony-stimulating factor
GM-CSF:	granulocyte macrophage colony stimulating factor
HLA:	human leukocyte antigen
ICAM-1:	intercellular adhesion molecule- 1
IFN- γ :	interferon- γ
Ig:	immunoglobulin
IL:	interleukine
L- protein:	polymerase subunit protein
LPS:	lipopolysacharide
M- protein:	matrix protein
M2-1 protein:	antitermination factor protein
M2-2 protein:	regulator protein
MCP-1:	macrophage chemotactic proteins
MHC:	major histocompatibility complex
MIP-1 α :	macrophage inflammatory proteins
MOI:	multiplicity of infection
mRNA:	messenger RNA
N- protein:	nucleocapsid protein
NS1 protein:	structural protein 1
NS2 protein:	structural protein 2
ORF:	open reading frame
P- protein:	phosphoprotein
PBMCs:	peripheral blood mononuclear cells
PVM:	pneumo virus for mouse
RNA:	ribo Nucleic Acid
RSV:	respiratory syncytial virus.
SH- protein:	small hydrophobic protein
Th ₁ :	T helper cell 1
Th ₂ :	T helper cell 2
TLR:	toll like receptor
TNF- α :	tumor necrosis factor- α
VICAM-1:	vascular cell adhesion molecule 1

Inhoudsopgave

Voorwoord	3
Samenvatting	4
Abstract	5
Lijst met afkortingen	6
Hoofdstuk 1; Inleiding	8
§ 1.1 Respiratoir Syncytieel Virus.	8
§ 1.2 De structuur en het genoom van het Respiratoir Syncytieel Virus.	8
§ 1.3 De replicatiecyclus van het Respiratoir Syncytieel Virus.	10
§ 1.4 De immuunrespons van de gastheer door het Respiratoir Syncytieel Virus.	11
§ 1.5 Dendritische cellen en het Respiratoir Syncytieel Virus.	13
§ 1.6 Doel van het onderzoek.	14
Hoofdstuk 2; Materiaal en Methode	16
§ 2.1 Muis dendritische celweek.	16
§ 2.2 Hep2 celweek.	16
§ 2.3 Humane dendritische celweek.	16
§ 2.4 Viruskweek en virustitratie.	17
§ 2.5 Stimulatie met het Respiratoir Syncytieel Virus, Lipopolysacharide en MOCK.	18
§ 2.6 De fluorescentie flowcytometrie kleuring ten behoeve van eiwitexpressie en het aantonen van het Respiratoir Syncytieel Virus.	19
§ 2.7 Extracellulaire fluorescentie flowcytometrie kleuring.	19
§ 2.8 Intracellulaire fluorescentie flowcytometrie kleuring.	20
§ 2.9 Fluorescentie flowcytometrie analyse.	20
Hoofdstuk 3; Resultaten	21
§ 3.1 Dendritische cellen met de fluorescentie flowcytometer bekeken.	21
§ 3.2 De extracellulaire fluorescentie flowcytometrie kleuring van RSV bij hep2 cellen en muis dendritische cellen.	22
§ 3.3 De intracellulaire fluorescentie flowcytometrie kleuring van RSV bij hep2 cellen.	23
§ 3.4 De intracellulaire fluorescentie flowcytometrie kleuring van RSV bij muis dendritische cellen.	26
Hoofdstuk 4; Conclusie en discussie	28
Bronvermelding	31

Hoofdstuk 1; Inleiding

§ 1.1 Respiratoir Syncytieel Virus.

In 1956 werd door Morris et al. een verkoudheidsvirus geïsoleerd bij chimpansees dat ‘chimpansee coryza agent’ (CCA) werd genoemd. Toen kort daarna duidelijk werd dat het virus ook bij mensen voorkwam en ziekte kon veroorzaken, werd de naam veranderd in ‘respiratoir syncytieel virus’ (RSV) (Morris, Saglam et al. 1965; Ogra 2004). Het virus ontleent zijn naam aan het feit, dat het in celculturen celfusie induceert. Ook RSV verwante virussen komen voor als veroorzaker van pneumonie bij muizen (PVM) en luchtweginfecties bij rundvee, schapen en geiten (het bovine RSV). Infectie van de mens door PVM en het bovine RSV is niet beschreven (Antonis AF, et al. 2007, Bennett N, et al 2007).

RSV is de belangrijkste oorzaak van luchtweginfecties bij jonge kinderen en de voornaamste verwekker van bronchiolitis (J.L.L. Kimpen). Bijna ieder kind maakt de infectie op zeer jonge leeftijd door (Falsey, Hennessey et al. 2005). Er wordt gesproken van bronchiolitis bij een acuut verkregen perifere luchtwegobstructie met crepitaties, veroorzaakt door slijm en vocht. 40% van de kinderen met een primaire RSV infectie ontwikkelt bronchiolitis (J.L.L. Kimpen). Zuigelingen lopen extra gevaar op een RSV infectie, wanneer zij te vroeg geboren worden, een aangeboren hartafwijking of een longafwijking hebben, een immunodeficiëntie of een immunosuppressie ontwikkelen (Peter L. Collins 2001). De frequentie van de ziekte is het hoogst in het eerste levensjaar, hierna komen nog veelvuldig herinfecties voor. RSV-infecties zijn seizoensgebonden en vinden voornamelijk plaats in de winter (van oktober t/m maart). Buiten deze periode wordt het virus zelden vastgesteld. Transmissie van het virus vindt plaats via grote aerosolpartikels, die snel neerslaan en dus niet over grote afstand met de luchtstroom verspreid worden (J.L.L. Kimpen).

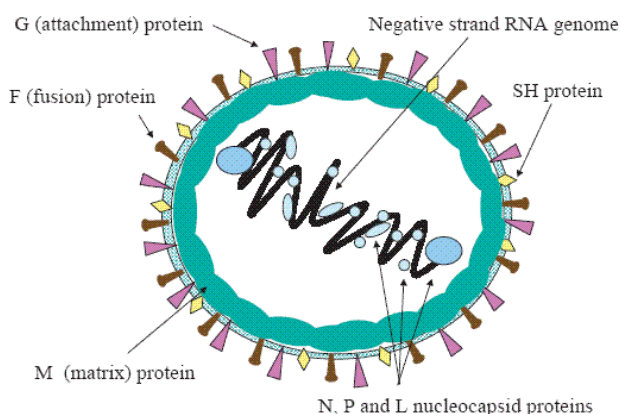
RSV infecteert het bovenste luchtwegepitheel, wat gepaard gaat met neusverkoudheid. Het luchtwegepitheel bekleedt de binnenkant van de neus als ook de binnenkant van de lage en hoge luchtwegen. Deze cellen vormen de eerste verdedigingslinie tegen RSV (Hacking and Hull 2002). Na de infectie van het bovenste luchtwegepitheel verspreidt RSV zich van cel tot cel naar de onderste luchtwegen door ‘tight junctions’ en door de inhalatie van nieuwgevormde virusdeeltjes (J.L.L. Kimpen). Het verspreiden van RSV gaat ook gepaard met het fuseren van aanliggende plasmamembranen van de luchtweg epitheelcellen. Door de fusie van de plasmamembranen worden er grote syncytia gevormd, welke tot epitheliale schade leiden (Ghildyal, Ho et al. 2006). Door deze schade ontstaat er een infiltraat van lymfocyten in de long en wordt er oedeem gevormd, wat leidt tot obstructie van de bronchioli door cellulaire debris en mucus. De snelle afbraak van de epitheelcellen veroorzaken uiteindelijk de symptomen karakteristiek voor een RSV infectie. RSV veroorzaakt voor lange tijd veranderingen in het immunologische milieu van de long (Smit, Rudd et al. 2006). Ongeveer de helft van de patiënten die een RSV bronchiolitis hebben ontwikkeld, hebben later nog restverschijnselen in de vorm van luchtweghyperreactiviteit en een gestoorde longfunctie als tiener (J.L.L. Kimpen).

§ 1.2 De structuur en het genoom van het Respiratoir Syncytieel Virus.

Het humaan respiratoir syncytieel virus is geclassificeerd in de genus Pneumovirinae behorend tot de familie van de Paramyxoviridae (figuur 1) (Ghildyal, Ho et al. 2006).

Er worden twee subgroepen van RSV onderscheiden, RSV-A en RSV-B (J.L.L. Kimpen). Het genoom bestaat uit enkelstrengs negatief RNA van 15.2 kb en bevat tien genen coderend voor elf proteïnen. Het RSV virion is 200 nm groot. Het genoom wordt omgeven door de nucleocapsid, welke is omgeven door de lipide envelope. Tussen de nucleocapsid en de lipide envelope zit de matrix (Hacking and Hull 2002).

De lipide envelope is verkregen uit het celmembraan van de gastheercel en bevat de twee belangrijkste eiwitten met betrekking tot de immuunrespons, het G-glycoproteïne en het F-proteïne (J.L.L. Kimpen). Het G-glycoproteïne is geïdentificeerd als het attachment proteïne en bindt aan de gastheercel. Het G proteïne wordt ook nog in oplosbare vorm gesynthetiseerd. De functie van het oplosbare G proteïne is nog niet geheel duidelijk, maar het zou kunnen fungeren als val voor RSV neutraliserende antilichamen en de immuunrespons kunnen beïnvloeden (Peter L. Collins 2001). Het fusie F-proteïne induceert de virale penetratie door de envelope van het virion te laten fuseren met het plasmamembraan van de gastheercel. Door deze fusie kan de nucleocapsid van het virion de gastheercel binnentreden. Het F-proteïne kan fusie met naastliggende cellen mediëren, waardoor syncytia gevormd worden tussen naastliggende cellen (Peter L. Collins 2001). Een ander proteïne wat gedetecteerd is op de virale envelope is het ‘small hydrophobic’ proteïne (SH). Dit proteïne bevindt zich integraal en is verankerd door een hydrofobe signaalsequentie. Het G-proteïne, F-proteïne en SH proteïne vormen samen de spikes op de envelope van het virus (Peter L. Collins 2001).



Figuur 1: De structuur van het Respiratoir Syncytieel Virus (Hacking and Hull 2002).

De matrix wordt gevormd door het non-glycosyleerde inner matrix proteïne M en speelt een centrale rol in de infectie. Dit proteïne is sterk membraan geassocieerd en heeft dezelfde hydrofobe opbouw (Peter L. Collins 2001). Vermoed wordt, dat het M proteïne een cruciale rol speelt in het binden van virus aan cellen, in budding van het virus en voor de formatie van virus partikels. Het M proteïne is gefosforileerd in geïnfecteerde cellen, maar het is niet bekend of deze fosforilatie de functie van het M proteïne reguleert (Ghildyal, Ho et al. 2006).

