

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
Direktor: Prof. Dr. Ralf Kinscherf
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Zentrum der Inneren Medizin
Medizinische Klinik I des Universitätsklinikum Frankfurt am Main

Protektiver Effekt von Interferon Typ I auf die Barrierefunktion des humanen Atemwegsepithels während einer Rhinovirus-Infektion

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Helena Boland
aus Marburg

Marburg, 2023

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg am: 05.07.2023

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

Dekanin: Frau Prof. Dr. Denise Hilfiker-Kleiner

Referenten: Herr Prof. Dr. Ralf Kinscherf / Herr Prof. Dr. Gernot Rohde

Korreferent: Herr Prof. Dr. Ralf Jacob

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis	i
II. Abbildungsverzeichnis	iii
III. Tabellenverzeichnis	vi
1. Zusammenfassung und Summary	1
1.1. Zusammenfassung.....	1
1.2. Summary	3
2. Einleitung	5
2.1. Abwehrmechanismen des humanen Atemwegsepithels.....	5
2.1.1. Mechanische Abwehr	5
2.1.1.1. Mukoziliäre <i>Clearance</i>	7
2.1.1.2. Zell-Zell-Verbindungen	8
2.1.1.2.1. <i>Gap Junctions</i> , Desmosome, und <i>Adherence Junctions</i>	8
2.1.1.2.2. <i>Tight Junctions</i>	9
2.1.1.2.2.1. Claudin.....	10
2.1.1.2.2.2. <i>Zonula occludens</i>	11
2.1.2. Das angeborene Immunsystem in der Lunge.....	12
2.1.2.1. Pathogenerkennung und Signalwegs-Aktivierung der angeborenen Immunantwort.....	12
2.1.2.2. Zytokine	14
2.1.2.3. Interferone	16
2.1.2.3.1. Protektiver Effekt von IFN auf virale Infektionen <i>in vitro</i>	19
2.1.2.3.2. Unterschiede in der antiviralen Antwort verschiedener IFN-Subtypen.....	19
2.1.2.4. Oxidativer Stress während einer viralen Infektion.....	20
2.2. Respiratorische virale Infektionen	21
2.2.1. Humanes Rhinovirus	21
2.2.2. Einfluss viraler Infektionen auf epitheliale Barrieren	22
2.2.3. Bakterielle Sekundärinfektionen.....	24
2.2.3.1. <i>Streptococcus (S.) pneumoniae</i>	24
2.2.4. Auswirkungen von respiratorischen Infektionen auf Patienten mit chronischen Atemwegserkrankungen.....	25
2.3. Zielsetzung.....	26
3. Material und Methoden	27
3.1. Material	27
3.1.1. Organismen	27
3.1.2. Chemikalien, Enzyme, Medien, Puffer, Reagenzien.....	28

3.1.3. Molekularbiologische Kits	30
3.1.4. PCR-Assays	31
3.1.5. Geräte und Software	32
3.1.6. Verbrauchsmaterialien	34
3.2. Methoden	35
3.2.1. Zellkultur	35
3.2.1.1. Immortalisierte Zelllinien	35
3.2.1.1.1. Auftauen von immortalisierten Zellen	36
3.2.1.1.2. Passagieren von immortalisierten Zellen	36
3.2.1.1.3. Einfrieren von immortalisierten Zellen	36
3.2.1.2. Primäre bronchiale Epithelzellen	37
3.2.1.2.1. Beschichtung von Zellkulturflaschen und <i>Tissue Culture</i> -Inserts	37
3.2.1.2.2. Isolation und Anzucht von primären bronchialen Epithelzellen	37
3.2.1.2.3. Ablösen von primären bronchialen Epithelzellen	38
3.2.1.2.4. Einfrieren von primären bronchialen Epithelzellen	38
3.2.1.2.5. Charakterisierung von primären bronchialen Epithelzellen mittels Immunfluoreszenz	39
3.2.1.2.6. Kultivierung und Differenzierung von primären bronchialen Epithelzellen	40
3.2.1.2.7. Messung des transepithelialen Widerstands	41
3.2.1.2.8. FITC-Dextran-Assay	42
3.2.1.2.9. <i>Dot-Blot</i> zur Verifizierung der Mukusbildung	42
3.2.2. Viren	43
3.2.2.1. Herstellung und Aufkonzentrierung eines Pools HRV	43
3.2.2.2. Bestimmung der <i>Tissue Culture Infectious Dose</i> (TCID ₅₀)	44
3.2.2.3. Virale Infektion von Zellen	44
3.2.3. Bakterien	45
3.2.3.1. Anzucht von Bakterien	45
3.2.3.2. Lagerung von Bakterien	45
3.2.3.3. Einstellung der Bakterienkonzentration	45
3.2.3.4. Bakterielle Infektion von primären bronchialen Epithelzellen	46
3.2.4. Analysen zur Zellviabilität	46
3.2.4.1. MTT-Assay	46
3.2.4.2. LDH-Assay	47
3.2.5. Analyse und Modifikation von Nukleinsäuren	48
3.2.5.1. RNA-Isolation	48
3.2.5.2. cDNA-Synthese	48
3.2.5.3. Quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion	48

3.2.6. Generierung einer stabilen Reporterzelllinie zur Quantifizierung der Typ I/III Interferon-Aktivität	50
3.2.6.1. Transformation in <i>E. coli</i>	50
3.2.6.2. Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	51
3.2.6.3. Überprüfung der Transformation	51
3.2.6.4. Transfektion von A549-Zellen	52
3.2.6.5. Kulturrhaltung der stabilen Reporterzelllinie	52
3.2.6.6. Luciferase-Assay	53
3.2.7. Messung von Zytokinkonzentrationen.....	54
3.2.7.1. <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>	54
3.2.7.2. <i>Cytometric Bead Array</i>	54
3.2.8. Fluoreszenzmikroskopische Methoden	55
3.2.8.1. Vorbereitung der Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie	55
3.2.8.2. Konfokale <i>Laser Scanning</i> Mikroskopie.....	56
3.2.8.3. Nachweis von oxidativem Stress mit Hilfe von CellROX™	57
3.2.8.4. Quantifizierung von <i>Tight Junctions</i>	57
3.2.8.5. Quantifizierung der bakteriellen Translokation in die Zellschicht	58
3.2.9. Elektronenmikroskopie	59
3.2.10. Durchflusszytometrische Analysen	61
3.2.10.1. Ernte und Vorbereitung der Zellen	61
3.2.10.2. Färbung der Zellen	62
3.2.10.2.1. Annexin V- Propidiumiodid-Färbung.....	62
3.2.10.2.2. <i>LIVE/DEAD</i> -Assay.....	62
3.2.10.2.3. Bestimmung der Zilien-Entwicklung.....	63
3.2.10.3. Messen mit dem Durchflusszytometer	64
3.2.11. Statistik.....	65
3.2.12. Übersichtsschemata der Versuchsreihen dieser Arbeit.....	66
4. Ergebnisse	68
4.1. Vergleich verschiedener IFN-Subtypen	68
4.1.1. Klonierung und IFN-Stimulation einer stabilen Reporterzelllinie	68
4.1.2. ISG-Expression und Zellviabilität nach IFN-Stimulation in A549-Zellen	70
4.2. Antiviraler Effekt von IFN β auf A549-Zellen während einer HRV-Infektion.....	72
4.3. Primäre bronchiale Epithelzellen als Modell.....	75
4.4. Antiviraler Effekt von IFN β auf primäre bronchiale Epithelzellen während einer HRV-Infektion	78
4.4.1. Protektiver Effekt von IFN β in HRV-infizierten primären bronchialen Epithelzellen.....	78
4.4.2. ISG-Expression nach IFN β -Vorbehandlung in primären bronchialen Epithelzellen	80

4.4.3. Zellviabilität von IFN β -stimulierten und HRV-infizierten primären bronchialen Epithelzellen.....	81
4.4.4. Zytokinbestimmung in IFN β -stimulierten und HRV-infizierten primären bronchialen Epithelzellen.....	83
4.5. Effekt von IFN β auf die <i>Tight Junctions</i> und die Barrierefunktion primärer bronchialer Epithelzellen während einer HRV-Infektion.....	86
4.5.1. Effekt einer HRV-Infektion auf die <i>Tight Junctions</i> differenzierter primärer bronchialer Epithelzellen	86
4.5.2. Protektiver Effekt von IFN β auf die Barrierefunktion primärer bronchialer Epithelzellen während einer HRV-Infektion.....	87
4.5.2.1. Effekt von IFN β -Stimulation und HRV-Infektion auf die <i>Tight Junctions</i> primärer bronchialer Epithelzellen	88
4.5.2.2. Effekt von IFN β -Stimulation und HRV-Infektion auf unterschiedliche Zelltypen des Epithels	93
4.5.2.3. Effekt von Interferon β -Stimulation und Rhinovirus-Infektion auf die Funktion der epithelialen Barriere.....	97
4.6. Effekt von IFN β auf die Barrierefunktion von primären bronchialen Epithelzellen während einer viral-bakteriellen Ko-Infektion.....	100
4.6.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i> -Infektion in primären bronchialen Epithelzellen.....	100
4.6.2. Effekt von IFN β auf die Barrierefunktion primärer bronchialer Epithelzellen während einer Ko-Infektion mit HRV und <i>S. pneumoniae</i>	101
4.6.2.1. Bestätigung einer HRV-Infektion in primären bronchialen Epithelzellen vor einer Ko-Infektion mit <i>S. pneumoniae</i>	101
4.6.2.2. Effekt einer IFN β -Stimulation und einer viral-bakteriellen Ko-Infektion auf die Barrierefunktion von primären bronchialen Epithelzellen	102
4.6.2.3. Verminderte Einwanderung von <i>S. pneumoniae</i> durch IFN β -Vorbehandlung primärer bronchialer Epithelzellen während einer viral-bakteriell Ko-Infektion	104
4.7. Einblick in den Mechanismus HRV-induzierter Änderungen in der Barriere von primären bronchialen Epithelzellen.....	107
4.7.1. Effekt von Immunstimulanz auf die Barrierefunktion von primären bronchialen Epithelzellen.....	107
4.7.2. Nachweis von oxidativem Stress in IFN β -stimulierten primären bronchialen Epithelzellen während einer HRV-Infektion.....	111
4.7.2.1. Protektiver Effekt von IFN β in primären bronchialen Epithelzellen nach 2 - 12 - stündiger Infektion mit HRV	111
4.7.2.2. Effekt von IFN β -Stimulation auf die Funktion der epithelialen Barriere primärer bronchialer Epithelzellen nach 2 - 12-stündiger HRV-Infektion	112
4.7.2.3. Quantifizierung der reaktiven Sauerstoffspezies in IFN β -stimulierten und HRV-infizierten primären bronchialen Epithelzellen	113
5. Diskussion	115
5.1. Protektiver Effekt von IFN β	115
5.2. Primäre bronchiale Epithelzellen als Modell.....	118

5.3. Protektiver Effekt einer IFN β -Vorbehandlung auf primäre bronchiale Epithelzellen während einer HRV-Infektion	120
5.4. Auswirkung von IFN β auf die Barrierefunktion von primären bronchialen Epithelzellen während einer viral-bakteriellen Ko-Infektion.....	129
5.5. Einblick in den Mechanismus Rhinovirus-induzierter Änderungen der Atemwegsepithelfunktion	134
5.5.1. Auswirkungen von Immunstimulation auf die Funktion des Atemwegsepithels ...	134
5.5.2. Oxidativer Stress in HRV-infizierten primären bronchialen Epithelzellen unter Einfluss von IFN β	137
5.6. Fazit und Ausblick.....	139
6. Literaturverzeichnis	143
7. Anhang.....	158
7.1. Ergänzende Ergebnisse	158
7.2. Lebenslauf	162
7.3. Veröffentlichungen	163
7.4. Verzeichnis akademischer Lehrer	164
7.5. Danksagung	165
7.6. Ehrenwörtliche Erklärung.....	167

I. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	FKS	Fetales Kälberserum
µg	Mikrogramm (10 ⁻⁹ Kilogramm)	FOXJ1	<i>Forkhead Box J1</i>
µL	Mikroliter (10 ⁻⁶ Liter)	FSC	<i>Forward Scatter</i>
µM	Mikromolar (10 ⁻⁶ Molar)	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
µm	Mikrometer (10 ⁻⁶ Meter)	GUK	Guanylatkinase
ALI	<i>Air-Liquid Interface</i>	h	Stunde/n
APC	Allophycocyanin	HE	Hämatoxylin/Eosin
ASL	<i>Airway Surface Liquid</i>	HMW	<i>High Molecular Weight</i>
Å	Ångström (10 ⁻¹⁰ Meter)	HRP	Meerrettichperoxidase
AMP	Antimikrobielles Peptid	HRV	Humanes Rhinovirus
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>	Hz	Herz
BPE	<i>Bovine Pituitary Extract</i>	ICAM	<i>Intracellular Cell Adhesion Molecule</i>
CBA	<i>Cytometric Bead Arrays</i>	IFITM	<i>Interferon-Induced Transmembrane Protein</i>
CCCL	CC-Chemokin-Ligand	IFN	Interferon
CDHR	<i>Cadherin-Related Family Member</i>	IFNAR	IFN Rezeptor α
cDNA	Komplementäre DNA	IFNGR	IFN γ Rezeptor
CF	Zystische Fibrose	IFNLR	IFN λ Rezeptor
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>	Ig	Immunoglobulin
cm	Zentimeter (10 ⁻² Meter)	IL	Interleukin
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung	IL-10Rβ	IL-10 Rezeptor β
CPE	<i>Cytopathic Effect</i>	ILC	<i>Innate Lymphoid Cell</i>
CFU	<i>Colony Forming Units</i>	IP	<i>Interferon γ-Induced Protein</i>
CT	<i>Cycle Threshold</i>	ISG	Interferon-stimuliertes Gen
CXCL	<i>C-X-C Motif Chemokine</i>	ISGF3	IFN-stimulierten Gen Faktor 3
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	ISRE	<i>IFN-Stimulated Response Element</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>	IRF	Interferon-regulierender Faktor
DMSO	Dimethylsulfoxid	JAK	Janus Kinase
DNA	Deoxyribonucleic Acid	JAMs	<i>Junctional Adhesion Molecules</i>
DR	<i>Death Receptor</i>	KLSM	Konfokales Laserscanning Mikroskop
dsRNA	Doppelsträngige RNA	KSFM	<i>Keratinocyte Serum-free Medium</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix	LDH	Lactatdehydrogenase
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>	LDL	<i>Low-Density Lipoprotein Receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>	LLoQ	<i>Lower Limit of Quantification</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	LPS	Lipopolysaccharide
LTA	Lipoteichonsäure	RIG-I	<i>Retinoic Acid-Inducible Gene I</i>
M	Molar	RLR	<i>RIG-I-like</i> Rezeptor
MAGUK	Membran-assoziierte Guanylat Kinase	RLU	<i>Relative Light Units</i>

MAVS	<i>Mitochondrial Antiviral-Signaling Protein</i>	RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
MDA-5	<i>Melanoma Differentiation-Associated Protein 5</i>	RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i>
mg	Milligramm (10^{-3} Gramm)	ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
min	Minute/n	RPMI	<i>RosWell Park Memorial Institute 1640 Medium</i>
mL	Milliliter (10^{-3} Liter)	RSAD2	<i>Radical S-adenosyl Methionine Domain Containing 2</i>
mm	Millimeter (10^{-3} Meter)	RSV	<i>Respiratorischen Synzytial-Virus</i>
mM	Millimolar (10^{-3} Molar)	RT	Raumtemperatur
MOI	Multiplizität der Infektion	RV	Rhinovirus
Mx	<i>Myxovirus Resistance Protein</i>	SBTI	<i>Soybean Trypsin Inhibitor</i>
MyD	<i>Myeloid Differentiation Factor</i>	SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfate
NA	Neuraminidase	SCG	Secretoglobin
NCOA7	<i>Human Nuclear Receptor Coactivator 7</i>	SH3	<i>SRC Homology 3</i>
NET	<i>Neutrophil Extracellular Trap</i>	SOCS	<i>Suppressor of Cytokine Signaling</i>
NF- κ B	<i>Nuclear Factor –Kappa B</i>	SSC	<i>Side Scatter</i>
ng	Nanogramm (10^{-9} Gramm)	TAMPs	<i>Tight Junction-assozierte Marvel Proteine</i>
NK	Natürliche Killer-Zellen	TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
NO	Stickstoffmonoxid	TC	<i>Tissue Culture</i>
OASL	<i>Oligoadenylatsynthetase like</i>	TCID50	<i>Tissue Culture Infection Dose 50</i>
OD	Optische Dichte	TEER	<i>Transepithelial Electrical Resistance</i>
PAF	<i>Platelet-Activating Factor</i>	TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
PAMP	<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>	TIR	<i>Toll/Interleukin-1 receptor</i>
pBECs	<i>Primary Bronchial Epithelial Cells</i>	TLR	<i>Toll-like Rezeptor</i>
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i>	TMB	<i>3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin</i>
PE	Phycoerythrin	TNF	Tumor Nekrose Faktor
PE-Cy7	Peridinin-Cy7	TRAIL	TNF-verwandter Apoptose-induzierender Ligand
PFA	Paraformaldehyd	TRIF	TIR domain-containing adaptor inducing IFN β
PCL	<i>Periciliary Liquid</i>	U	<i>Unique</i>
PLUNC	<i>Palate, Lung and Nasal Epithelium Clone</i>	vs	Versus
qPCR	<i>Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction</i>	v/v	Volumen pro Volumen
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>	ZO	Zonula occludens
P/S	Penicillin/Streptomycin		

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Schaubild des Atemwegsepithels	6
Abbildung 2.2: Zell-Zell-Kontakte des Atemwegsepithels	9
Abbildung 2.3: Schema der PRR-aktvierten Signalwege des angeborenen Immunsystems.....	13
Abbildung 2.4: Schema des Interferon Typ I und Typ III-Signalwegs	18
Abbildung 3.1: Differenzierungsprozess primärer bronchialer Epithelzellen in <i>Air-Liquid Interface</i> -Kultur	41
Abbildung 3.2: Vektorkarte pGL4.45[luc2P/ISRE/Hygro]	50
Abbildung 3.3: Beispiel für die Quantifizierung der bakteriellen Translokation in die Zellschicht	59
Abbildung 3.4: <i>Gating</i> Beispiel für die Messung am Durchflusszytometer	65
Abbildung 3.5: Methoden und Schema des Ablaufs der Versuche zur Untersuchung des Effekts einer IFN β 1a-Behandlung auf die Barrierefunktion von pBECs in ALI-Kultur während einer HRV-Infektion.....	66
Abbildung 3.6: Methoden und Schema des Ablaufs der Versuche zur Untersuchung des Effekts einer IFN β 1a-Behandlung in pBECs in ALI-Kultur während einer viral-bakteriellen Ko-Infektion.....	66
Abbildung 3.7: Methoden und Schema des Ablaufs der Versuche zur Untersuchung von oxidativem Stress in pBECs in ALI-Kultur während einer IFN β 1a-Stimulation und HRV-Infektion	67
Abbildung 4.1: Vergleich der Luciferase-Aktivität ausgelöst durch unterschiedliche IFN-Subtypen in der Reporterzelllinie A549-pGL4.45	69
Abbildung 4.2: ISG-Expression nach IFN-Stimulation in A549-Zellen	70
Abbildung 4.3: Metabolische Aktivität der A549-Zellen nach Stimulation mit unterschiedlichen IFN-Konzentrationen	71
Abbildung 4.4: Viruslast in A549-Zellen nach IFN β -Stimulation	73
Abbildung 4.5: MTT nach 1 und 100 ng/mL IFN β -Stimulation in A549-Zellen.....	74
Abbildung 4.6: Charakterisierung primärer bronchialer Epithelzellen in Ali-Kultur	77
Abbildung 4.7: Viruslast von differenzierten pBECs in ALI-Kultur nach IFN β 1a-Stimulation und HRV16-Infektion für 24 h - 72 h.....	79
Abbildung 4.8: mRNA-Expression von OASL in differenzierten pBECs in ALI-Kultur nach IFN β 1a-Stimulation und HRV16-Infektion.....	80
Abbildung 4.9: Zellviabilität von differenzierten pBECs in ALI-Kultur nach IFN β 1a-Stimulation und HRV16-Infektion	82
Abbildung 4.10: Zytokinkonzentrationen in basalen Medien von differenzierten pBECs in ALI-Kultur nach IFN β 1a-Stimulation und HRV16-Infektion	85
Abbildung 4.11: Dissoziierte <i>Tight Junctions</i> nach 48-stündiger HRV16-Infektion.....	87
Abbildung 4.12: Effekt von IFN β 1a-Stimulation und HRV16-Infektion auf ZO-1 nach 24 - 72 h	89