De RSV nucleocapsid proteïne N, fosfoproteïne P en polymerase subunit proteïne L gaan een interactie aan met de nucleocapsid en zijn aanwezig in cytoplasmatische blaasjes in het virus. De N proteïne bindt aan het genomische en antigenomische RNA, zodat er een RNase resistente nucleocapsid wordt gevormd. Het fosfoproteïne P fungeert als chaperonine voor de oplosbare vorm van het N proteïne. De chaperoninen behoren tot een grote groep van moleculen, welke assisteren bij het vouwen van proteïnen, ook wel de moleculaire chaperone proteïnen genoemd. Het P proteïne functioneert ook als een polymerase cofactor en moet gefosforileerd zijn om zijn werking te kunnen doen (Peter L. Collins 2001). Het L proteïne is de RNA afhankelijke RNA polymerase en is nodig voor de synthese van het genomische RNA

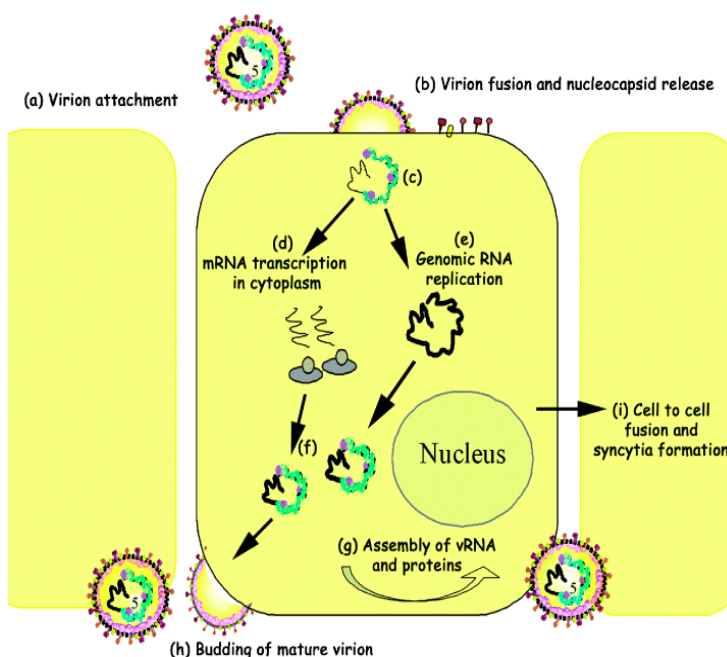
en de mRNAs (Hacking and Hull 2002; Liuzzi, Mason et al. 2005). Samen vormen de L, N en P proteïnen een ribonucleoproteïne complex. Dit complex is in staat om initiatie van synthese van de positieve en negatieve strengs genomisch RNA en het mRNA uit te voeren (Liuzzi, Mason et al. 2005).

RSV bevat ook twee non-structurele proteïnen, NS1 en NS2. Deze accumuleren in de geïnfecteerde cellen, maar zijn ook aanwezig in kleine hoeveelheden in het virion (Collins and Murphy 2002; Hacking and Hull 2002). Er is weinig bekend over de NS1 en NS2 proteïnen. Uit onderzoek is gebleken dat het NS2 proteïne onstabiel is met een halfwaardetijd in geïnfecteerde cellen van 30 minuten. NS1 is waarschijnlijk betrokken bij de RNA synthese. NS1 en NS2 hebben waarschijnlijk geen belangrijke rol in de hechting van het virus of tijdens de passage van het virus door de cel heen. (Peter L. Collins 2001).

Het mRNA van het M2 proteïne heeft twee 'open reading frames' (ORFs). Door de ORFs worden er twee verschillende proteïnen gesynthetiseerd, M2-1 en M2-2 (Peter L. Collins 2001). Het M2-1 proteïne is een transcriptie elongatie factor en het M2-2 proteïne is een regulator van de virale transcriptie (Hacking and Hull 2002).

§ 1.3 De replicatiecyclus van het Respiratoir Syncytieel Virus.

De eerste stap in de RSV replicatie, is het hechten van het virus partikel aan de gastheercel met behulp van het G-glycoproteïne (Ghildyal, Ho et al. 2006). Het RSV G-glycoproteïne bindt waarschijnlijk aan verschillende cellulaire glycosaminoglycanen (GAGs) en Toll Like Receptor-9 (TLR) op de oppervlakte van de gastheercellen. GAGs zijn lange onvertakte polysachariden van de extracellulaire matrix die bestaan uit repeterende disachariden eenheden. GAGs zijn betrokken in interacties tussen cellen en verschillende virussen en pathogenen (Techarpornkul, Collins et al. 2002). Het G proteïne bindt de GAGs door mogelijke elektrostatische interactie tussen de negatief geladen GAGs en de basische residuen van het G-glycoproteïne. Het is mogelijk dat de interactie tussen het G-glycoproteïne en de cellulaire GAGs de bindingsstap is tussen het virus en de gastheercel. (Peter L. Collins 2001). TLR-9 is een receptor waar RSV aan zou kunnen binden (Jörg Schlender 2004). RSV komt de cel binnen door te fuseren met het plasmamembraan. Deze fusie wordt gemedieerd door het F proteïne. Door het



Figuur 2: Schematische weergave van de replicatiecyclus van RSV. a) virusbinding, b) fusie, c) nucleocapsid in cytoplasma, d) RNA transcriptie, e) RNA replicatie, f) vorming van virion, g) budding van virus (Hacking and Hull 2002).

(Peter L. Collins 2001). TLR-9 is een receptor waar RSV aan zou kunnen binden (Jörg Schlender 2004). RSV komt de cel binnen door te fuseren met het plasmamembraan. Deze fusie wordt gemedieerd door het F proteïne. Door het

samensmelten van de membranen wordt de nucleocapsid in het cytoplasma van de gastheercel vrijgelaten.

Virale replicatie en transcriptie worden uitgevoerd door een polymerase complex waarbij de N, P en L proteïnen een belangrijke rol spelen. Transcriptie wordt geleid door korte geconserveerde sequenties aan de uiteinden van de mRNA streng. Deze sequenties bevatten het startcodon en het terminatiecodon. (Ghildyal, Ho et al. 2006). RNA replicatie begint wanneer de polymerase wordt omgezet in een vorm, waardoor hij de transcriptie signalen niet kan herkennen. Dit resulteert in de synthese van de positieve replicatieve intermediate. De intermediate wordt ook wel het antigeenoom genoemd en dient als template voor het nieuwe negatieve RNA (Bermingham and Collins 1999).

De vorming van het virion, wordt gecoördineerd door het M-proteïne. De envelope glycoproteïnen, G, F en SH, worden verplaatst naar het celmembraan. De cytoplasmastaarten van de virale envelope proteïnen gaan een interactie aan met het M-proteïne. Door deze interactie wordt er een laag onder het plasmamembraan gevormd, de matrix. De vooraf gevormde nucleocapsid, wat het RNA genoom bevat, gaat een interactie aan met de matrix. Het M-proteïne speelt een belangrijke rol in het vormen van nieuwe virions (Henderson, Murray et al. 2002). In het cytoplasma van geïnfecteerde cellen wordt de replicatie afgerond en voegen de proteïnen samen om het virion te vormen. Het virion verlaat de gastheercel door celbudding (Ghildyal, Ho et al. 2006).

§ 1.4 De immuunrespons van de gastheer door het Respiratoir Syncytieel Virus.

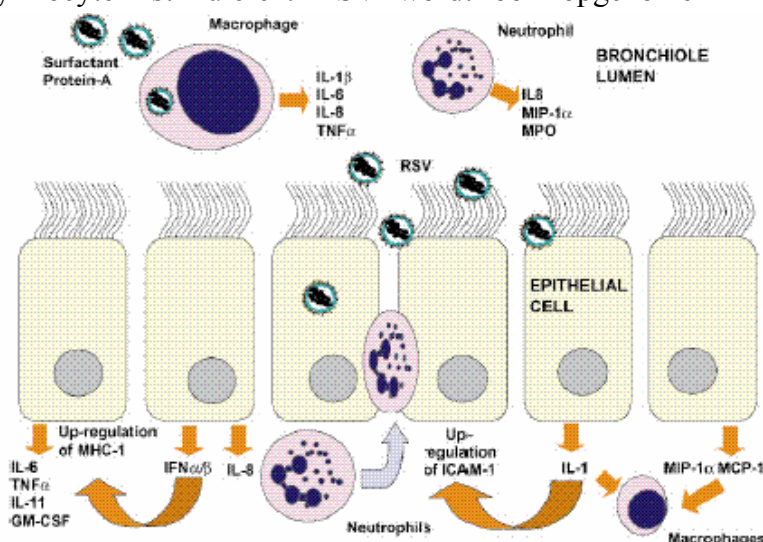
Cellen van zowel de aangeboren immuunrespons als de specifieke immuunrespons spelen een rol bij de immunopathogenese van bronchiolitis (J.L.L. Kimpen). De aangeboren immuunrespons wordt gemedieerd door de fagocyten en is de eerste verdedigingslinie tegen pathogenen. Tot de fagocyten behoren de neutrofielen, eosinofielen, basofielen, monocyt en de macrofagen. De neutrofielen, eosinofielen en basofielen behoren tot de groep van de polymorf nucleaire granulocyten. Deze cellen binden aan pathogenen, nemen ze op en doden ze. Ze gebruiken niet-specifieke herkenningsmechanismen, wat er voor zorgt dat ze veel soorten pathogenen kunnen binden. De specifieke immuunrespons wordt gemedieerd door de lymfocyten. De lymfocyten worden onderverdeeld in de B-lymfocyten (B-cellen) en T-lymfocyten (T-cellen). Deze cellen staan centraal in het specifieke immuunsysteem, omdat zij bepaalde pathogenen herkennen. B-lymfocyten scheiden antilichamen uit, welke pathogenen neutraliseren. De T-lymfocyten zijn onder te verdelen in twee klassen, T helper cellen en cytotoxische T cellen. De T helper cellen worden onderverdeeld in T-helper 1 (Th₁) en T helper 2 (Th₂) cellen op basis van cytokine profielen die zij produceren. Deze T cellen genereren cytotoxische T cellen en werken samen met B cellen voor de productie van antilichamen. T helper cellen herkennen antigenen gepresenteerd door cellen met MHC-II moleculen op het oppervlakte. De cytotoxische T cellen kunnen virus geïnfecteerde cellen doden, die MHC-I moleculen tot expressie brengen. De T-lymfocyten hebben verschillende functies. Sommige fagocyten kunnen pathogenen opnemen en presenteren aan de T-lymfocyten. Vervolgens produceren de T-lymfocyten cytokines, welke de fagocyten activeren om het pathogeen te doden. De T-lymfocyten en B-cellen reageren op herhaalde aanwezigheid van een bepaald pathogeen, waardoor er een snelle en specifieke immuunrespons op gang wordt gebracht, dit wordt ook wel de memory van het immuunsysteem genoemd. Tot de

memory cellen behoren de memory T cellen en memory B cellen. Het zijn lang levende cellen, die al een keer zijn blootgesteld aan antigenen en snel kunnen reageren op herhaalde aanwezigheid van het pathogeen (Ivan Roitt 2001).

De interactie tussen RSV en het respiratoire epitheelweefsel resulteert in het vrijkomen van verschillende mediators en de activatie van het immuunsysteem. Tijdens de RSV infectie vindt er een opregulatie plaats van verschillende celadhesie moleculen (ICAM-1, VCAM-1 en E-selectine), liganden (CD11B), cytokines (oa. interleukines en Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)) en chemokines (oa. eotaxine, MIP-1 α en MCP-1), die belangrijk zijn voor de initiatie van de ontstekingscascade en voor immuuncellen om te mobiliseren naar de plaats van ontsteking (Ogra 2004). Nadat de epitheelcellen geïnfecteerd zijn, kunnen immunopathogenetische mechanismen plaatsvinden, die bijdragen aan het totstandkomen van bronchiolitis. Bronchiolitis wordt in de lage luchtwegen veroorzaakt door een infiltratie van CD4⁺ en CD8⁺ T-cellen, recrutering en activatie van de eosinofielen en basofielen. Dit zal bijdragen aan de beschadiging van het epitheelweefsel. B-cellen zullen RSV specifiek Immunoglobuline E (Ig) produceren en er vindt een opregulatie plaats van de antigeen presenterende moleculen, human leukocyte antigen-I (HLA) en HLA-II.