Abbildung 4.13: Quantifizierung der ZO-1-gefärbten <i>Tight Junction</i> -Fläche nach IFN β 1a-Stimulation und HRV16-Infektion.....	90
Abbildung 4.14: mRNA-Expression von <i>Tight</i> und <i>Adherence Junction</i> Proteinen nach IFN β 1a-Stimulation und HRV16-Infektion von differenzierten pBECs in ALI-Kultur	92
Abbildung 4.15: Effekt von IFN β 1a-Stimulation und 24 h – 72 h HRV16-Infektion auf die Zilien der differenzierten pBECs in ALI-Kultur.....	94
Abbildung 4.16: mRNA-Expression der Marker (FOXJ1, SNTN und SCGB3A1) für Zilien-tragende Zellen und Clubzellen in differenzierten pBECs in ALI-Kultur nach IFN β 1a-Stimulation und HRV16-Infektion.....	96
Abbildung 4.17: Messung des transepithelialen Widerstands von differenzierten pBECs in ALI-Kultur nach IFN β 1a-Stimulation und HRV16-Infektion	98
Abbildung 4.18: Messung der Permeabilität der epithelialen Barriere von differenzierten pBECs in ALI-Kultur nach IFN β 1a-Stimulation und HRV16-Infektion	99
Abbildung 4.19: Orthogonale Ansicht der Zellschicht von differenzierten pBECs in ALI-Kultur nach einer 8-stündigen <i>S. pneumoniae</i> -Infektion	101
Abbildung 4.20: Viruspartikel in differenzierten pBECs in ALI-Kultur nach IFN β 1a-Stimulation und HRV16-Infektion vor der Ko-Infektion mit <i>S. pneumoniae</i>	102
Abbildung 4.21: Messung des transepithelialen Widerstands von differenzierten pBECs in ALI-Kultur nach IFN β 1a-Stimulation und Ko-Infektion mit HRV16 und <i>S. pneumoniae</i>	103
Abbildung 4.22: Orthogonale Ansicht der epithelialen Barriere der pBECs in ALI-Kultur nach IFN β 1a-Stimulation und Ko-Infektion mit <i>S. pneumoniae</i> und HRV16.....	105
Abbildung 4.23: Quantifizierung der zurückgelegten Strecke von <i>S. pneumoniae</i> in die epitheliale Barriere der differenzierten pBECs in ALI-Kultur nach Ko-Infektion mit HRV16 und IFN β 1a-Stimulation	106
Abbildung 4.25: Poly(I:C)-Stimulation zeigt keinen Effekt auf die Barrierefunktion von differenzierten pBECs in ALI-Kultur	109
Abbildung 4.26: Poly(I:C)-Stimulation zeigt keinen Effekt auf die mRNA-Expression von <i>Tight</i> und <i>Adherence Junctions</i> -Proteinen der differenzierten pBECs in ALI-Kultur.	110
Abbildung 4.27: Viruspartikel in differenzierten pBECs in ALI-Kultur nach IFN β 1a-Stimulation und HRV16-Infektion für 2 h - 12 h.....	112
Abbildung 4.28: Messung des transepithelialen Widerstands von differenzierten pBECs in ALI-Kultur nach IFN β 1a-Stimulation und 2 h - 12 h HRV16-Infektion	113
Abbildung 4.29: CellROX™-behandelte pBECs in ALI-Kultur mit IFN β 1a-Stimulation und 2 h HRV16-Infektion	114
Abbildung 5.1: Graphische Zusammenfassung des Effekts einer IFN β 1a-Vorbehandlung von pBECs in ALI-Kultur während einer HRV16-Infektion.....	140
Abbildung 7.1: Beispiel für die Charakterisierung von pBECs eines Spenders nach der Zellisolation	158
Abbildung 7.2: Beispiel einer Färbung der differenzierten pBECs in ALI-Kultur mit ZO-1, p63 und DAPI	158

Abbildung 7.3: Messung des transepithelialen Widerstand in differenzierten pBECs in ALI-Kultur nach IFN β 1a-Stimulation HRV16-Infektion vor Infektion mit *S. pneumoniae* 159

Abbildung 7.4: Poly(I:C)-Stimulation aktiviert die Immunantwort der differenzierten pBECs in ALI-Kultur 160

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Verwendete Organismen.....	27
Tabelle 3.2: Spender der primären bronchialen Epithelzellen.....	27
Tabelle 3.3: Verwendete Chemikalien, Enzyme, Medien, Puffer, Reagenzien	28
Tabelle 3.4: Verwendete molekularbiologische Kits.....	30
Tabelle 3.5: Verwendete PCR-Assays	31
Tabelle 3.6: Verwendete Geräte	32
Tabelle 3.7: Verwendete Software.....	34
Tabelle 3.8: Verwendete Verbrauchsmaterialien	34
Tabelle 3.9: Ablauf des qPCR-Programms unter Verwendung des SsoAdvanced Universal Probes Supermix.....	49
Tabelle 3.10: Übersicht über primäre und sekundäre Antikörper für die Färbung zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung.....	56
Tabelle 3.11: Übersicht über die angeregten Fluorophore während der Fluoreszenzmikroskopie	57
Tabelle 3.12: Einbettungsschema der Proben zur Elektronenmikroskopie	60
Tabelle 3.13: Ansätze Epon A/B/C.....	61
Tabelle 7.1: Auswertung der CellROX™-gefärbten pBECs in ALI-Kultur mit IFN β 1a-Stimulation und HRV16-Infektion	161

1. Zusammenfassung und Summary

1.1. Zusammenfassung

Infektionen mit humanen Rhinoviren (HRV) sind ganzjährig, besonders ausgeprägt im September, detektierbar, die häufigste Ursache von Infektionen der oberen Atemwege und können bei Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen deutliche Verschlimmerung der Symptome, sogenannte Exazerbationen, auslösen. Auch die Barrierefunktion des Atemwegsepithels kann durch eine Infektion mit HRV und anderen respiratorischen Viren beeinträchtigt werden, wodurch sich das Risiko einer sekundären bakteriellen Infektion erhöhen kann. Bisher existieren gegen die meisten respiratorischen Viren noch keine Therapeutika oder Impfprophylaxen, so auch nicht gegen Infektionen mit HRV. Ein Ansatzpunkt für eine mögliche Therapie könnte das breite antivirale Wirkungsspektrum der Interferone (IFNe) Typ I und Typ III sein. *In vitro* zeigen diese IFNe protektive Effekte gegen virale Infektionen. Für einen zukünftigen IFN-Behandlungsansatz ist es nötig, diese Effekte von IFN während einer viralen Infektion genauestens zu untersuchen. Bis dato wurde nicht gezeigt, ob eine Vorbehandlung mit IFN Typ I viral-induzierte Beeinträchtigungen der Barrierefunktion des Atemwegsepithels beeinflusst. Aus diesem Grund war das primäre Ziel dieser Arbeit die Untersuchung des Effekts einer IFN β 1a-Vorbehandlung auf die Barrierefunktion während einer HRV16-Infektion. Hierzu wurden primäre bronchiale Epithelzellen (*Primary Bronchial Epithelial Cells*; pBECs) in *Air-Liquid Interface* (ALI)-Kultur als Modell gewählt und zu einem differenzierten, pseudostratifizierten Flimmerepithel kultiviert. Die differenzierten Zellen wurden mit IFN β 1a vorbehandelt und anschließend für 24 h bis 72 h mit HRV16 infiziert. In den unbehandelten, HRV16-infizierten Zellen wurde nach 24 h viraler Infektion eine Abnahme der Barrierefunktion gezeigt, gekennzeichnet durch eine Abnahme des transepithelialen Widerstands und eine Zunahme der Permeabilität. Nach 48 h und 72 h regenerierten sich diese Parameter wieder, allerdings lag zu diesen Zeitpunkten das *Tight Junction*-Netz dissoziiert vor. In den IFN β 1a-vorbehandelten Zellen konnte eine verringerte Viruslast, sowie eine Verhinderung des HRV16-induzierten Effekts auf die *Tight Junction*-Netze, die Barrierefunktion und die Zellviabilität beobachtet werden. Somit konnte ein protektiver Effekt einer IFN β 1a-Vorbehandlung nicht nur in Bezug auf Viruslast, sondern auch auf die Barrierefunktion der Epithelzellen nachgewiesen werden. Infektionen mit HRV16 induzierten eine über die Zeit zunehmende Beeinträchtigung der Zilien. Diese lagen nach viraler Infektion verkürzt vor oder fehlten teilweise ganz. Dies kann die mukoziliäre *Clearance* reduzieren, wodurch weniger Pathogene mechanisch von der Barriere entfernt werden können. Somit könnte das Eindringen von Bakterien während einer viral-bakteriellen Ko-Infektion zusätzlich erleichtert sein. Auch hier hatte IFN β 1a einen schützenden

Effekt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass während einer viral-bakteriellen Ko-Infektion eine IFN β 1a-Vorbehandlung die Translokation von *Streptococcus pneumoniae* in die Zellschicht der differenzierten pBECs zu reduzieren vermochte.

Der Mechanismus, der zu einer HRV-induzierten Beeinträchtigung der Barrierefunktion des Atemwegsepithels führt, ist bis dato unbekannt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation mit dem Immunstimulans Poly(I:C) keinen Effekt auf die Funktion der Barriere der pBECs in ALI-Kultur hatte. Diese Beobachtung legt nahe, dass wahrscheinlich die virale Replikation für die HRV-induzierte Beeinträchtigung des Atemwegsepithels verantwortlich ist.

Insgesamt zeigen die Daten dieser Arbeit erstmals, dass eine IFN β 1a-Vorbehandlung einen protektiven Effekt auf die Barrierefunktion differenzierter primärer bronchialer Epithelzellen während einer HRV16-Infektion hat und zusätzlich die bakterielle Invasion während einer viral-bakteriellen Ko-Infektion reduziert wird.

1.2. Summary

Human rhinovirus (HRV)-infections can be detected all year-round, particularly in September and are the most common cause of upper respiratory tract infections. In patients with chronic lung diseases, HRV-infections can trigger a significant worsening of symptoms, called exacerbations. Additionally, the barrier function of the airway epithelium can be impaired due to an infection with HRV and other respiratory viruses, which also increase the risk of bacterial co-infection. Currently, direct antiviral therapies and effective vaccinations are lacking against many respiratory viruses, including HRV. A possible approach for the development of new therapeutics could be the broad antiviral effect of interferons (IFNs) type I and type III. *In vitro* studies have shown that IFNs type I and III efficiently protect against viral infections. However, a deeper understanding of the protective effect of IFN during viral infections is required for a potential therapeutic application of these IFNs for respiratory infections. To date, it has not been shown if an IFN-pretreatment influences the virus-induced impairment of the barrier function of the airway epithelium. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of an IFN β 1a pretreatment on the barrier function during HRV-infection. To this end, primary bronchial epithelial cells (pBECs) were used as model system and differentiated in air-liquid interface (ALI)-culture to form a pseudostratified epithelium. The cells were pretreated with IFN β 1a and subsequently infected with HRV16 for 24 h to 72 h. The barrier function of untreated, HRV16-infected cells was decreased after 24 h, shown by decreased transepithelial resistance and increased permeability. After 48 h and 72 h the barrier function recovered but the tight junction-net was dissociated. IFN β 1a-pretreated cells showed less HRV copy numbers, and neither a dissociation of tight junctions, nor decreased barrier function or cytotoxicity. Concluding, pretreatment with IFN β 1a induced a protective effect not only on viral load but also on the barrier function. Additionally, an infection with HRV16 affected cilia, which were shortened or missing completely after viral infection. This effect aggravated over time, potentially reducing mucociliary clearance and therefore, the removal of pathogens, which in turn can facilitate bacterial penetration into the cell layer. However, pretreatment with IFN β 1a also had protective effects regarding bacterial invasion. It could be shown that the translocation of *Streptococcus pneumoniae* into the cell layer of differentiated and IFN β 1a-pretreated cells during an ongoing viral-bacterial co-infection was reduced.