Als respiratoire epitheelcellen worden geïnfecteerd met RSV, produceren de epitheelcellen cytokines. De belangrijkste cytokines, die de epitheelcellen produceren, zijn Interleukine-8 (IL-8), IL-11, IL-6, IL-1 en TNF- α . (J.L.L. Kimpen). IL-8 is een sterke chemotactische stimulus voor de polymorf nucleaire granulocyten. IL-11 zet de B-cellen aan tot het uitscheiden van het RSV specifieke IgE. IL-6, IL-1 en TNF- α stimuleren de secretie van cortisol. Glucocorticosteroiden hebben een remmende werking op de Interferon- γ (IFN- γ) secretie. IFN- γ beschermt cellen tegen virale infecties en is dus essentieel bij de virale cel gemedieerde immuunrespons. IFN- γ kan direct of indirect de T-lymfocyten stimuleren. RSV wordt ook opgenomen in macrofagen, hetgeen resulteert in het vrijkomen van IL-1 en TNF- α . (Pinto, Arredondo et al. 2006, Roitt 2001). Figuur 3 geeft een schematische weergave van de immuunrespons bij een RSV infectie weer.

Belangrijk bij een RSV infectie is de verhouding tussen de Th₁ en Th₂ cellen. IL-12 wordt geproduceerd door monocyten en antigeen presenterende cellen en is een stimulerende cytokine voor het Th₁ milieu. Wanneer de Th₁ cellen gestimuleerd worden, zal deze groep cellen zelf ook IFN- γ vrijlaten en zo het Th₁ milieu activeren. Het Th₁ milieu wordt geassocieerd met een milde vorm van RSV ziekte. De Th₂ cellen produceren IL-4 en IL-10, welke betrokken zijn bij de ontwikkeling van de



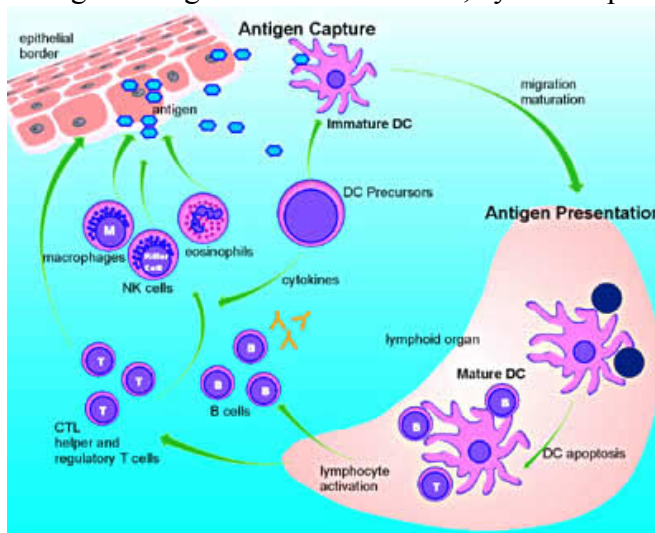
Figuur 3: Schematische weergave van RSV infectie van het respiratoire epitheelweefsel.

humorale immuniteit en een rol spelen in de hypersensitiviteit. Wanneer er meer IL-4 en IL-10 in het milieu aanwezig is, zal er een Th₂ respons optreden. Een Th₂ respons is geassocieerd met de pathogenese van RSV bronchiolitis in een RSV infectie (Pinto, Arredondo et al. 2006). Doordat glucocorticosteroïden een remmende werking hebben op IFN- γ , worden er soms tijdens een RSV infectie Th₂ cellen gestimuleerd (Pinto, Arredondo et al. 2006).

De cellulaire immuunrespons is belangrijk om de infectie onder controle te krijgen en het virus te degraderen (Hacking and Hull 2002). Dat de gastheer immuunrespons belangrijk is in een RSV infectie werd duidelijk door het formale geïnactiveerde RSV vaccin studie eind jaren 60. Kinderen die met dit vaccin werden ingespoten, waren niet beschermd tegen het virus en ontwikkelden een ernstig ziekteverloop tijdens de RSV infectie (Kim, Canchola et al. 1969). Dierexperimenten naar de effecten van het formale geïnactiveerde vaccin toonden aan, dat met dit vaccin geproduceerde CD4⁺ T cellen een cytokine patroon produceerden voor een Th₂ milieu. Een natuurlijke infectie met RSV induceert meestal een Th₁ milieu. Deze data suggereert dat het formale geïnactiveerde vaccin een onevenwichtig milieu induceert, wat bij deze patiënten de Th₂ allergie geassocieerde response veroorzaakt in plaats van de Th₁ gerelateerde hypergevoelige respons (Hacking and Hull 2002).

§ 1.5 De dendritische cellen en het Respiratoir Syncytieel Virus.

Antigeen presenterende cellen (APC's) bestaan uit verschillende leukocyten en zijn efficiënte immunostimuli. Sommige APC's hebben een centrale rol in de activatie van T helper cellen. In dit geval worden de APC's gezien als een brug tussen de aangeboren en specifieke immuniteit. Andere APC's communiceren met andere leukocyten. APC's worden over het algemeen gevonden in de huid, lymfeknopen, mild, thymus en in of onder het meeste mucosale epitheel. Via afferente lymfevaten migreren de APC's naar de paracortex van de lymfeknopen. Hier gaan zij een interactie aan met T cellen. De migratie van APC's naar de lymfeknopen, zorgt voor een efficiënt mechanisme van het vervoeren van een antigeen van de huid of mucosa naar de T helper cellen gelokaliseerd in de lymfeknopen. De APC's bevatten het MHC-II molecuul, welke erg belangrijk is bij het presenteren van antigenen aan T helper cellen. Het grootste



Figuur 4: Centrale rol van de DC's bij een pathogen infectie.

gedeelte van APC's zijn ontwikkelt uit het beenmerg, maar de hematopoëtische progenitor cel waar zij afkomstig van zijn is nog onbekend. Dendritische cellen (DC's) welke een interactie aangaan met T cellen zijn niet de enige APC's, ook macrofagen en B-cellen zijn rijk aan MHC-II moleculen en zijn dus in staat om een antigeen in te nemen en te presenteren aan T cellen. In figuur 4 is het immuunsysteem, waarin de DC centraal staat, weergegeven (Ivan Roitt 2001).

DC's zijn schaars en wijd verspreide cellen. Ze zijn gespecialiseerd in het bemachtigen en bewerken van pathogenen en het presenteren van antigenen aan T cellen. De interactie tussen DC's en naïeve T cellen kan leiden tot verschillende immuunresponsen, afhankelijk van de verschillende type DC's en activatie stadium (Shortman and Naik 2007).

Er zijn twee groepen DC's. De myeloïde of principiële DC's en de plasmacytoïd DC's (Hongwei Wang et al. 2006). De myeloïde DC's bezitten al een dendritische vorm en tonen DC functie in de 'steady state'. De plasmacytoïd DC's bevinden zich in het bloed. DC's kunnen ook worden verkregen uit voorlopers ook wel precursors genoemd. Deze precursors moeten nog verder ontwikkelen om een DC te vormen met DC functies. Verschillende precursors ontwikkelen verschillende DC's. In de meeste gevallen ontwikkelen de precursors tot DC's door microben of ontstekingsfactoren. Monocyten kunnen fungeren als precursor voor DC's. De meeste DC's subtypen hebben een korte levensduur en gaan het lymfoïde weefsel binnen om een interactie aan te gaan met T cellen (Shortman and Naik 2007).

In de long zijn de immature DC's van myeloïde afkomst aanwezig onder de epitheelcellaag welke de bronchioli en alveoli bekleden (P.M.A. de Graaff et al. 2005). DC's liggen erg strategisch aan het begin van de luchtwegen en kunnen zo pathogenen detecteren, opnemen en degraderen (Guerrero-Plata, Casola et al. 2006; Jones, Morton et al. 2006). Door het verwerken van pathogenen komen aan de celoppervlakte verschillende co-stimulatoire moleculen en receptoren tot expressie. Dit proces wordt celmaturing genoemd. De gematureerde cellen produceren verschillende interferonen, chemokines en proinflammatoire cytokines en zullen migreren naar het locale lymfoïde weefsel. In het lymfoïde weefsel bevinden zich de naïeve T cellen. De DC's presenteren de antigenen aan de naïeve T cellen (Guerrero-Plata, Casola et al. 2006; Jones, Morton et al. 2006). Door de antigeen presentatie matureren de naïeve T cellen en brengen de immuunrespons op gang.

Virale interacties met DC's kunnen de DC's op twee manieren beïnvloeden. De DC kan het immuunsysteem activeren door antigeen presentatie of de DC bezwijkt door het virus, waardoor de effectieve immuniteit uitblijft. In mensen is gedemonstreerd dat RSV 37% van de humane monocyten en 35% van de macrofagen infecteert (Guerrero-Plata, Casola et al. 2006; Jones, Morton et al. 2006).

§ 1.6 Doel van het onderzoek.

Momenteel wordt er veel onderzoek gedaan naar DC's tijdens een RSV infectie. Er is een opregulatie waargenomen van de eiwit expressie tijdens een RSV infectie. Daarom wordt er veelal gekeken naar de eiwit activatie van de DC's na een RSV infectie en naar de activatie van DC's na een stimulatie met op RSV lijkende virussen. DC's zijn een interessant object tijdens een RSV infectie, omdat ze zich vlak onder het respiratoire epitheelweefsel bevinden waar RSV de cellen infecteert. De DC heeft een centrale rol in het immuunsysteem en zou daarom een belangrijke rol kunnen bijdragen aan de immuunreactie tegen RSV.

Tijdens deze studie wordt RSV gedetecteerd in een humane epitheelcellijn, in muizen DC's en in humane DC's. Deze detectie vindt zowel extracellulair als intracellulair plaats met behulp van fluorescentie flowcytometrie. Belangrijk bij dit onderzoek is het onderscheidt tussen hechting van het virus aan de cel, het binnenkomen van het

virus en de virusrelicatie in de cel. Het is nog niet bekend of muizen DC's en humane DC's geïnfecteerd kunnen worden met RSV. In de literatuur staat beschreven dat RSV wel replicateert in humane DC's.

Voordat de humane DC's geïnfecteerd worden met RSV, moet er een kweekprotocol worden opgezet om deze cellen te kweken en moet dit protocol geoptimaliseerd worden.

Hoofdstuk 2; Materiaal en methode

§ 2.1 Muis dendritische celweek.

De achterpootjes van de muizen (balb-c) werden schoongemaakt en afgekraakt ter hoogte van de metafyse. Beentjes werden opgevangen in Optimem (Gibco, 51985-026) Daarna werden de beentjes gewassen in EtOH 70% en werd er goed gespoeld met Optimem. De beentjes werden doorgesneden aan de tegengestelde zijde van de metafyse, dit is bij de enkel en heup. De metafyse werd doorboord met een naald en doorgespoten met Optimem. Het beenmerg werd opgevangen in een petrischaal en werd goed geresuspendeerd en door een 100 µm filter (Falcon) gehaald. Vervolgens 7 minuten afdraaien, 400g, 4°C. De cellen werden geresuspendeerd in lysis buffer (8,3 g/L NH₄CL, 1 g/L NaHCO₃, 500 IE/L heparine) en 2 minuten geïncubeerd op kamertemperatuur en een overmaat aan Optimem werd toegevoegd. Dit werd 7 minuten afgedraaid, 400g, 4°C. De pellet werd opgenomen in 10 ml Optimem en de cellen werden geteld. Hierna de cellen afdraaien 7 minuten, 400g, 4°C. De cellen werden met een concentratie van $2 \cdot 10^5$ cellen per ml met 20 ng/ml GM-CSF in kweek gebracht in 6 wells platen (Falcon, 353046). Het medium bevatte RPMI-1640 (Gibco, 61870-010), 50 mg/ml gentamicine (Gibco, 15750-037), 50mM β-mercapthoethanol en 5% Fetal Bovine Serum (hyclone, SH30071-03). Op de derde dag van de kweek werd het medium verversst en 20 ng/ml GM-CSF werd toegevoegd. Op de zesde en achtste dag werd het supernatant afgedraaid en het medium verversst.

§ 2.2 Hep2 celweek.