The mechanism by which HRV infections disrupt the airway epithelial barrier function is still unknown. Using the viral mimetic poly(I:C), we found no effect on the barrier function in differentiated ALI cultures. This result suggests that not the activation of antiviral signaling, but rather viral replication itself is causing the HRV-induced impairment of the airway epithelium.

Taken together, this study shows the protective effect of IFN β 1a pretreatment in differentiated

primary bronchial epithelial cells during an infection with HRV16 and, additionally, the potential of IFN β 1a to reduce bacterial invasion during viral-bacterial co-infection.

2. Einleitung

2.1. Abwehrmechanismen des humanen Atemwegsepithels

Jeder Mensch atmet pro Tag durchschnittlich 10.000 bis 20.000 Liter Luft ein und aus (Crapo, 2003; Das & Thakur, 2015). Dabei liegt die Atemfrequenz gewöhnlich bei 12 bis 20 Atemzügen pro Minute (Warliah, Rohman, & Rusmin, 2012; Yuan, Drost, & McIvor, 2013). Mit jedem Atemzug wird nicht nur frische Atemluft aufgenommen, auch Substanzen und Schadstoffe, wie zum Beispiel Allergene und Pathogene, können so in die Lunge gelangen. Eine Studie der Luftgetragenen Mikrobiota in tropischen Regionen zeigte beispielsweise, dass die Lunge im Durchschnitt täglich mit 100.000 bis 1 Millionen Mikroorganismen in Kontakt kommt (Gusareva *et al.*, 2019).

Um zu verhindern, dass es zu Infektionen kommt, verfügt das angeborene Immunsystem über mehrere Strategien und Abwehrmechanismen, welche direkt nach Eintritt eines Pathogens oder wenige Stunden danach aktiv werden. Zu diesen Mechanismen zählen unter anderem mechanische Barrieren, die Erkennung konservierter, Pathogen-typischer Strukturen und molekulare Abwehrmechanismen. Anders als das adaptive Immunsystem, besitzt das angeborene Immunsystem allerdings kein immunologisches ‚Gedächtnis‘, es unterscheidet zwischen ‚eigen‘ und ‚fremd‘ (Bals & Hiemstra, 2004).

2.1.1. Mechanische Abwehr

In der Lunge wirkt das Atemwegsepithel, das die gesamte Lungenoberfläche auskleidet, als physische Barriere zwischen der Umwelt und dem Körperinneren und somit als unspezifischer, mechanischer Schutz gegen Pathogene (siehe Abbildung 2.1). Dabei besteht das pseudostratifizierte Atemwegsepithel aus unterschiedlichen Zelltypen, welche durch Zell-Zell-Kontakte miteinander verbunden sind und in basale, Zilien-tragende und sekretorische Zellen eingeteilt werden können (Knight & Holgate, 2003). Basale Zellen sind auf der basalen Membran lokalisiert und ragen nicht ins Lumen der Atemwege. Sie sind selbsterneuernd und in der Lage das Epithel nach einer Schädigung wieder zu regenerieren (Boers, Ambergen, & Thunnissen, 1998). Sie fungieren als Vorläuferzellen, aus denen sich Zilien-tragende und sekretorische Zellen des Epithels differenzieren können (Boers *et al.*, 1998; Rock *et al.*, 2009).

Die zweite Zellgruppe der epithelialen Barriere besteht aus den Zilien-tragenden Zellen, den am häufigsten im Atemwegsepithel vorkommenden Zellen. Diese Zellen, die bis zur apikalen Seite des Epithels reichen, tragen am apikalen Zellpol bis zu 300 Flimmerhärchen (Zilien) (Knight & Holgate, 2003). Die Zilien bewegen sich unter hohem Energieaufwand koordiniert mit einer

Frequenz von circa 10 - 14 Hz. Diese koordinierte Bewegung der Zilien ist als sogenannter Zilienschlag bekannt (Rutland, Griffin, & Cole, 1982; Wanner, Salathé, & O'Riordan, 1996).

Für die Ziliogenese, die Entwicklung und Differenzierung der Zilien, werden unterschiedliche Transkriptionsfaktoren benötigt, unter anderem FOXJ1 (*Forkhead Box J1*) (Thomas *et al.*, 2010) oder SNTN (Sentan) (Kubo, Yuba-Kubo, Tsukita, & Amagai, 2008). Sekretorische Zellen reichen ebenfalls bis zur apikalen Seite des Epithels. Club- und Becherzellen sind die verbreitetsten Subtypen der sekretorischen Zellen. Becherzellen kommen häufig in den größeren Atemwegen vor und sind in der Lage Mukus zu sezernieren. Dieser besteht aus hydratisierten, Gel-bildenden Muzinen und enthält protektive Moleküle (Loxham & Davies, 2017; Swindle, Collins, & Davies, 2009). Die am häufigsten in humanen Atemwegen vorkommenden Gel-bildenden Muzine sind Muzin 5AC, das in Becherzellen, sowie Muzin 5B, das in submukösen Drüsen produziert wird (Lillehoj, Kato, Lu, & Kim, 2013). Die so entstehende Mukus-Schicht bildet eine physikalisch-chemische Barriere, die das unterliegende Epithel ummantelt und schützt, indem sie Pathogene und Schadstoffe immobilisiert (Kesimer *et al.*, 2013). Mit Hilfe der mukoziliären Clearance werden diese Pathogene später aus der Lunge entfernt. Clubzellen sind hauptsächlich in den Bronchiolen als sekretorische Zellen vertreten und produzieren unter anderem Sekretoglobine (SCGe), wie etwa SCGB3A1. Diese SCGe haben eine potentiell anti-inflammatorische und immunregulatorische Rolle (Mootz, Jakwerth, Schmidt-Weber, & Zissler, 2022).

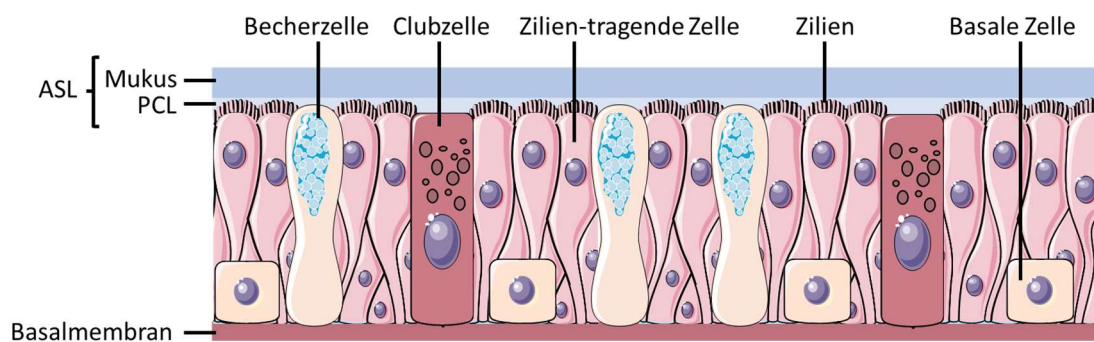


Abbildung 2.1: Schaubild des Atemwegsepithels

Schaubild des Atemwegsepithels der Lunge mit unterschiedlichen Zelltypen. ASL = *Airway Surface liquid* (Atemwegsoberflächenflüssigkeit); PCL = *Periciliary Liquid* (periziliäre Flüssigkeit).

Schaubild erstellt mit Smart Servier Medical Art, bereitgestellt von Servier, lizenziert unter einer *Creative Commons Attribution 3.0 Unported License* (smart.Servier.com).

2.1.1.1. Mukoziliäre Clearance

Durch das Zusammenspiel der verschiedenen Zelltypen kommt es zur mukoziliären Clearance, der Selbstreinigung der Bronchien, beziehungsweise dem Abtransport von Schadstoffen aus der Lunge (Knowles & Boucher, 2002). Die bis zur apikalen Seite ragenden Zellen des Epithels treten allerdings nicht direkt mit der Luft der Atemwege in Kontakt. Auf der Epithelzellschicht befindet sich die Atemwegsoberflächenflüssigkeit (*Airway Surface Liquid*; ASL; siehe Abbildung 2.1), bestehend aus zwei Flüssigkeitsschichten mit unterschiedlicher Viskosität (Widdicombe & Widdicombe, 1995). Die weniger visköse und dünnflüssigere Schicht wird als periziliäre Flüssigkeit (*Periciliary Liquid*; PCL) bezeichnet und stellt den Bewegungsraum der Zilien dar. Diese Schicht ist circa 6 - 7 µm hoch und damit minimal kürzer als die Zilien der Epithelzellen. Somit erreichen die Enden der Zilien noch die darüber liegende Schicht, um einen Abtransport durch die Zilienbewegung zu ermöglichen (Leopold *et al.*, 2009; Tarran, Grubb, Gatzky, Davis, & Boucher, 2001; Widdicombe & Widdicombe, 1995). Die Flüssigkeitsschicht, die über der PCL schwimmt, wird als Mukus bezeichnet. Sie besitzt eine hohe Viskosität und enthält Muzine. Der gelartige Mukus umschließt eingedrungene Pathogene oder Schadstoffe und dient als Transportmedium. Zusätzlich wirkt diese Schicht durch das Enthalten von löslichen Komponenten des angeborenen Immunsystems, wie Proteinen und antimikrobiellen Peptiden (AMPs), selbst antimikrobiell. So tragen Proteine des Komplementsystems, Immunoglobuline, Clubzell-Proteine, Surfactantproteine und Proteine der PLUNC Familie (*Palate, Lung and Nasal Epithelium Cone*) zusammen mit AMPs, wie Lactoferrin, Lysozym, Defensinen und sekretorischer Phospholipase A zur Abwehr von Schadstoffen und Pathogenen bei (Jacquot, Hayem, & Galabert, 1992; Lillehoj *et al.*, 2013; Swindle *et al.*, 2009).

Mit Hilfe der koordinierten Bewegung der Zilien können diese Pathogene und Schadstoffe in Richtung Larynx abtransportiert werden. Dabei wird eine Beförderungsgeschwindigkeit von bis zu 4 - 20 mm pro Minute erreicht. Anschließend werden die Muzin-umschlossenen Pathogene und Schadstoffe beispielsweise durch Abhusten ausgeschieden (Bustamante-Marin & Ostrowski, 2017; Button *et al.*, 2012; Knowles & Boucher, 2002; Wanner *et al.*, 1996).

2.1.1.2. Zell-Zell-Verbindungen

Durch die Polarisierung der Epithelzellen unterscheiden sich der apikale und basale Pol der Zellen in ihren Funktionalitäten. Zell-Zell-Kontakte zwischen den Epithelzellen sind essenzielle Bestandteile zur Bildung der physikalischen Barriere des Atemwegsepithels und helfen diese Polarisierung aufrecht zu erhalten. Zu diesen Kontakten zählen *Gap Junctions*, *Desmosome*, *Adherence Junctions* und *Tight Junctions*. (Loxham & Davies, 2017; Rodriguez-Boulan & Macara, 2014).

2.1.1.2.1. *Gap Junctions*, *Desmosome*, und *Adherence Junctions*

Gap Junctions verbinden die Cytoplasmen zweier benachbarter Zellen über *Gap Junction*-Kanäle miteinander und ermöglichen so eine direkte Zell-Zell-Kommunikation. Diese Kanäle werden durch Connexine gebildet, die dafür sorgen, dass Ionen und Botenstoffe zwischen den verbundenen Zellen ausgetauscht werden können (Kwak, Pepper, Gros, & Meda, 2001; Loxham & Davies, 2017).

Über die Verknüpfung von Intermediärfilamenten sorgen *Desmosome* für Verankerung im Zytoskelett und damit für eine starke interzelluläre Zell-Adhäsion (Thomason, Scothern, McHarg, & Garrod, 2010).

Zusammen mit anderen Zell-Zell-Kontakten sind die *Adherence Junctions* für den Zusammenhalt und damit die Integrität der Zellschicht verantwortlich (Loxham & Davies, 2017). Durch die Assoziation mit dem Aktin-Zytoskelett bilden und stabilisieren *Adherence Junctions* die interzellulären Kontakte und sind dadurch an der Aufrechterhaltung sowie der Entwicklung der zellulären Barriere beteiligt (Baum & Georgiou, 2011; Hartsock & Nelson, 2008; Irie, Shimizu, Sakisaka, Ikeda, & Takai, 2004). Der Cadherin-Catenin-Komplex ist das zentrale Element der *Adherence Junctions* und trägt zur mechanischen Kopplung zwischen den Zellen bei, indem er benachbarte Zellen über das Aktin-Myosin-Zytoskelett miteinander verbindet. Zusätzlich zu seinen fixierenden Eigenschaften beeinflusst E-Cadherin durch physikalische Interaktion die Signalfähigkeit mehrerer Rezeptortyrosinkinasen (Andl & Rustgi, 2005; Loxham & Davies, 2017; Nelson, 2008). Während *Adherence Junctions* Zell-Zell-Kontakte initiieren und aufrechterhalten, sorgen die *Tight Junctions*, die sich in der epithelialen Barriere deutlich über den *Adherence Junctions* befinden, für die Regulierung des parazellulären Transports (Hartsock & Nelson, 2008; Rezaee & Georas, 2014) (siehe Abbildung 2.2).

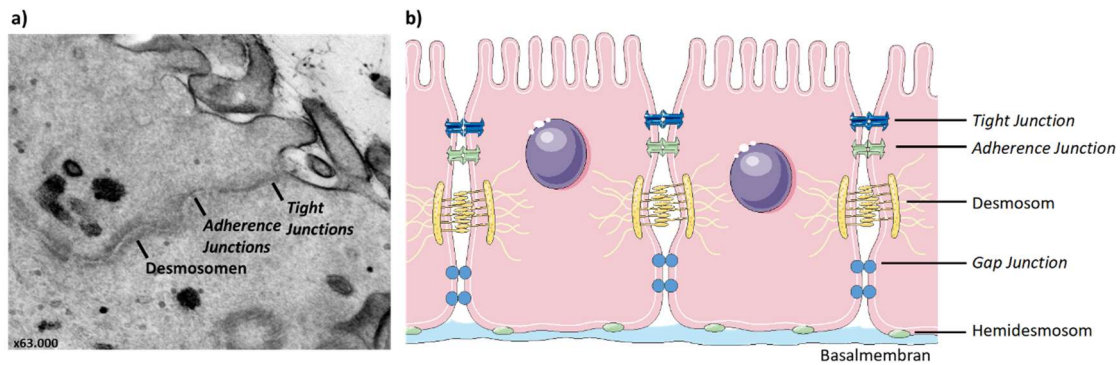


Abbildung 2.2: Zell-Zell-Kontakte des Atemwegsepithels

a) Elektronenmikroskopische Aufnahme der epithelialen Zell-Zell-Kontakte differenzierter primärer bronchialer Epithelzellen, 63.000fache Vergrößerung, aufgenommen im Institut für Anatomie und Zellbiologie der Philipps-Universität Marburg; b) Schematische Darstellung der Zell-Zell-Kontakte in Epithelzellen. Schaubild erstellt mit Smart Servier Medical Art, bereitgestellt von Servier, lizenziert unter einer *Creative Commons Attribution 3.0 Unported License* (smart.Servier.com).

2.1.1.2.2. *Tight Junctions*

Tight Junctions spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Polarisierung des epithelialen Atemwegsepithels. Lokalisiert sind die *Tight Junctions* an der apikal-lateralen Grenze der Epithelzellen. Sie umspannen die Zellen ringförmig und grenzen damit die apikale von der basalen Seite der Zelle ab (Cao, Surma, & Simons, 2012; Zihni, Mills, Matter, & Balda, 2016). Ihre Hauptaufgabe besteht darin, den parazellulären Weg zwischen benachbarten Zellen abzudichten, den selektiven Durchfluss von Ionen und gelösten Stoffen durch den parazellulären Raum zu regulieren und die parazelluläre Migration von Krankheitserregern zu verhindern (Hartsock & Nelson, 2008; Schneeberger & Lynch, 2004; Schulzke & Fromm, 2009). Dabei sind die Zell-Zell-Verbindungen in der Lage den bidirektionalen Transport von Molekülen zu kontrollieren und sie, größen- oder ionenspezifisch, zu selektieren. Innerhalb dieses kontrollierten Transports wird zwischen der Passage größerer Moleküle (*Leak Pathway*, Moleküle $>4 \text{ \AA}$) und kleinerer Moleküle (*Pore Pathway*, Moleküle $<4 \text{ \AA}$) unterschieden (Lingaraju, Long, Wang, Austin, & Turner, 2015; Shen, Weber, Raleigh, Yu, & Turner, 2011).

Tight Junctions sind Multiprotein-Verbindungskomplexe, die aus circa 40 Transmembranproteinen und assoziierten zyttoplasmatischen Plaqueproteinen aufgebaut sind. Zu den Transmembranproteinen zählen Proteine aus der Familie der Claudine, der *Junctional Adhesion Molecules* (JAMs) sowie unter anderem Occludin und Tricellulin, welche als *Tight Junction*-assoziierte Marvel Proteine (TAMPs) zusammengefasst werden (Georas & Rezaee, 2014; Martin-Padura *et al.*, 1998; Raleigh *et al.*, 2010).

Membran-assoziierte Guanylatkinase (MAGUK)-Proteine, zu welchen auch *Zonula occludens* (ZO)-1, 2 und 3 zählen, gehören zu der Gruppe der Plaqueproteine (González-Mariscal, Betanzos, & Avila-Flores, 2000). MAGUK-Proteine sind Gerüstproteine, bestehend aus drei N-terminalen PDZ-Domänen (abgeleitet von synaptisches Protein *PSD95/SAP90*, *Septate Junction Protein* *Discs-large*, *ZO-1*), einer *SRC Homology 3* (SH3) -Domäne und einer Guanylatkinase (GUK)-Domäne. Diese Proteine erzeugen multimolekulare Komplexe, beispielsweise an der zytoplasmatischen Oberfläche, und halten diese aufrecht (Bauer, Zweimueller-Mayer, Steinbacher, Lametschwandtner, & Bauer, 2010; Schneeberger & Lynch, 2004).

2.1.1.2.2.1. Claudin

Eine Hauptkomponente der *Tight Junctions* sind Claudine, die für deren Strukturierung und Funktion ausschlaggebend sind (Günzel & Yu, 2013; Mineta *et al.*, 2011). Je nach Gewebe werden unterschiedliche Claudine exprimiert (Morita, Furuse, Fujimoto, & Tsukita, 1999). So sind in der Lunge unter anderem Claudin-1, -3, -4, -5, -7, -8, -10 und -18.1 vertreten (Coyne, Gambling, Boucher, Carson, & Johnson, 2003; Günzel & Yu, 2013; Koval, 2013a; Schlingmann, Molina, & Koval, 2015). Je nach Zelltyp werden Claudine unterschiedlich exprimiert. Die Expression von Claudin-10 beschränkt sich beispielsweise auf Club-Zellen (Zemke *et al.*, 2009). Im alveolaren Epithelium ist dagegen die Expression von Claudin-3, -4 und -7 und in den bronchialen Epithelzellen Claudin-1, -3, -4 und -7 stark ausgeprägt (Kaarteenaho-Wiik & Soini, 2009). Aktuell sind 27 unterschiedliche Claudine bekannt, die innerhalb der *Tight Junctions* mit anderen Claudinen interagieren können (Mineta *et al.*, 2011). Dabei kann zwischen homophiler Interaktion (zwischen gleichen Claudinen) und heterophiler Interaktion (zwischen unterschiedlichen Claudinen) unterschieden werden. Zusätzlich können diese Interaktionen als *cis*-Interaktion (zwischen Claudinen entlang der Plasmamembran derselben Zelle) oder *trans*-Interaktion (zwischen Claudinen von benachbarten Zellen) charakterisiert werden (Koval, 2013b; Krause, Protze, & Piontek, 2015; Krause *et al.*, 2008). Auch Interaktionen mit anderen Membranproteinen, wie etwa den Proteinen der Familie der TAMPs oder ZO-Proteinen, sind möglich (Cording *et al.*, 2013; Koval, 2013b).