Hep2 cellen zijn een continue humane epitheel cellijn en kunnen tot passage 35 worden doorgezet. Om de hep2 cellen door te zetten werden de cellen getrypsiniseerd en opgenomen in medium RPMI-1640 (Gibco, 52400-025) met L-glutamine en 25mM HEPES. Als extra toevoeging werd 200 mM in 0,85% NaCL L-glutamine (Biowhittaker, BE17-605E), 100 µg/ml penicilline, 100g/ml streptomycine, 25 µg Amphotericin B 100x (Biowhittaker 17-745e) en 10% Fetal Bovine Serum gebruikt. Er werd gekweekt in kweekflessen van 25cm² (Nunc, 136196) en 80cm² (Nunc, 147589).

§ 2.3 Humane dendritische celweek.

Humane dendritische cellen werden verkregen uit monocyten afkomstig van de PBMC's uit een buffycoat. De buffycoat werd uitgewrongen in een kweekfles en aangevuld met steriel 1x 0,01 M pH 7,2 PBS (Tritium microbiologie B.V., B590.78.1000.010) tot 220 ml. Dit werd verdeeld over 8 buizen van 50 ml. 14 ml ficoll (Sigma-Aldrich, 10771-500 ml) werd opgenomen en in een buis met bloed gezet vervolgens de pipet laten leeglopen zonder pipetboy. Hierna werd de pipetboy weer op de pipet gezet en de pipet met restant werd voorzichtig uit de buis gehaald. Afdraaien 30 minuten 1400 rpm, zonder rem. De witte laag boven de ficoll (PBMC's) werd afgepipetteerd en overgebracht naar nieuwe buizen. De buizen werden aangevuld met PBS 1% humaan AB serum (Harlan, SS 002-7b) en de cellen werden vijf keer gewassen. De eerste wasstap werd uitgevoerd bij 1400 rpm, 20 minuten. Daarna 1200 rpm, 10 minuten. Na iedere wasstap werden de cellen geresuspendeerd. De bovenstaande vloeistof werd bij iedere wasstap helderder, doordat de ficoll en de bloedplaatjes werden weggewassen. Na de laatste wasstap werden de cellen opgenomen in humaan AB medium en geteld. Het medium bevatte RPMI-1640, 10% humaan AB serum, 100 µg/ml penicilline, 100 g/ml streptomycine en 20 mM gentamicine. De cellen werden met een concentratie van $5 \cdot 10^6$ cellen per ml in kweek

gebracht in een 6 wells plaat (Corning, 3516) en 2 uur geïncubeerd bij 37°C. Hierna werd het medium voorzichtig verwijderd en de hechtende celfractie in cultuur gebracht met 500 U/ml rhGM-CSF (PeproTech, 300-03) en 250 U/ml rhIL-4 (Strathman Biotech, hIL4-5pg). Op de derde dag werden de cellen gewassen met warm medium en nieuw medium met groeifactoren werd toegevoegd. Op de zesde dag werden er cellen geoogst om de immature DC's te meten met de fluorescentie flowcytometrie. De immature DC's werden gemeten, omdat gecontroleerd werd of de cellen die gekweekt werden ook echt dendritische cellen waren. Om dit te controleren werden verschillende eiwitten expressie profielen bekeken. Ook werden op dag 6 de andere humane DC's geïnfecteerd. rhGM-CSF is een hematopoëtische groeifactor wat de ontwikkeling van neutrofielen en macrofagen stimuleert. GM-CSF wordt geproduceerd door endotheel cellen, monocytten, fibroblasten en T-lymfocyten. Het humane IL-4 is een lymfoïde cel groeifactor welke de groei stimuleert van bepaalde B en T cellijnen.

De monocytten uit de PBMC's werden ook op een andere manier geïsoleerd. Met behulp van magnetische CD14⁺ beads (Easystep, 18058) werden de CD14⁺ cellen gebonden aan de beads. Monocytten en macrofagen brengen CD14 tot expressie. Door deze methode werden de T-cellen en erythrocyten uit de kweek gezuiverd. De cellen werden opgelost tot een concentratie van 1×10^8 cellen/ml in PBS wat 2% FBS en 1 mM EDTA bevatte. Vervolgens werd 100 µl/ml positieve cocktail selection (Easystep) toegevoegd. Goed mixen en 15 minuten incuberen bij kamertemperatuur. Hierna werden de magnetische nanopartikels goed gemixt voor het verkrijgen van een homogene oplossing. De beads werden met 50 µl/ml cellen toegevoegd. Goed mixen en incuberen bij kamertemperatuur voor 10 minuten. Vervolgens werd de celsuspensie aangevuld tot 2,5 ml door het toevoegen van PBS met 2% FBS en 1 mM EDTA. De buis met cellen werd in een magneet (Easystep) gezet voor 5 minuten. In een vloeiende beweging werd de supernatant fractie afgegoten. De magnetische beads met de cellen bleven gebonden aan de magneet. De buis werd uit de magneet gehaald en er werd 2,5 ml PBS met 2% FBS en 1 mM EDTA toegevoegd. De celsuspensie werd gemixt en de buis werd weer in de magneet geplaatst voor 5 minuten. Hierna werd het supernatant afgegoten. In totaal werd de buis met celsuspensie 3x in de magneet geplaatst. De laatste keer werden de cellen opgenomen in IMDM medium wat 100 µg/ml penicilline en 100 g/ml streptomycine en 10% FBS bevatte. Vervolgens werden de cellen in kweek gebracht met IL-4 en GM-CSF.

§ 2.4 Viruskweek en virustitratie.

Voor het kweken van virus zijn hep2 cellen nodig. De hep2 cellen waren gekweekt in 8 kweekflessen van 225 cm² (Corning, 2044132). In één 225 cm² fles zitten $5-7 \times 10^7$ cellen. De cellen werden geïnfecteerd met een goede oude RSV batch met een Multiplicity of Infection (MOI) van 0,1. De hoeveelheid virus werd berekend volgens de volgende formule: $\text{MOI} \times \text{aantal cellen} / \text{pfu/ml} = \text{hoeveelheid virus toevoegen}$. De hoeveelheid toe te voegen virus werd opgenomen in 10 ml. De cellen werden gewassen met 1x PBS en werden vervolgens geïnfecteerd met RSV. Na de infectie werden de cellen 1,5 uur geïncubeerd bij 35°C 5%CO₂, daarna werden de cellen gespoeld met PBS en 50 ml hep2 medium werd toegevoegd. De geïnfecteerde cellen werden 48 uur geïncubeerd bij 35°C 5%CO₂. Na de incubatie werden de cellen geoogst met behulp van een schraper. Het schraapsel en het medium werden uit de kweekfles gepipetteerd en werd 10 minuten afgedraaid bij 1000g, 4°C. Het virus is

aanwezig in het supernatant. Voordat het supernatant werd uitgevuld, werd het supernatant eerst door een 0,2 μm filter (Acrodisc, PN4612) gehaald.

Voor het aantonen van de hoeveelheid infectieuze virusdeeltjes in een virussuspensie wordt een plaque assay uitgevoerd. Dit wordt gedaan door te titreren en het virus over te brengen in een 24 wells plaat (Cellstar, 662160) begroeid met hep2 cellen. Het aantal infectieuze deeltjes wordt uiteindelijk bepaald aan de hand van een zogenaamde plaque assay. Het aantal plaque vormende eenheden (pfu's) wordt geteld en elke gevormde plaque is het resultaat van een geïnfecteerde cel.

Het medium werd van de hep2 cellen afgezogen en er werd een verdunningsreeks gemaakt van het virus (10^{-1} t/m 10^{-8}). Van de verdunning 10^{-3} tot 10^{-8} werd 200 μl op de 24 wells plaat gebracht. Hierna werd de plaat 1,5 uur geïncubeerd bij 35,5°C 5% CO₂. De cellen mochten niet uitdrogen, tussendoor werd de plaat even geschud. Na de incubatie werd het medium aangevuld tot 1 ml en 48 uur geïncubeerd. Na twee dagen kunnen de ontstane plaques worden aangekleurd. Om de plaques te kleuren werden de cellen gefixeerd met ijskoude 80% aceton in H₂O en 10 minuten geïncubeerd bij kamertemperatuur. Hierna werd de plaat twee keer gewassen met PBS met 0,05% Tween-20 (1 ml per well) voordat er 250 μl conjugaat werd toegevoegd. Het conjugaat wat geit- α -RSV (Biodesign, B658-40G) bevatte werd 1:300x verdund in PBS/0,05%Tween-20/1%ELK (Campina)/1% Bovine Albumine Serum (Sigma, A3803-100g). Dit werd een uur geïncubeerd bij 37°C en vervolgens 3 keer gewassen met PBS met 0,05% Tween-20 en 1 keer met PBS (1 ml per well)

Om de plaques te kleuren werd er een 3-amino-9-ethyl-carbazole (AEC, Sigma, A-6926) substraatoplossing klaargemaakt. Deze oplossing bestaat uit een tablet (20 mg) AEC, dit werd opgelost in 5 ml dimethylsulfoxide (DMSO) tot een concentratie van 4 mg/ml. Van deze oplossing werd 0,5 ml gebruikt en toegevoegd aan 1,7 ml 1,1M NatriumAcetaatbuffer (SVM, 2204719), 7,8 ml aquadest (Fresenius Kabi B.V.) en 10 μl 30% H₂O₂ (Merck, 3-26-36/37/39-45). Dit werd 30 minuten geïncubeerd bij kamertemperatuur en het resultaat kan vervolgens worden afgelezen. Hiervoor werden het aantal pfu's per verdunning geteld. Bijvoorbeeld 2 pfu's bij 10^{-7} is $2 \cdot 10^7$ virus/200 μl . $2 \cdot 10^7 \times \text{de verdunningsfactor (5x)} = 1 \cdot 10^8$ virus/ml.

§ 2.5 Stimulatie met het Respiratoir Syncytieel Virus, Lipopolysacharide en MOCK.

De hep2 cellen, muis DC's en humane DC's werden gestimuleerd met RSV, 100 $\mu\text{g/ml}$ lipopolysacharide (LPS, E.Coli Sigma, 026:B6) en MOCK. LPS is een goede controle voor RSV, omdat bekend is dat het de cellen stimuleert. Op deze manier kan gecontroleerd worden of RSV de cellen wel echt stimuleert. MOCK zijn cellen, die groeien onder dezelfde omstandigheden als de cellen die tijdens het maken van een virusbatch geïnfecteerd worden. MOCK wordt als controle gebruikt, om te kijken of er naast het virus nog andere substanties zijn die de cellen kunnen activeren, maar behoort een negatief resultaat te geven. RPMI is een negatieve controle van cellen, die zich in schoon celmedium bevinden.

Voor de virusstimulatie werd de hoeveelheid toe te voegen ml virus berekent. Bij de humane en muis dendritische cellen, werd de hoeveelheid virus direct aan het medium toegevoegd en werd er 2h geïncubeerd. Hierna werden de cellen een aantal keer gewassen met Optimem en weer terug in kweek gebracht. Verder vond de incubatie plaats volgens een tijdschema. Bij de hep2 cellen werd het medium eerst van de cellen

afgepipetteerd. De cellen werden gewassen met PBS. Hierna werd er een virusoplossing gemaakt in medium en toegevoegd aan de hep2 cellen, zodat de cellen niet droog stonden. De cellen werden 2 uur geïncubeerd bij 35°C. Het medium met virus werd afgepipetteerd, de cellen gewassen en schoon medium werd toegevoegd om vervolgens volgens een tijdschema de cellen te laten incuberen bij 35°C 5% CO₂.

§ 2.6 De fluorescentie flowcytometrie kleuring ten behoeve van eiwitexpressie en het aantonen van het Respiratoir Syncytieel Virus.