Claudine können ebenfalls hinsichtlich ihrer Funktion unterteilt werden. So unterscheiden sich Barriere-bildende, abdichtende Claudine, zu denen beispielsweise Claudin-1, -3, -4, -5, -8 und -18.1 zählen, von Poren-bildenden Claudinen, wie etwa Claudin-7 oder -10 (Günzel & Yu, 2013; Krause *et al.*, 2008). Veränderungen in den Expressionen von Claudinen können sich aufgrund der Diversität ihrer Funktionalität dementsprechend erheblich auf das Epithel auswirken und die parazelluläre Permeabilität verändern (Günzel & Yu, 2013; Schlingmann *et al.*, 2015). Auch

wurde durch elektronenmikroskopische Aufnahmen gezeigt, dass bereits die Störung eines einzelnen Claudins eine gestörte Verbindung von murinen alveolären Typ-I-Zellen bewirkt (LaFemina *et al.*, 2014).

2.1.1.2.2.2. *Zonula occludens*

ZO-Proteine werden gewebsspezifisch exprimiert und sind an Verbindungsstellen zwischen benachbarten Zellen lokalisiert (Bauer *et al.*, 2010). Bei ZO-Proteinen handelt es sich um periphere Proteine, die in der Lage sind Protein-Protein-Wechselwirkungen mit anderen *Tight Junction*-Proteinen aufzubauen und eine direkte Verbindung zum Aktin-Zytoskelett auszubilden. Sie sorgen für eine Rekrutierung von Proteinen an die zytoplasmatische Oberfläche der Verbindungsstellen und tragen so zum sogenannten ‚Verbindungsplaque‘ bei (Bauer *et al.*, 2010; Rezaee & Georas, 2014). Dadurch werden unter anderem JAMS oder Occludin direkt mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden (Fanning, Jameson, Jesaitis, & Anderson, 1998; Itoh *et al.*, 2001). Zusätzlich assoziieren ZO-Proteine über Cadherin mit den *Adherence Junctions* (Howarth, Hughes, & Stevenson, 1992; Ikenouchi, Umeda, Tsukita, & Furuse, 2007) und über Connexin mit den *Gap Junctions* (Kausalya, Reichert, & Hunziker, 2001; Singh, Solan, Taffet, Javier, & Lampe, 2005). ZO-1-Proteine sind an der Ausbildung und der Funktion anderer Zell-Zell-Verbindungen beteiligt, was zusätzlich auf die Rolle von ZO-Proteinen in der interzellulären Adhäsion hinweist (Bauer *et al.*, 2010).

Durch ihre PDZ-2-Domänen sind die drei ZO-Proteine (ZO-1, ZO-2, ZO-3) in der Lage miteinander zu interagieren. Zusätzlich tragen ZO-1 und ZO-2 noch eine Prolin-reiche Region am C-Terminus, während diese bei ZO-3 zwischen der zweiten und dritten PDZ-Domäne zu finden ist (Bauer *et al.*, 2010; González-Mariscal *et al.*, 2000; Utepbergenov, Fanning, & Anderson, 2006). Es existieren weiterhin variable U (*Unique*) Motive (U1 - U6) innerhalb der ZO-Proteine. Diese Motive sind, wie etwa das U5-Motiv (das sogenannte ‚Haken‘-Motiv), wichtig für die Lokalisierung von, unter anderem ZO-1, an die *Tight Junctions* (Fanning *et al.*, 2007). Wird die Expression von ZO-Proteinen verändert, hat dies Auswirkungen auf die epitheliale Barriere. In Eph4-Zellen wurde zum Beispiel ZO-1 durch einen *Knockdown* herunterreguliert, wodurch sich die Rekrutierung von Claudin und Occludin veränderte und es zu einem verzögerten Aufbau der Barriere kam (Umeda *et al.*, 2004). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass Mäuseembryonen mit einem ZO-1-*Knockout* nicht lebensfähig sind (Katsuno *et al.*, 2008).

2.1.2. Das angeborene Immunsystem in der Lunge

2.1.2.1. Pathogenerkennung und Signalwegs-Aktivierung der angeborenen Immunantwort

Pathogene, die trotz der mechanischen Abwehr in die Lunge gelangen, werden durch die molekulare Abwehr daran gehindert sich zu vermehren. Für eine effektive Abwehr ist eine frühe Erkennung von Pathogenen unerlässlich. Das angeborene Immunsystem sorgt so für einen initialen Schutz der Lunge gegen Pathogene und stimuliert parallel das adaptive Immunsystem, welches dann spezifisch gegen die eingewanderten Pathogene wirkt (Bals & Hiemstra, 2004). Unterschiedliche Pathogene bilden unterschiedliche Struktur motive und Moleküle aus, sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*; PAMPs), anhand derer sie durch *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) erkannt werden können. Diese Erkennung bildet die Basis zur Unterscheidung zwischen ‚eigen‘ und ‚fremd‘. Nach der Erkennung durch die PRRs wird das angeborene Immunsystem aktiviert, woraufhin Zytokine ausgeschüttet und Reaktionsketten aktiviert werden, die in die Abwehr von Pathogenen involviert sind und inflammatorische Prozesse anstoßen. Diese Prozesse gehen dann in die Ausbildung des adaptiven Immunsystems über. Zu den PRRs gehören unter anderem die Familien der *Toll-like* Rezeptoren (TLRs) und der *RIG-I-like* Rezeptoren (RLRs) (Bals & Hiemstra, 2004; Takeda & Akira, 2001; Takeuchi & Akira, 2010).

TLRs werden unter anderem auf den Epithelzellen und in Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert, wodurch extrazelluläre Pathogene auf der Zelloberfläche erkannt werden können. Durch die Lokalisierung einiger TLRs in intrazellulären Kompartimenten, wie Endosomen oder Lysosomen (siehe Abbildung 2.3), sind sie ebenfalls in der Lage Pathogene zu detektieren die durch Endozytose in vesikuläre Reaktionswege aufgenommen wurden (Akira, Uematsu, & Takeuchi, 2006). Bisher wurden zehn humane TLRs identifiziert, welche verschiedene PAMPs erkennen. Anhand von Nukleinsäuren können Viren von TLR3, TLR7/8 und TLR9, die in den Endosomen der Zelle lokalisiert sind, identifiziert werden (Takeuchi & Akira, 2010). Der Plasmamembran-ständige TLR2 kann durch das Bilden eines Heterodimers mit TLR1 oder TLR6 Bakterien, Pilze und auch Viren erkennen. TLR2 ist in der Lage Bakterien anhand von Lipoproteinen, wie etwa Lipoteichonsäure (LTA) bei grampositiven Bakterien, zu erkennen. Auch einige Viren können, zum Beispiel durch die Abgabe virale Proteine in das extrazelluläre Milieu, von TLR2 erkannt werden. TLR4 und TLR5 sind ebenfalls auf der Plasmamembran der Zelle lokalisiert und erkennen Bakterien anhand von Lipopolysaccharide (LPS) oder Flagellin. TLR4 kann zusätzlich bestimmte Viren erkennen. So kann beispielsweise das Fusions-Protein des Respiratorischen Synzytial-Virus (RSV) diesen TLR aktivieren (Lester & Li, 2014; Takeuchi & Akira, 2010; Triantafilou *et al.*, 2004).

Zur Gruppe der RLRs gehören unter anderem das *Retinoic Acid-Inducible Gene 1* (RIG-I) und das *Melanoma Differentiation-Associated Protein 5* (MDA-5). Beide RLRs sind im Zytoplasma lokalisiert und können die genomische Ribonukleinsäuren (*Ribonucleic Acid*; RNA) von RNA Viren erkennen. Während MDA5 anhand längerer doppelsträngiger (ds)RNA nur RNA-Viren erkennen kann, ist RIG-I In der Lage, durch kurze dsRNA sowohl RNA-Viren als auch einige *Deoxyribonucleic Acid* (DNA)-Viren zu identifizieren (Cai, Tang, Xu, & Zheng, 2021; Hippenstiel, Opitz, Schmeck, & Suttrop, 2006; Takeuchi & Akira, 2010).

Nachdem Pathogene durch PRRs erkannt wurden, binden diese an Adapterproteine. TLRs rekrutieren unter anderem die Adapterproteine *Myeloid Differentiation Factor 88* (MyD88) oder TIR (*Toll/Interleukin-1 Receptor*) *Domain-Containing Adaptor Inducing IFN β* (TRIF). RLRs dagegen rekrutieren das *Mitochondrial Antiviral-Signaling Protein* (MAVS). Durch die Rekrutierung dieser Adapterproteine werden Signalkaskaden aktiviert, welche unter anderem den I κ B-Kinase-Komplex aktivieren, der wiederum für die Freisetzung des Transkriptionsfaktors *Nuclear Factor - κ B* (NF- κ B), einem zentralen Koordinator der humanen Immunantwort, sorgt (Hinz & Scheidereit, 2014). Der aktivierte NF- κ B transloziert in den Zellkern und aktiviert dort die Expression proinflammatorischer Zytokine (Akira *et al.*, 2006; Ishii, Koyama, Nakagawa, Coban, & Akira, 2008; Rahman, 2003; Takeuchi & Akira, 2010).

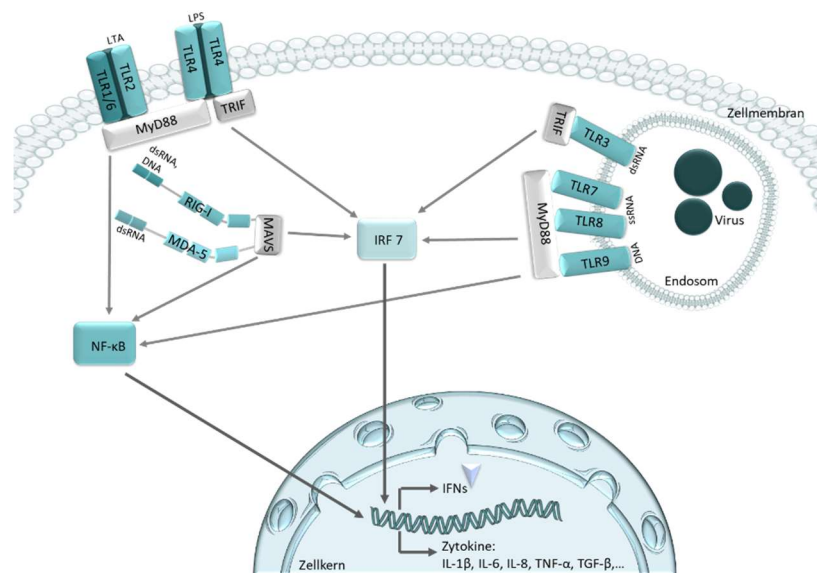


Abbildung 2.3: Schema der PRR-aktivierten Signalwege des angeborenen Immunsystems

Schematische Darstellung der PRR-aktivierten Signalwege des angeborenen Immunsystems. Pathogene werden durch PRRs (TLRs, MDA-5 oder RIG-I) erkannt, wodurch Adapter-Proteine (MAVS, MyD88 und TRIF) aktiviert werden. Dadurch können Transkriptionsfaktor wie IRF 7 oder NF- κ B aktiviert werden und in den Zellkern translozieren, wo sie die Expression von Zytokinen induzieren. Schaubild erstellt mit Smart Servier Medical Art, bereitgestellt von Servier, lizenziert unter einer *Creative Commons Attribution 3.0 Unported License* (smart.Servier.com).

Aufgrund der erhöhten Produktion von Mediatoren wie Zytokinen, Chemokinen und antimikrobiellen Peptiden nach einer mikrobiellen Exposition (Bals & Hiemstra, 2004) werden Mechanismen wie Phagozytose und das Entfernen von Pathogenen ausgelöst (Zhang *et al.*, 2021). Durch die Abgabe chemotaktischer Stoffe, wie zum Beispiel Zytokine oder GM-CSF (*Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor*), können Immunzellen zum Infektionsort rekrutiert werden (Rennard *et al.*, 1994; S. M. Smith, Lee, Lacy, & Coleman, 1990). Zu den Hauptkomponenten der unspezifischen Immunität zählen Makrophagen, dendritische Zellen, neutrophile Granulozyten, natürliche Killer (NK)-Zellen und angeborene lymphatische Zellen (*Innate Lymphoid Cells*; ILCs). Diese Immunzellen können sowohl Gewebs-resident sein als auch nach einer Infektion oder Gewebeschädigung einwandern (Galeas-Pena, McLaughlin, & Pociask, 2019; Zhang *et al.*, 2021).

Lungen-residente Makrophagen können in drei Gruppen eingeteilt werden: bronchiale Makrophagen, interstitielle Makrophagen und Alveolarmakrophagen (Zhang *et al.*, 2021). Sie sind eine direkte Antwort des angeborenen Immunsystems auf eine Infektion und eliminieren Infektionserreger direkt durch Phagozytose, während sie ebenfalls Zytokine und Chemokine freisetzen. Dadurch werden andere Immunzellen, zum Beispiel Neutrophile, rekrutiert, die wiederum in der Lage sind Erreger durch Phagozytose oder durch das Bilden von neutrophilen extrazellulären Fallen (*Neutrophil Extracellular Traps*; NETs) unschädlich zu machen (Bakker *et al.*, 1998; Rubins, 2003; Zhang *et al.*, 2021).

Dendritische Zellen sind antigenpräsentierende Zellen, welche das angeborene und das adaptive Immunsystem verbinden und dadurch für effektive Immunantworten während Infektionen sorgen (Condon, Sawyer, Fenton, & Riches, 2011). ILCs sind ortsständige Zellen, die Merkmale von T-Zellen aufweisen, allerdings keine Antigenrezeptoren besitzen. Durch die Produktion eigener Zytokine können sie die Abwehr gegen Erreger unterstützen. NK-Zellen produzieren ebenfalls Zytokine und sind dadurch in der Lage Apoptose in der Zielzelle auszulösen (Ardain, Marakalala, & Leslie, 2020; Galeas-Pena *et al.*, 2019; Spits *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2021).

2.1.2.2. Zytokine

Zytokine koordinieren die inflammatorische Antwort des Immunsystems auf Pathogene wie Viren oder Bakterien. Grob einzuordnen sind Zytokine in anti- und pro-inflammatorische Zytokine (Takeuchi & Akira, 2010). Pro-inflammatorische Zytokine regulieren zum Beispiel den Zelltod, modifizieren die endotheliale Permeabilität und rekrutieren und aktivieren Effektorzellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Zudem sind sie maßgeblich an inflammatorischen Reaktionen des Immunsystems beteiligt (Takeuchi & Akira, 2010). Produziert

werden diese Zytokine unter anderem von Atemwegsepithelzellen, aber auch von unterschiedlichen Zelltypen des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Einige Zytokine koordinieren sowohl die angeborene als auch die adaptive Immunantwort auf Krankheitserreger und fungieren als Schlüsselstelle zwischen den Immunantworten (Bals & Hiemstra, 2004; Feghali & Wright, 1997).

IL-1 β und IL-6 sind pro-inflammatorische Zytokine. IL-1 β wird unter anderem von Makrophagen oder Monozyten exprimiert und IL-6 zum Beispiel von mononukleären Phagozyten, T-Zellen und Fibroblasten. IL-1 β wirkt pyrogen und steuert die Differenzierung und Proliferation von T-Zellen. IL-6 wirkt als Schnittstellen-Zytokin zwischen angeborener und adaptiver Immunität, stimuliert die Reifung von B-Zellen in Antikörper-produzierenden Plasmazellen, sowie die Aktivierung von T-Zellen und Induktion von weiteren Zytokinen (Feghali & Wright, 1997; Turner, Nedjai, Hurst, & Pennington, 2014).

Der Tumor Nekrose Faktor (TNF)- α ist ebenfalls ein pro-inflammatorisches Zytokin, welches unter anderem von Makrophagen und NK-Zellen sekretiert wird. Wie auch IL-1 β wirkt TNF- α pyrogen und hat entzündliche, antivirale und immunregulatorische Wirkungen. Es reguliert die Expression von Adhäsionsmolekülen und stimuliert die Produktion von *C-X-C Motif* (CXC)-Chemokinen. Solche pro-inflammatorischen Chemokine sind Signalproteine, die für die Chemotaxis von Zellen verantwortlich sind und stimulieren die Aktivierung von Neutrophilen und anderen Zelltypen sowie deren Migration zu den Infektions- oder Verletzungsstellen (Feghali & Wright, 1997; Turner *et al.*, 2014).

So kann zum Beispiel TNF- α die Ausschüttung von *CXC Chemokine Ligand* (CXCL)10 in Endothelzellen induzieren (Hardaker *et al.*, 2004). Das *Interferon γ -Induced Protein* (IP)-10, oder auch CXCL10, ist ein chemotaktisches, pro-inflammatorisches Chemokin. Produziert wird es unter anderem von Epithelzellen, Makrophagen, oder Monozyten (M. Liu *et al.*, 2011). B- und T-Zellen, sowie NK-Zellen, dendritische Zellen und Makrophagen werden durch die Bindung von IP-10 an den CXCR3 Rezeptor, der auf all diesen Zellen exprimiert wird, aktiviert und zur Infektionsstelle rekrutiert. Auch ist IP-10 unter anderem in der Lage Apoptose auszulösen und das Zellwachstums zu inhibieren (E. Y. Lee, Lee, & Song, 2009; M. Liu *et al.*, 2011; Turner *et al.*, 2014).

IL-8, oder auch CXCL8, ist ebenfalls ein Chemokin und gleichzeitig ein Entzündungsmediator. IL-8 initiiert hauptsächlich die Rekrutierung und Aktivierung von Neutrophilen in entzündetes Gewebe und ist aus diesem Grund auch bekannt als neutrophiler chemotaktischer Faktor. Exprimiert wird IL-8 zum Beispiel in Epithelzellen, Monozyten, Makrophagen oder T-Zellen und

ist zusätzlich verantwortlich für die Aktivierung von Monozyten, Lymphozyten, Basophilen und Eosinophilen, sowie deren Migration zum Inflammationsherd (Nakanaga, Nadel, Ueki, Koff, & Shao, 2007; Russo, Garcia, Teixeira, & Amaral, 2014; Turner *et al.*, 2014).

Anti-inflammatorische Zytokine können im Gegensatz dazu die Synthese von pro-inflammatorischen Zytokinen hemmen oder deren Aktivität kontrollieren. So werden Entzündungsreaktionen beendet, um Gewebeschädigungen durch übermäßige Entzündung zu verhindern (Shao *et al.*, 2014).

Zu den anti-inflammatorische Zytokinen gehört IL-10, welches unter anderem durch Makrophagen, T-Lymphozyten und basophilen Granulozyten exprimiert wird. Die Funktion dieses Zytokins besteht darin, Entzündungsreaktionen zu begrenzen und zu beenden, sowie die Differenzierung und Proliferation mehrerer Immunzellen zu regulieren (Shao *et al.*, 2014). IL-10 induziert zum Beispiel die *Supressors of Cytokine Signalling* (SOCS)-Expression und aktiviert *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT)1 und STAT3. Dadurch werden wiederum weitere Gene transaktiviert, die für eine Regulation der inflammatorischen Antwort sorgen (Cuneo & Autieri, 2009).

Auch der *Transforming Growth Factor* (TGF)- β zählt zu den anti-inflammatorische Zytokinen und fungiert als Schlüsselstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort (Kelly, Houston, Sherwood, Casulli, & Travis, 2017). Es existieren drei TGF- β - Isoformen (TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3), die alle an denselben Rezeptor binden und sowohl von Zellen des adaptiven, als auch von Zellen des angeborenen Immunsystem, wie T-Zellen und Monozyten, produziert werden (Feghali & Wright, 1997). TGF- β ist in der Lage die Differenzierung und Proliferation von unterschiedlichen Zelltypen zu steuern. Darunter fallen Zellen des Epithels sowie Immunzellen, wie zum Beispiel T-Zellen, dendritische Zellen und NK-Zellen. TGF- β fördert die Proteinexpression der extrazellulären Matrix (*Extracellular Matrix*; ECM) und steuert den Zellstoffwechsel (Derynck & Budi, 2019; Feghali & Wright, 1997).

2.1.2.3. Interferone

Der TRIF-abhängige und der MAVS-vermittelte Signalweg führen zur Translokation des Interferon-regulierenden Faktors (IRF) 3 in den Nukleus. Dieser Transkriptionsfaktor aktiviert die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen und Interferonen (IFNe, siehe Abbildung 2.3) (Fitzgerald *et al.*, 2003; Takeuchi & Akira, 2010).

IFNe sind Glykoproteine und Schlüsselzytokine der angeborenen Immunantwort für die Wirtsabwehr gegen Viren. Sie induzieren zelleigene Programme und gelten als erste Verteidigungslinie gegen virale Infektionen (Sadler & Williams, 2008). Entdeckt wurden die ersten IFNe in den 1950er Jahren (Isaacs & Lindenmann, 1957). Es sind insgesamt 21 humane IFNe bekannt, die anhand ihres Rezeptors in drei unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden (Walter, 2020).

IFN γ bildet die Gruppe der Typ II IFNe. Es wird hauptsächlich von T-Lymphozyten und NK-Zellen gebildet, wo es auch an den IFN γ Rezeptor (IFNGR)-Komplex bindet und die virale Abwehr unterstützt. Dadurch spielt IFN γ sowohl im angeborenen als auch im adaptiven Immunsystem eine Rolle. Es aktiviert Makrophagen und induziert eine Th1-Zell-vermittelte Immunreaktion (Alspach, Lussier, & Schreiber, 2019; Lazear, Schoggins, & Diamond, 2019; Sadler & Williams, 2008).