De fluorescentie flowcytometrie is een apparaat wat door middel van het aanstralen van fluorochromen de intensiteit kan meten van antilichamen. Door fluorescentie flowcytometrie kleuringen moet er duidelijkheid ontstaan over de eiwitexpressie bij muis DC's en bij humane DC's. De eiwitexpressie werd bekeken door naar verschillende proteïnen te kijken, die bij stimulatie met LPS een verhoogde eiwitexpressie laten zien. Met een RSV fluorescentie flowcytometrie kleuring werd het virus aangetoond aan de oppervlakte van de cellen. Ook werd door middel van intracellulaire fluorescentie flowcytometrie bekeken of het virus de cel binnenkomt en repliceert.

§ 2.7 Extracellulaire fluorescentie flowcytometrie kleuring.

Tijdens een extracellulaire fluorescentie flowcytometrie kleuring kan er naar verschillende producten gekeken worden, bijvoorbeeld de eiwitexpressie en extracellulair gebonden virus. Eiwitten waar in dit onderzoek naar gekeken werd bij muis DC's en humane DC's zijn weergegeven in tabel 1.

Tabel 1: Eiwitten onderzocht bij muis DC's en humane DC's.

Eiwitten muis DC's	Eiwitten humane DC's
CD40	CD14
CD80	CD80
CD86	CD83
MHC-II	HLA-DR
ICAM-1	IgG1

CD40, CD80 en CD86 zijn muis DC markers, ICAM-I is een adhesiemolecuul en MHC-II is het antigeen presenterende molecuul. De humane CD14 komt voor bij humane perifere bloed monocyten en humane macrofagen. Humaan CD80 is een marker voor geactiveerde B cellen, DC's, macrofagen en geactiveerde CD4⁺ en CD8⁺ T cellen en humaan CD83 komt voor op verschillende soorten DC's. IgG1 is een isotype controle. Om de eiwitexpressie op de cellen te bekijken, werden de cellen gelabeld met een fluorochroom gelabeld antilichaam.

Voordat de cellen gekleurd werden, moesten ze eerst geoogst worden. De muizen DC's zijn licht hechtende cellen en kunnen met een pipet makkelijk worden geresuspendeerd. De humane DC's hechten op de bodem van de celkweekplaat en werden met een schraper los geschrapt. De hep2 cellen werden getrypsiniseerd en daarna geoogst. Vervolgens werden de muis DC's en humane DC's afgedraaid bij 4°C, 400g, 7 minuten. De hep2 cellen werden 8 minuten afgedraaid bij 1200 rpm. Na het afdraaien werd het supernatant afgenomen en cellen werden opgenomen in een hoeveelheid buffer (1x PBS met 0,5% BSA) voor een concentratie van +/- 50 000 cellen per 100 µl. De cellen werden uitgevuld in een 96 wells V-shape plaat (Cellstar,

651180) en 7 minuten afgedraaid bij 4°C, 400g. De cellen worden geresuspendeerd in 100 µl buffer met 1,0 mg/ml 1:100 2.4G2 (Bioceros B.V.) om specifieke bindingen tegen te gaan. Voor de muizen DC's werd ook nog 0,5 mg/ml 1:100 α-CD11C-biotine (BD Pharmingen, 553800) en 0,2 mg/ml 1:200 α-B220-Cy5 (BD Pharmingen, 553091) toegevoegd. CD11C en B220 zijn eiwitmarkers, die tot expressie worden gebracht bij muis DC's.

Vervolgens werd het antilichaam met fluorochroom aan de mix toegevoegd (tabel 2).

Tabel 2: Antilichamen gebruikt voor de muizen DC's en humane DC's.

Antilichamen muis DC's		Antilichamen humane DC's	
1:20	α-CD40 (BD Pharmingen, 553791)	1:5	α-HLA-DR-FITC (Sanquin, M1607)
1:40	α-CD80 (BD Pharmingen, 553769)	1:100	α-CD14-PE(BD biosciences, 345785),
1:20	α-CD86 (BD Pharmingen, 553692)	1:50	α-CD80-FITC (BD biosciences, 557226)
1:200	α-ICAM-I (BD Pharmingen, 553253)	1: 17	α-CD83-FITC (BD biosciences, 556910)
1:100	α-MHC-II (BD Pharmingen, 557000)	1:10	α-IgG1-PE(BD biosciences, 345816)

Deze kleuringstappen werden een halfuur geïncubeerd bij 4°C in het donker. Hierna werden de cellen afgedraaid en klaargemaakt voor de fluorescentie flowcytometrie.

§ 2.8 Intracellulaire fluorescentie flowcytometrie kleuring

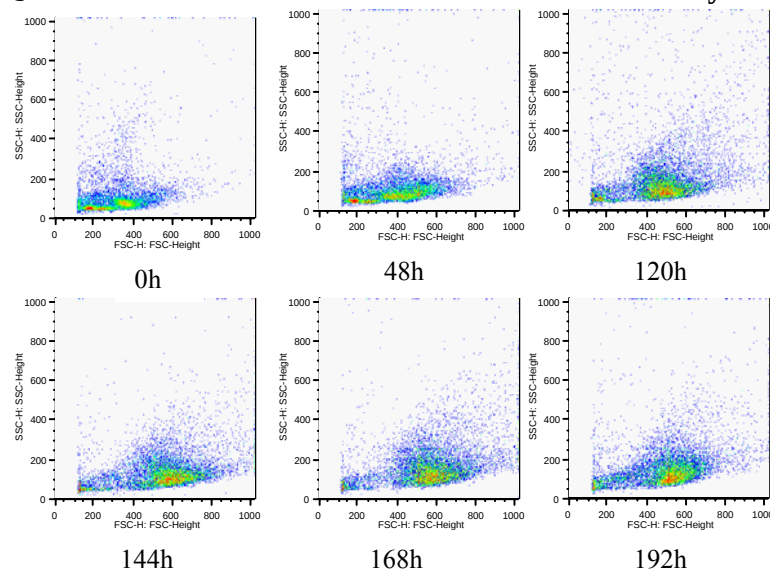
Wanneer de cellen (hep2 cellen, muis DC's en humane DC's) gestimuleerd en geïncubeerd werden met RSV werden de cellen geoogst en afgedraaid. De cellen werden geresuspendeerd in buffer (PBS met 0,5% BSA) en vervolgens overgebracht naar een 96 wells V-shape plaat. Daarna werden de cellen afgedraaid. Vervolgens werd de plaat 1x gewassen met 100 µl buffer en afgedraaid. De cellen werden geresuspendeerd in een oplossing met 1:100 2.4G2 en de extracellulaire kleuring werd toegevoegd. De extracellulaire kleuring bestond uit 4-5mg/ml 1:100 α-RSV-biotine (Bioscience, B658206) wat gelabeld werd met 1:250 streptavidine-PE (Caltag Laboratories, Sa1004-1). Dit werd een halfuur geïncubeerd bij 4°C in het donker. Vervolgens werden de cellen 1x gewassen met buffer en afgedraaid. Dan worden de cellen geresuspendeerd in Cytotfix/Cytoperm (BD biosciences, 51-2090KZ) oplossing. De cellen werden 20 minuten bij 4°C in het donker geïncubeerd en daarna 3x gewassen met 1x Permwash (BD biosciences, 51-2091KZ) oplossing. Vervolgens werd het intracellulaire fluorescentie antilichaam toegevoegd, 1:100 α-RSV-FITC (Chemicon, AB1128F) in een 1x Permwash oplossing. De cellen werden 30 minuten geïncubeerd bij 4°C in het donker en daarna 2x gewassen met 1x Permwash solution en 1x gewassen met buffer. Dan zijn de cellen klaar om gefixeerd te worden met een 1% paraformaldehyde oplossing. De cellen werden geanalyseerd met de fluorescentie flowcytometer.

§ 2.9 Fluorescentie flowcytometrie analyse

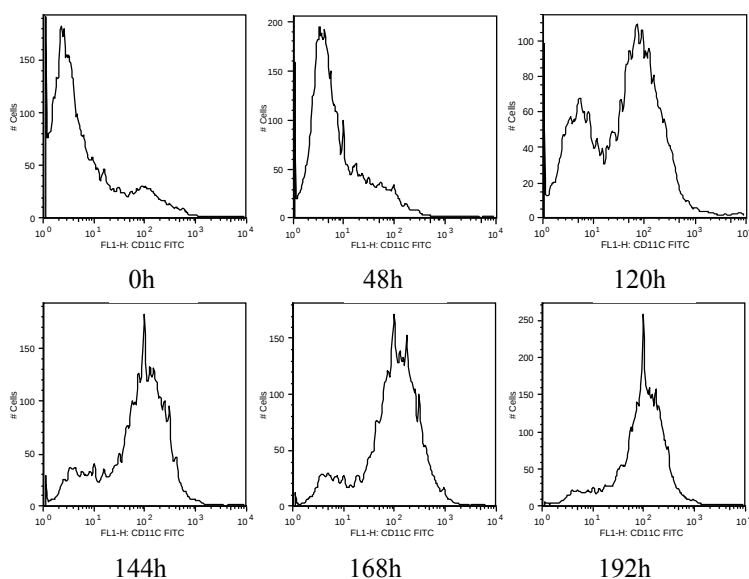
Met behulp van het programma Flowyo (Tree Star Inc., Ashland, OR) werden de fluorescentie flowcytometrie data geanalyseerd.

Hoofdstuk 3; Resultaten

§ 3.1 Dendritische cellen met de fluorescentie flowcytometer bekeken.



Figuur 5: Groei van muis DC's. Op de X-as is de grootte van de cellen weergegeven en op de Y-as de complexiteit van de cellen.



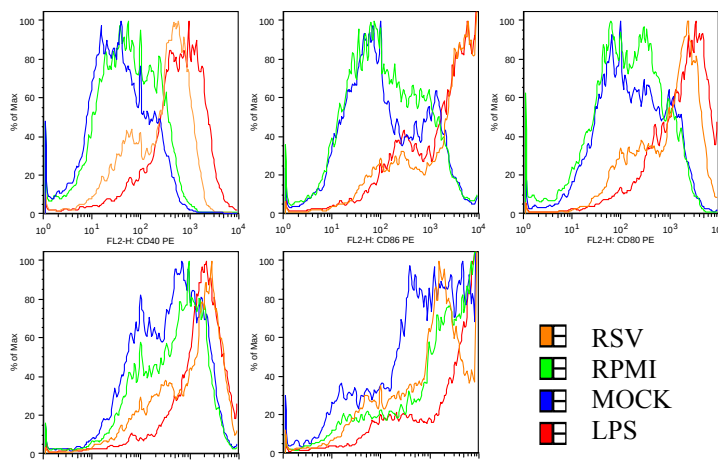
Figuur 6: De differentiatie van monocyten naar muis DC's. Op de X-as is CD11C-FITC intensiteit weergegeven, een muis DC marker. Op de Y-as is het aantal positieve cellen in procenten weergegeven.

wordt er een laag CD11C-FITC intensiteit gemeten. Bij 120h zijn 2 pieken weergegeven, waarvan de laagste piek de populatie cellen aangeeft, die nog ongedifferentieerd zijn. De hoge piek geeft de populatie cellen aan, welke al wel gedifferentieerd zijn naar DC's. In het verloop van de tijd wordt de intensiteit van CD11C-FITC hoger. Er zijn dus meer monocyten gedifferentieerd in muis DC's. Na 192h zijn bijna alle monocyten gedifferentieerd.

Muis monocyten worden opgewerkt uit muizenbeenmerg, welke differentiëren door de groeifactor GM-CSF naar muis DC's. Monocyten zijn kleine cellen vergeleken met de DC's. De fluorescentie flowcytometer bepaald ook de complexiteit (SSC) van een cel en de grootte van cellen (FSC). De complexiteit van een cel wordt bepaald door de hoeveelheid granules die de cel bezit. In het

verloop van de tijd wordt de cel complexiteit groter, dit is te zien aan de verandering van het waaierpatroon. (figuur 5). De celgroep verschuift naar recht, dit houdt in dat de cellen groter worden. Na 7 dagen zijn de cellen gedifferentieerd tot immature DC's om gebruikt te worden bij virusstimulaties. De differentiatie van monocyten naar dendritische cellen wordt weergegeven door de DC marker CD11C (figuur 6). Bij 0h en 48h

Tijdens een stimulatie met RSV matureren de gedifferentieerde muis DC's. Een kenmerk van maturatie is verhoogde expressie van eiwitten. De RSV stimulatie verhoogt de expressie van CD40, CD80, CD86, ICAM-I en MHC-II bij muizen DC's (figuur 7). De verhoogde expressie bij deze eiwitten, was de aanleiding voor het verder onderzoeken van DC's bij een RSV stimulatie.



Figuur 7: Opregulatie van eiwit expressie bij muis DC's na stimulatie met RSV. Op de X-as is de eiwit expressie weergegeven van de verschillende eiwitten. Op de Y-as staat de intensiteit van α -RSV-FITC. Hoe hoger de intensiteit hoe meer α -RSV-FITC aan de cel gebonden heeft.

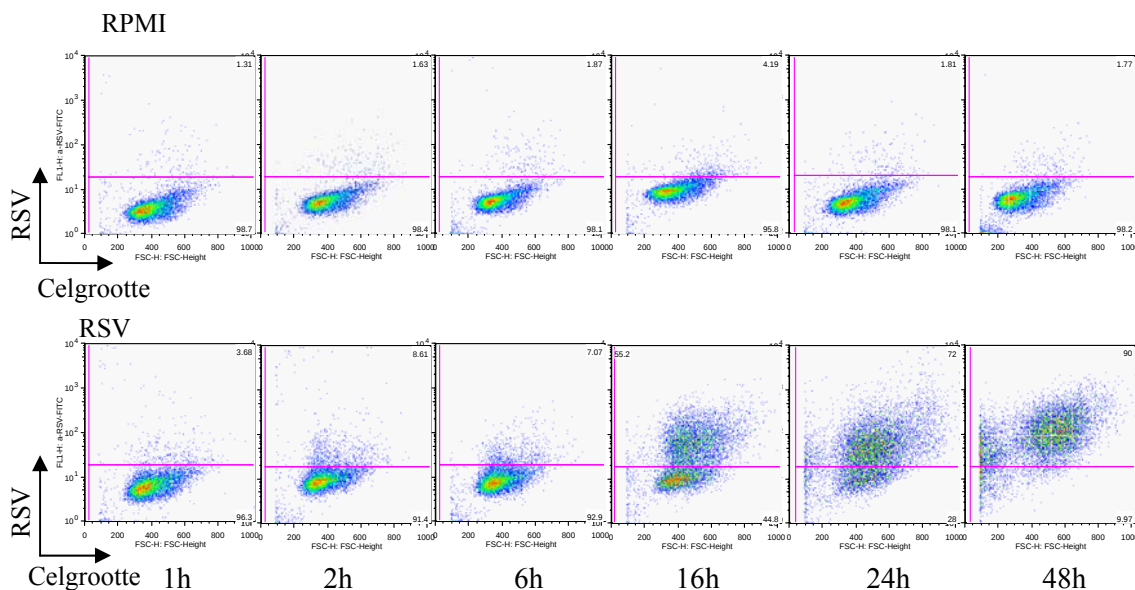
§ 3.2 De extracellulaire fluorescentie flowcytometrie kleuring van RSV bij hep2 cellen en muis dendritische cellen.

Het is niet zeker of de opregulatie van eiwitten bij muis DC's wordt veroorzaakt door het binden van RSV aan het plasmamembraan. Om deze binding te detecteren, wordt er gebruik gemaakt van een extracellulaire fluorescentie flowcytometrie kleuring, waarbij RSV gedetecteerd wordt. Deze extracellulaire fluorescentie flowcytometrie kleuring wordt eerst getest op hep2 cellen, vervolgens op de muis en humane DC's. Hep2 cellen komen voort uit een humane epitheelcellijn, die vergeleken kan worden met het epitheelweefsel wat ook de luchtwegen bekleedt en is goed infecteerbaar met RSV. Hep2 cellen zijn daarom een goede controle naast de muizen DC's. Een andere controle is MOCK.

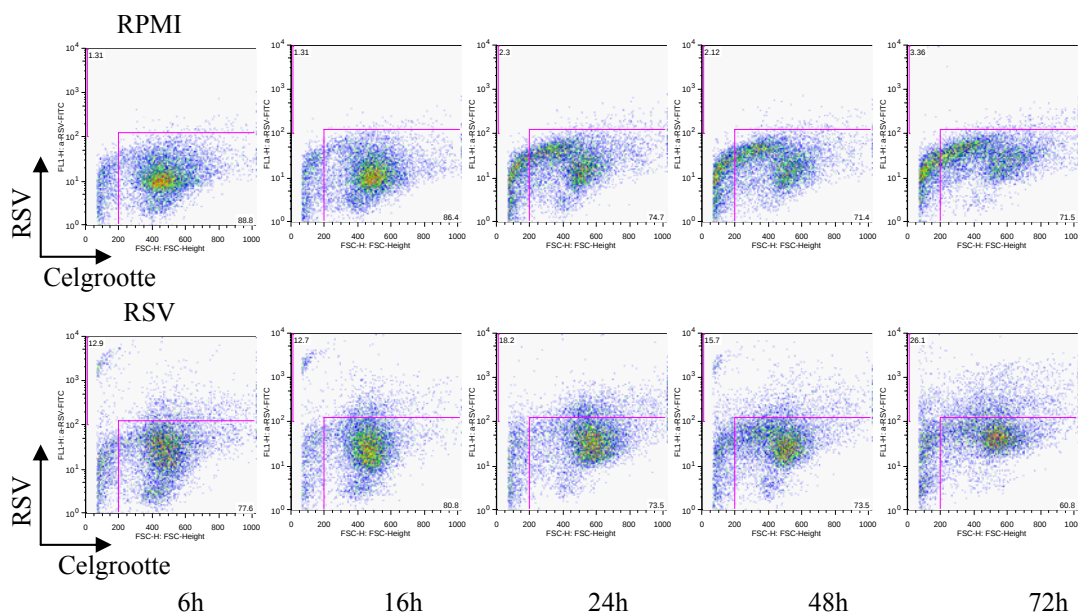
Voor de extracellulaire fluorescentie flowcytometrie kleuring wordt gebruik gemaakt van het antilichaam α -RSV-FITC. Het is een polykonaal antilichaam en bindt aan alle eiwitten van RSV. Een concentratie bepaling voor het α -RSV-FITC antilichaam was nodig om de juiste concentratie te vinden, die geschikt was om RSV te binden.

Met de extracellulaire fluorescentie flowcytometrie kleuring bij hep2 cellen, is de intensiteit gemeten van α -RSV-FITC (figuur 8). Met het verstrijken van de tijd wordt de intensiteit van α -RSV-FITC hoger. Bij 48h is 90% van de celpopulatie positief.

Muis DC's geïnfecteerd met een hogere MOI dan hep2 cellen, hebben in het verloop van de tijd een lagere toename van de α -RSV-FITC intensiteit (figuur 9). Na 48h is 15,7% van de cellen positief. Een lichte toename in intensiteit van α -RSV-FITC, wil niet zeggen dat er replicatie plaats vindt. Een intracellulaire kleuring moet dit verder uitwijzen.



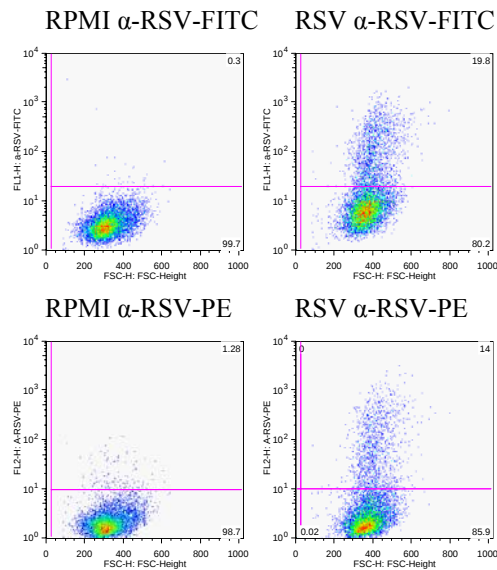
Figuur 8: Extracellulaire kleuring van RSV in hep2 cellen, MOI 0,1. In de bovenste rij grafieken zijn de hep2 cellen weergegeven, die niet geïnfecteerd zijn met RSV. In de onderste rij grafieken zijn de hep2 cellen weergegeven, die wel geïnfecteerd zijn met RSV met een MOI 0,1. Op de X-as is de grootte van de cellen weergegeven en op de Y-as de intensiteit van α -RSV-FITC. Hoe hoger de intensiteit hoe meer α -RSV-FITC aan de cel gebonden heeft.



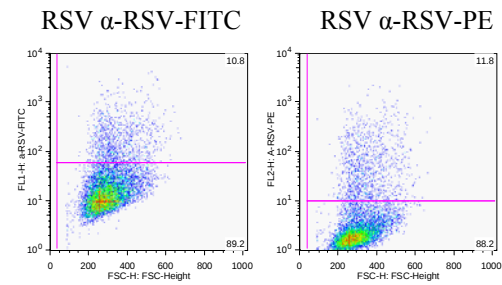
Figuur 9: Extracellulaire kleuring van RSV in muizen DC's, MOI 10. In de bovenste rij grafieken is een negatieve controle weergegeven en in de onderste rij grafieken zijn de muis DC's weergegeven, die zijn geïnfecteerd met RSV. Op de X-as is grootte van de cellen weergegeven en op de Y-as de intensiteit van α -RSV-FITC.

§ 3.3 De intracellulaire fluorescentie flowcytometrie kleuring van RSV bij hep2 cellen.

Het binnenkomen in de cel en replicatie van RSV wordt onderzocht door intracellulaire fluorescentie flowcytometrie. Het antilichaam voor de intracellulaire kleuring is α -RSV-FITC. Het is een eenstapskleuring, welke door de poriën heen kan en bindt aan het intracellulaire virus. Doordat α -RSV-FITC een eenstapskleuring is, is



Figuur 10: Intracellulaire kleuring van hep2 cellen na 48h, MOI 0,5. De bovenste twee grafieken geven de negatieve controle en cellen geïnfecteerd met RSV weer met α -RSV-FITC. De onderste twee grafieken geven de negatieve controle en cellen geïnfecteerd met RSV met α -RSV-PE weer. Op de X-as is celgrootte weergegeven en op de Y-as is intensiteit van α -RSV-FITC en α -RSV-PE.

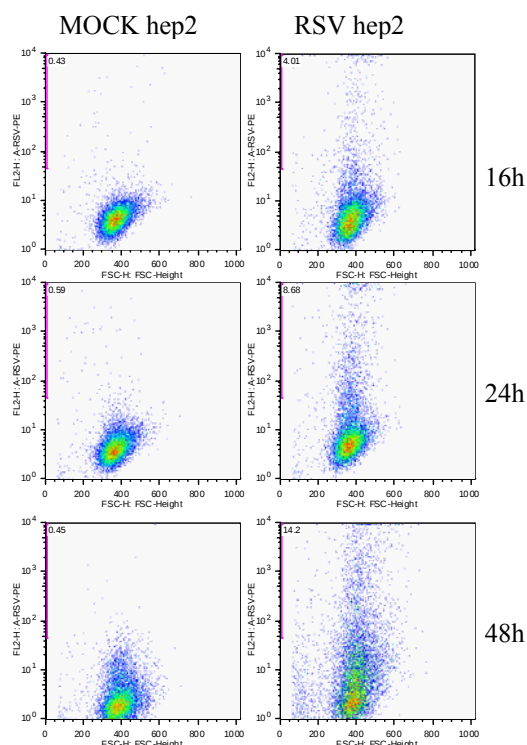


Figuur 11: Extracellulaire kleuring RSV hep2 tegelijk met intracellulaire kleuring. Op de X-as is de grootte van de cellen weergegeven. Op de Y-as is de intensiteit van α -RSV-FITC en α -RSV-PE. De eerste grafiek laat de extracellulaire kleuring zien, waarbij eerst α -RSV-PE is toegevoegd en vervolgens α -RSV-FITC. In de tweede grafiek is de extracellulaire kleuring weergegeven met α -RSV-PE.

er minder kans op specifieke binding dan met α -RSV-PE. RSV is ook extracellulair aanwezig, om het extracellulaire virus te binden wordt α -RSV-PE gebruikt. Tevens blokt dit de RSV bindingsplaatsen van α -RSV-FITC, want α -RSV-FITC bindt ook extracellulair RSV. Hoe hoger de intensiteit van α -RSV-FITC, hoe meer α -RSV-FITC er gebonden heeft aan een cel.

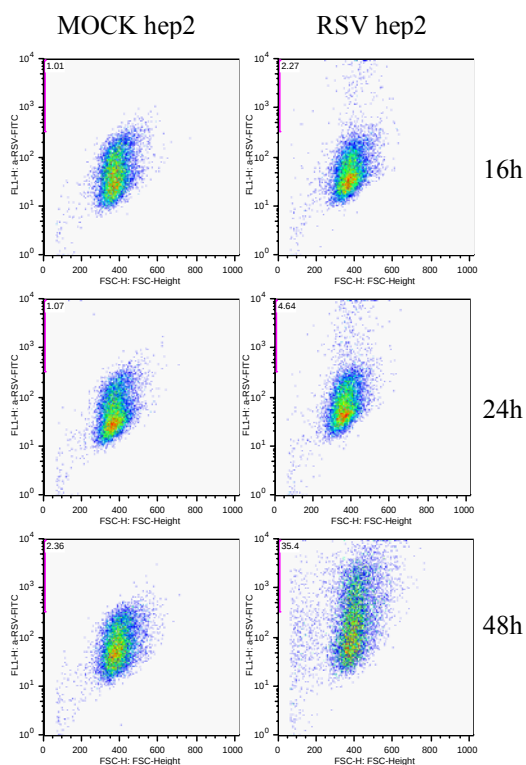
De intracellulaire kleuring bracht problemen met zich mee. α -RSV-biotine was niet specifiek genoeg of niet voldoende om al het RSV extracellulair te binden. Dit had tot gevolg dat het α -RSV-FITC ook extracellulair RSV ging binden. Het toevoegen van een overmaat α -RSV-biotine was niet voldoende om al het virus te blokkeren. De cellen infecteren met een lagere MOI en een hogere concentratie α -RSV-biotine gaf geen gewenst resultaat.

Hep2 cellen hebben, bij een intracellulaire kleuring, een hogere α -RSV-FITC intensiteit dan MOCK, wanneer zij geïnfecteerd zijn met RSV (figuur 10). Intracellulair en extracellulair is er een verhoging in intensiteit van α -RSV-PE en α -RSV-FITC. Bij de extracellulaire kleuring, waarbij de cellen niet gepermeabiliseerd zijn, is de α -RSV-FITC intensiteit hoog (figuur 11). Door de hoge intensiteit van α -RSV-FITC is niet zeker of α -RSV-FITC intracellulair bindt. Een extra blockstap zou de intensiteit van α -RSV-FITC verlagen en specifieke binding tegen gaan. Als blockstap werd geitserum of BSA gebruikt. Het geitserum verlaagde de intensiteit van α -RSV-FITC niet. BSA blokte teveel af, hierdoor nam de α -RSV-PE intensiteit af. Een andere optie was de cellen extra te wassen met PBS. Extracellulair gebonden virus werd hierdoor weggewassen.

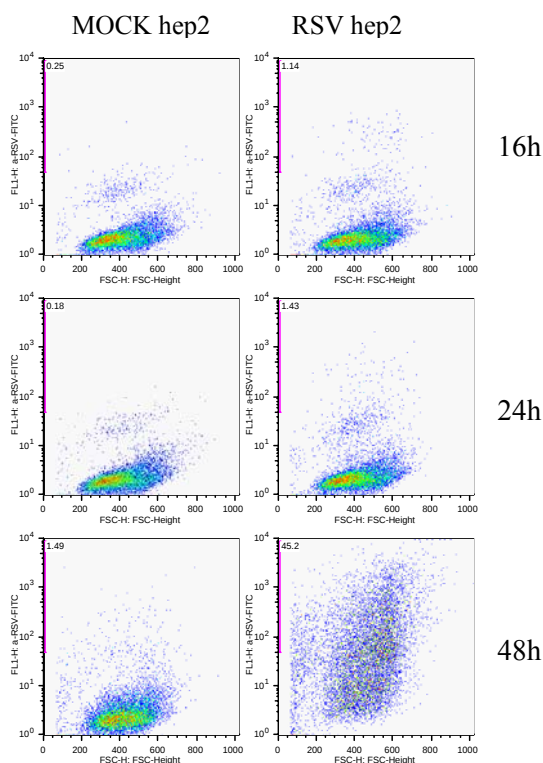


Figuur 12: Extracellulaire kleuring met RSV MOI 0,2. Op de X-as is de grootte van de cellen weergegeven en op de Y-as de α -RSV-PE intensiteit.

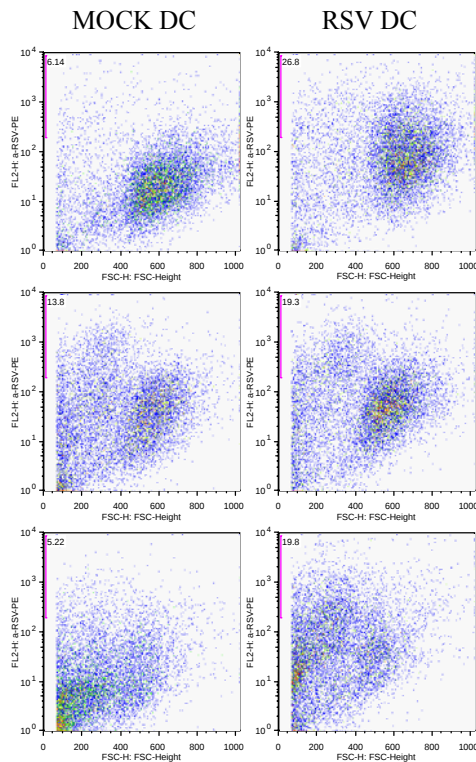
Als de cellen na infectie worden gewassen, vindt in het verloop van de tijd een verhoging plaats van de α -RSV-PE intensiteit (figuur 12). Mock is negatief. De intensiteit van α -RSV-FITC neemt toe vergeleken met MOCK (figuur 13). Dit wil niet zeggen dat de α -RSV-FITC intensiteit intracellulair is. De intensiteit van α -RSV-FITC is hoog bij 48h, wanneer de cellen niet gepermeabiliseerd zijn en er vooraf een α -RSV-PE kleuring heeft plaatsgevonden (figuur 14). De binding van α -RSV-FITC zorgt voor een verstoring van de intracellulaire α -RSV-FITC signaal. Bij 16h en 24h is de intensiteit van α -RSV-FITC wel laag. α -RSV-PE blokt niet al het virus af na 24h.



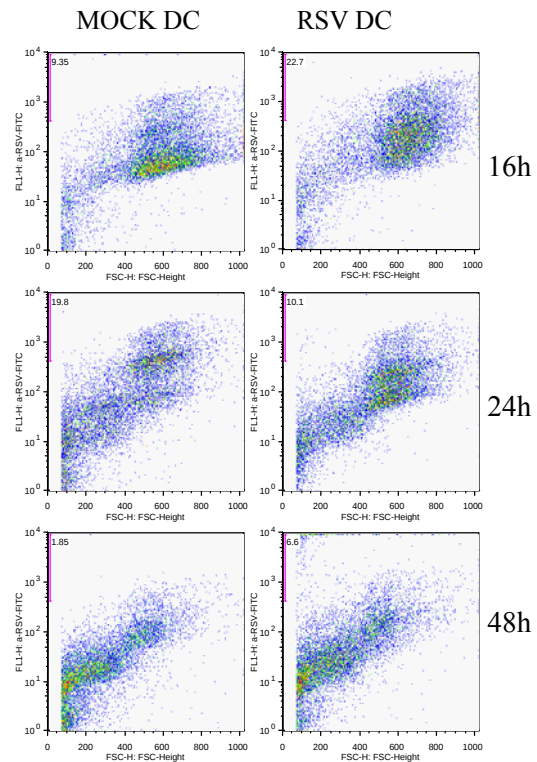
Figuur 13: Intracellulaire kleuring met RSV MOI 0,2. Op de X-as is de grootte van de cellen weergegeven. Op de Y-as de intensiteit van α -RSV-FITC.



Figuur 14: Extracellulaire kleuring hep2 RSV MOI 0,2. Op de X-as is de grootte van de cellen weergegeven en op de Y-as de intensiteit van α -RSV-FITC.



Figuur 15: Extracellulaire kleuring muis DC RSV MOI 10. Op de X-as is de grootte van de cellen weergegeven en op de Y-as de intensiteit van α -RSV-PE.

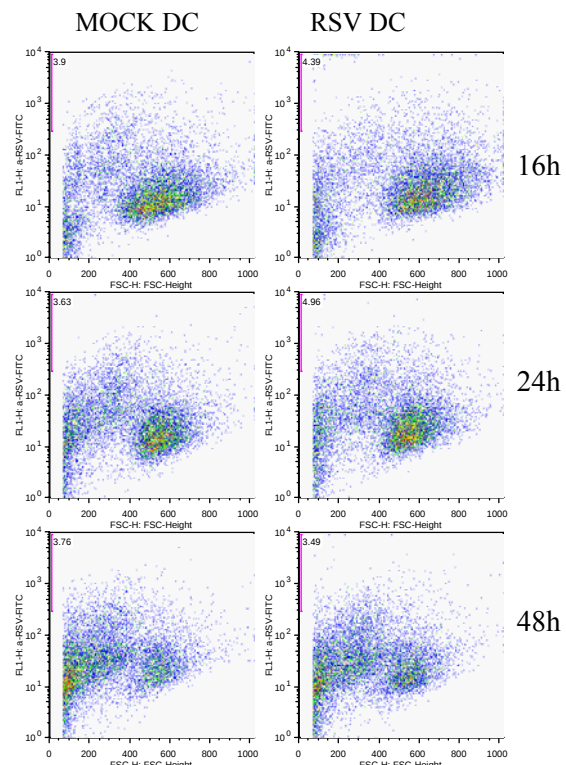


Figuur 16: Intracellulaire kleuring muis DC, RSV MOI 10. Op de X-as is de grootte van de cellen weergegeven en op de Y-as de intensiteit van α -RSV-FITC.

§ 3.4 De intracellulaire fluorescentie flowcytometrie kleuring van RSV bij muis dendritische cellen.

Muis dendritische cellen werden bij de intracellulaire kleuring geïnfecteerd met RSV met een MOI van 10 (figuur 15). In het verloop van de tijd neemt de α -RSV-PE intensiteit af. Deze afname vindt plaats na 16h. Zowel de MOCK als RSV hebben een hoge fluorescentie. Dit is waarschijnlijk te wijten aan aspecifieke binding van het antilichaam. Bij 48h wordt de populatie cellen kleiner.

Tegelijkertijd met de intracellulaire fluorescentie cytometrie wordt er ook een extracellulaire fluorescentie cytometrie uitgevoerd met α -RSV-FITC (figuur 16). De cellen geïnfecteerd met MOCK hebben een hoge achtergrondfluorescentie. In het verloop van de tijd neemt het aantal positieve



Grafiek 17: Extracellulaire kleuring muis DC, RSV MOI 10. Op de Y-as is grootte van de cellen weergegeven. Op de Y-as is de intensiteit van α -RSV-FITC weergegeven.

cellen af bij de DC's geïnfecteerd met RSV. Bij de extracellulaire kleuring van muis DC's nam de intensiteit van α -RSV-PE ook af. Wanneer de cellen niet gepermeabiliseerd worden is de intensiteit van α -RSV-FITC, ook bij de geïnfecteerde cellen, laag (figuur 17).

Hoofdstuk 4; Conclusie en discussie

In deze studie wordt door middel van een extracellulaire fluorescentie flowcytometrie kleuring en intracellulaire fluorescentie flowcytometrie kleuring de binding van het virus, het binnen komen van het virus en virusrepletatie onderzocht in muis DC's, humane DC's en hep2 cellen.

DC's bevinden zich onder het epitheelweefsel, wat de bronchiën en de alveoli bekleedt. De DC's kunnen met hun uitlopers om de epitheelcellen heen en zo de bronchiën of alveoli bereiken. Door hun strategische ligging aan het begin van de luchtwegen zouden ze geïnfecteerd kunnen worden met RSV. Veel onderzoek richt zich op RSV infectie in muis en humane DC's omdat de DC een centrale rol in het immuunsysteem heeft en van belang kan zijn voor de immuunrespons tegen RSV (Guerrero-Plata, et al. 2006, (Jones, Morton et al. 2006). Muis DC's zijn minder vatbaar voor RSV, omdat RSV een humaan virus is en deze variant oorspronkelijk niet voorkomt bij muizen. Dierenstudies tonen wel een verhoging aan van pulmonaire dendritische cellen in een respiratoire virus infectie bij muizen (Jones, Morton et al. 2006).

Muis DC's geïnfecteerd met RSV hebben een verhoogde expressie van CD40, CD80, CD86, ICAM-I en MHC-II. RSV zou de cellen stimuleren tot deze maturatie. De intensiteit van α -RSV-FITC bij extracellulaire fluorescentie flowcytometrie verhoogd in het verloop van de tijd. RSV kan de muis DC's binden. Bij de intracellulaire fluorescentie flowcytometrie neemt de intensiteit van α -RSV-FITC af in het verloop van de tijd. RSV repletieert niet in muis DC's, maar zou de cel wel kunnen binden en binnenkomen. In muis DC's vindt geen repletatie plaats, dit zou verklaard kunnen worden doordat RSV oorspronkelijk niet voorkomt bij muizen. Het is niet zeker of intracellulair RSV door α -RSV-FITC wordt gedetecteerd bij de intracellulaire fluorescentie flowcytometrie en dat het geen aspecifieke binding is, hiervoor zijn meer controles nodig. Muis DC's oefenen waarschijnlijk wel een belangrijke functie uit op het immuunsysteem tijdens een RSV infectie, maar worden zelf niet geïnfecteerd met RSV. Bekend is dat RSV DC's aantrekt, welke vervolgens naar de kant van de virale infectie migreren. Aantrekking tussen DC's en de nasale mucosa is niet specifiek voor een RSV infectie. Ook bij andere respiratoire virus infecties, migreren de DC's naar de kant van ontsteking (Gill, Palucka et al. 2005).

Bij de extracellulaire fluorescentie flowcytometrie neemt de intensiteit van α -RSV-FITC bij hep2 cellen in het verloop van de tijd toe. RSV bindt aan hep2 cellen. Bij de fluorescentie flowcytometrie intracellulair neemt de intensiteit van α -RSV-FITC ook toe. Bij 48h is de intensiteit van α -RSV-FITC extracellulair hoger dan de intensiteit intracellulair van α -RSV-FITC. RSV repletieert in hep2 cellen en bevindt zich na 48h op de oppervlakte van hep2 cellen (Bachi 1988).

Tijdens de intracellulaire fluorescentie flowcytometrie was de intensiteit van α -RSV-FITC hoog. Bij de extracellulaire kleuring, wanneer het extracellulair RSV gebonden werd door α -RSV-PE, was de intensiteit van α -RSV-FITC nog steeds hoog. Mogelijk was de concentratie α -RSV-biotine niet toerijkend of was aspecifieke binding van α -RSV-FITC de oorzaak. Een hoge concentratie van α -RSV-biotine veroorzaakte aspecifieke binding. Een afname in intensiteit van α -RSV-FITC bleef uit. Bij een lagere MOI werd meer virus gebonden door α -RSV-PE, maar nog niet genoeg. Een

extra blockstap met geitserum veranderde niets aan de intensiteit van α -RSV-FITC en BSA blokkeerde teveel. De intensiteit van α -RSV-biotine nam hierdoor af. Als 2h na infectie het virus werd weggewassen, nam de α -RSV-FITC intensiteit extracellulair af.

Humane DC's zijn waarschijnlijk betrokken bij een RSV infectie. Het is belangrijk om te onderzoeken of humane DC's geïnfecteerd worden met RSV. DC's activeren de T cellen door het uitscheiden van cytokines. Wanneer IFN- γ wordt uitgescheiden, ontwikkelt er een Th₂ milieu. Een Th₂ immuunrespons geeft een ernstig ziektebeeld. Veel kinderen ontwikkelen een Th₂ immuunrespons. DC's geïnfecteerd met RSV zouden mogelijk deze immuunrespons stimuleren.

Om humane DC's te infecteren met RSV werd een kweekprocedure voor humane DC's opgezet. Uit PBMC's worden monocysten geïsoleerd, welke differentiëren naar humane DC's. Door middel van adhesie aan plastic werden monocysten gescheiden van de andere PBMC's. Deze procedure was niet toerikend. Teveel restcellen, zoals T-cellen en erythrocyten waren nog in de kweek aanwezig. De intensiteit van α -RSV-FITC bij RSV geïnfecteerde humane DC's was uitermate laag. LPS verkregen uit E.coli stimuleerde de humane DC's niet. Met een andere methode kunnen humane DC's ook gekweekt worden. De populatie CD14⁺ cellen, wordt geïsoleerd uit de PBMC's door magnetische CD14⁺ beads. IL-4 en GM-CSF worden als stimulatiefactoren gebruikt. De kweek bevat alleen cellen met CD14, dit zijn monocysten en macrofagen. Resultaten van humane DC's gekweekt door middel van magnetische beads zijn nog niet bekend. Uit andere studies is gebleken dat humane immature DC's geïnfecteerd kunnen worden met RSV, MOI 5. De humane DC's matureren bij 48h. (de Graaff, de Jong et al. 2005). Een andere recente studie wees uit dat bovine RSV de expressie van MHC-I en MHC-II, CD80 en CD86 uit monocysten geïnfecteerde bovine DC's verlaagt. In humane DC's wordt juist een verhoging gevonden van deze eiwitexpressie (Jones, Morton et al. 2006). Bekend is dat immature humane DC's, wanneer zij geïnfecteerd worden met RSV in apoptosis gaan. Deze vroegtijdige celdood gaat T cel activatie tegen en zo ook de celgemedieerde immuunrespons. Immature met RSV geïnfecteerde DC's verlagen de IFN- γ productie, hierdoor kan het virus ontkomen aan de immuunrespons (Bartz H, Turkel O et al. 2003).

Toekomstige werkzaamheden richten zich op de humane DC kweek. De humane DC's worden geïnfecteerd met RSV. Extracellulaire fluorescentie flowcytometrie zal uitwijzen of RSV humane DC's in het verloop van de tijd bindt. Met PCR wordt eventuele replicatie in de humane DC's aangetoond. De intracellulaire fluorescentie flowcytometrie wordt voorlopig stopgezet. In het optimaliseren van deze test gaat te veel tijd zitten.

Bronvermelding

Bachi, T. (1988). "Direct observation of the budding and fusion of an enveloped virus by video microscopy of viable cells." J Cell Biol **107**(5): 1689-95.

Bermingham, A. and P. L. Collins (1999). "The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(20): 11259-64.

Collins, P. L. and B. R. Murphy (2002). "Respiratory syncytial virus: reverse genetics and vaccine strategies." Virology **296**(2): 204-11.

de Graaff, P. M., E. C. de Jong, et al. (2005). "Respiratory syncytial virus infection of monocyte-derived dendritic cells decreases their capacity to activate CD4 T cells." J Immunol **175**(9): 5904-11.

Falsey, A. R., P. A. Hennessey, et al. (2005). "Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults." N Engl J Med **352**(17): 1749-59.

Ghildyal, R., A. Ho, et al. (2006). "Central role of the respiratory syncytial virus matrix protein in infection." FEMS Microbiol Rev **30**(5): 692-705.

Gill, M. A., A. K. Palucka, et al. (2005). "Mobilization of plasmacytoid and myeloid dendritic cells to mucosal sites in children with respiratory syncytial virus and other viral respiratory infections." J Infect Dis **191**(7): 1105-15.

Guerrero-Plata, A., A. Casola, et al. (2006). "Differential response of dendritic cells to human metapneumovirus and respiratory syncytial virus." Am J Respir Cell Mol Biol **34**: 320-9.

Hacking, D. and J. Hull (2002). "Respiratory syncytial virus--viral biology and the host response." J Infect **45**(1): 18-24.

Henderson, G., J. Murray, et al. (2002). "Sorting of the respiratory syncytial virus matrix protein into detergent-resistant structures is dependent on cell-surface expression of the glycoproteins." Virology **300**(2): 244-54.

Ivan Roitt, J. B., David Male (2001). Immunology, Mosby.

J.L.L. Kimpen, J. C. d. J. Acute bronchiolitis bij kinderen.

Jones, A., I. Morton, et al. (2006). "Differentiation and immune function of human dendritic cells following infection by respiratory syncytial virus." Clin Exp Immunol **143**(3): 513-22.

Kim, H. W., J. G. Canchola, et al. (1969). "Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine." Am J Epidemiol **89**(4): 422-34.

Liuzzi, M., S. W. Mason, et al. (2005). "Inhibitors of respiratory syncytial virus replication target cotranscriptional mRNA guanylation by viral RNA-dependent RNA polymerase." J Virol **79**(20): 13105-15.

Morris, J. A., M. Saglam, et al. (1965). "Recovery of a new syncytium virus from a cottontail rabbit." J Infect Dis **115**(5): 495-9.

Ogra, P. L. (2004). "Respiratory syncytial virus: the virus, the disease and the immune response." Paediatr Respir Rev **5 Suppl A**: S119-26.

Peter L. Collins, R. M. C., and Brian R. Murphy (2001). Respiratory Syncytial Virus, Lippincott Williams & Wilkens.

Pinto, R. A., S. M. Arredondo, et al. (2006). "T helper 1/T helper 2 cytokine imbalance in respiratory syncytial virus infection is associated with increased endogenous plasma cortisol." Pediatrics **117**(5): e878-86.

Shortman, K. and S. H. Naik (2007). "Steady-state and inflammatory dendritic-cell development." Nat Rev Immunol **7**(1): 19-30.

Smit, J. J., B. D. Rudd, et al. (2006). "Plasmacytoid dendritic cells inhibit pulmonary immunopathology and promote clearance of respiratory syncytial virus." J Exp Med **203**(5): 1153-9.

Techaarpornkul, S., P. L. Collins, et al. (2002). "Respiratory syncytial virus with the fusion protein as its only viral glycoprotein is less dependent on cellular glycosaminoglycans for attachment than complete virus." Virology **294**(2): 296-304.