Die Produktion der Typ I und Typ III IFNe wird direkt während einer Virusinfektion aktiviert, weswegen diese IFNe somit in einem frühen Infektionsstadium produziert werden. Im Menschen beinhaltet die Gruppe der Typ I IFNe insgesamt 13 IFN α -Subtypen, sowie IFN β , IFN ϵ und IFN ω . Während IFN α hauptsächlich von plasmazytoiden dendritischen Zellen sezerniert wird, kann IFN β von unterschiedlichen Zelltypen, wie etwa Epithelzellen oder Fibroblasten, produziert werden. Die Typ III Interferone umfassen insgesamt vier IFNe, IFN λ 1 - λ 4 (Kopitar-Jerala, 2017; Mesev, LeDesma, & Ploss, 2019; Sadler & Williams, 2008). Typ I und Typ III IFNe binden an unterschiedliche Rezeptoren, ihre Produktion wird aber durch ähnliche Mechanismen induziert und sie aktivieren verwandte antivirale Genexpressionsprogramme (Lazear *et al.*, 2019; Sadler & Williams, 2008). Typ I IFNe binden an einen Rezeptorkomplex, der sich aus den Untereinheiten IFN Rezeptor α (IFNAR) 1 und IFNAR 2 zusammensetzt und auf allen kernhaltigen Zelltypen vorhanden ist. Der Rezeptor für Typ III IFNe, der sich aus dem IFN λ Rezeptor 1 (IFNLR1) und dem IL-10 Rezeptor β (IL-10R β) zusammensetzt, ist hauptsächlich auf Epithelzellen zu finden (Lazear *et al.*, 2019).

Binden Typ I und III IFNe an ihre jeweiligen Rezeptoren an der Plasmamembran der Zelle, wird die IFN-stimulierte Gen (ISG)-Expression durch die *Janus Kinase* (JAK)-STAT-Signalkaskade, sowie die Phosphorylierung und nukleare Translokation des ISG Faktor 3 (ISGF3)-Komplex aktiviert (siehe Abbildung 2.4). Dieser Komplex wird durch STAT1 und STAT2, sowie IRF 9 gebildet. Im Nukleus bindet der ISGF3-Komplex an das *IFN-Stimulated Response Element* (ISRE). Dadurch werden über 300 ISGs, wie zum Beispiel *Oligoadenylatsynthetase like* (OASL), *Myxovirus Resistance Protein* (Mx) 1, ISG-15 oder *Radical S-Adenosyl Methionine Domain Containing* (RSAD) 2, exprimiert, welche wiederum an der antiviralen Antwort des Immunsystems beteiligt

sind. So werden unter anderem die Antigenpräsentation und die NK-Zellfunktionen gefördert und auch die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine aktiviert. Durch die Synthese von 2'-5'-Oligoadenylate aktiviert das ISG OAS zum Beispiel RNase L, welche durch den Abbau zellulärer und viraler mRNAs für ein Ende der viralen Replikation sorgt (Player & Torrence, 1998; Zhu, Ghosh, & Sarkar, 2015)

Durch die IFN Typ I und Typ III-vermittelte Signalgebung wird zusätzlich zu den ISGs ebenfalls IRF 7 transkribiert, wodurch die erneute Expression von Typ I und Typ III IFNen und die Entstehung eines positiven *Feedback Loops* ausgelöst wird (Honda, Takaoka, & Taniguchi, 2006; Mesev *et al.*, 2019; Takeuchi & Akira, 2010). Dieser *Feedback Loop* kann durch die IL-10-induzierte Expression von SOCS gestoppt werden. Dabei regulieren diese Proteine die IFN Typ I und Typ III-Produktion negativ, indem sie die JAK-STAT-Signalkaskade inhibieren (Cooney, 2002).

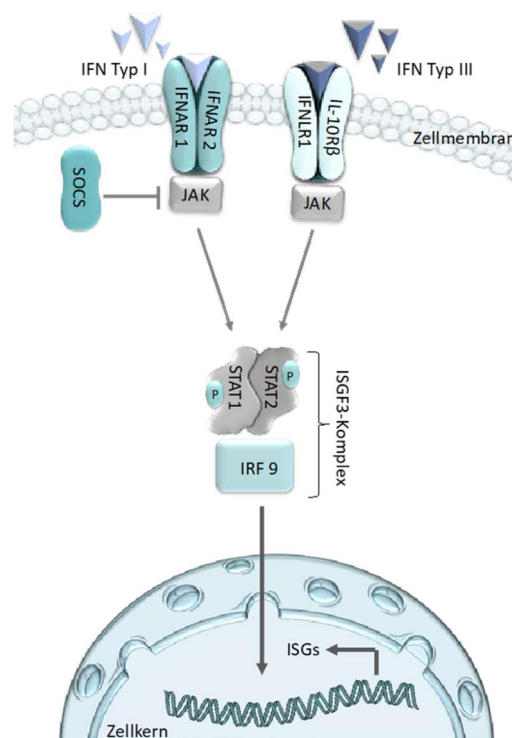


Abbildung 2.4: Schema des Interferon Typ I und Typ III-Signalwegs

Schematische Darstellung der IFN Typ I und Typ III Signalwege. Binden IFN Typ I oder IFN Typ III an ihre Rezeptoren auf der Plasmamembran, wird durch den translozierenden ISGF3-Komplex die Expression von ISGs aktiviert. Als negativer Regulator kann SOCS die JAK-STAT-Signalkaskade inhibieren.

Schaubild erstellt mit Smart Servier Medical Art, bereitgestellt von Servier, lizenziert unter einer *Creative Commons Attribution 3.0 Unported License* (smart.Servier.com).

2.1.2.3.1. Protektiver Effekt von IFN auf virale Infektionen *in vitro*

Epithelzellen produzieren Typ I und III IFNe um die virale Replikation einzuschränken, eine antivirale Resistenz in benachbarten Zellen hervorzurufen und das Epithel zu schützen (Akira *et al.*, 2006; Taniguchi & Takaoka, 2001). In humanen Rhinovirus (HRV)-infizierten primären bronchialen Epithelzellen wurde ein antiviraler Effekt sowohl durch die kontinuierliche Behandlung während der viralen Infektion, als auch durch die Vorbehandlung der Zellen mit IFN β oder IFN $\lambda 1$ nachgewiesen. Durch diesen verstärkten antiviralen Zustand mit hochregulierter ISG-Expression wurden die Zellen vor Infektionen geschützt (Cakebread *et al.*, 2011; Gaajetaan *et al.*, 2013; Gulraiz *et al.*, 2014; Moll, Maier, Zommer, Lavoie, & Brostjan, 2011). Weiterhin verstärkt der synergistische Effekt von IFN β und IFN $\lambda 1$ die Inhibierung der Influenza-Replikation in humanen Atemwegsepithelzellen (Ilyushina & Donnelly, 2014).

2.1.2.3.2. Unterschiede in der antiviralen Antwort verschiedener IFN-Subtypen

Trotz ähnlicher Induktions- und Wirkmechanismen bestehen zwischen Typ I und Typ III IFNen Unterschiede während der Bekämpfung von Infektionen. Typ I IFNe werden benötigt, um die systemische Ausbreitung einer viralen Infektion zu begrenzen und IFN Typ III ist für die antivirale Abwehr in Epithelzellen essentiell (Jewell *et al.*, 2010). Direkt nach der Aktivierung von IRF 3 wird IFN β induziert, was wiederum die Aktivierung antiviraler Gene, den ISGs, und die Bildung weiterer Typ I IFNe durch Translokation von IRF 7 mit sich bringt. Während die Induktion der ISGs durch Typ I IFNe damit schon früh nach der Infektion ihren Höhepunkt erreicht und anschließend wieder abflacht, beginnt die Expression der IFN Typ III-aktivierten ISGs erst später (Bolen, Ding, Robek, & Kleinstein, 2014; Lazear *et al.*, 2019).

Es ist außerdem bekannt, dass unterschiedliche Subtypen der IFNe Wirkungsspezifische Unterschiede aufweisen. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass durch Typ I und Typ III IFNe die Expression ähnlicher ISGs induziert wird, die Stärke der ISG-Induktion jedoch unterschiedlich ausfällt (IFN β > IFN α > IFN $\lambda 3$ > IFN $\lambda 1$ > IFN $\lambda 2$) (Bolen *et al.*, 2014).

Diese Unterschiede könnten in einer unterschiedlichen Affinität oder der Interaktions-Kinetik, sowie dem Zeitpunkt der Interaktion mit den Untereinheiten der jeweiligen IFN-Rezeptoren begründet sein (Olagnier & Hiscott, 2014; Voigt & Yin, 2015).

Die Bindungsaffinität von IFNAR 2 zu IFN β ist bis zu 20fach höher, als die Bindungsaffinität zu IFN α (Gibbert, Schlaak, Yang, & Dittmer, 2013; Jaks, Gavutis, Uzé, Martal, & Piehler, 2007). Zusätzlich zeigte IFN β die stärkste ISG-Induktion (Bolen *et al.*, 2014).

Auch die IFNe $\alpha 2b$ und $\alpha 8$ wiesen eine hohe Affinität zur Rezeptoruntereinheit IFNAR 2 auf. Durch Studien konnte eine Hierarchie aufgestellt werden, welche die IFNAR 2-Bindung der

Subtypen widerspiegelte: $\alpha 2 > \alpha 1$ (Gibbert *et al.*, 2013; Jaks *et al.*, 2007; Lavoie *et al.*, 2011). Auch ist bekannt, dass unterschiedliche IFN α -Subtypen ISGs unterschiedlich stark induzieren. Dabei zählten IFN $\alpha 2b$ und $\alpha 8$ hierbei zu den IFNe mit einer hohen ISG-Induktion (Moll *et al.*, 2011).

2.1.2.4. Oxidativer Stress während einer viralen Infektion

In der unspezifischen Immunantwort des angeborenen Immunsystems spielt die Produktion von oxidativem Stress zur Virusbekämpfung ebenfalls eine wichtige Rolle (Ganjian, Rajput, Elzoheiry, & Sajjan, 2020; Moriyama, Hugentobler, & Iwasaki, 2020). Oxidativer Stress resultiert aus einem Ungleichgewicht zwischen endogenen Oxidantien und Antioxidantien. Diese hemmen die Oxidation durch die Entfernung von freien Radikalen-Zwischenprodukten. Reaktive Sauerstoffspezies (*Reactive Oxygen Species*; ROS) umfassen die reduzierten Formen von molekularem Sauerstoff, wie etwa Hydroxyl-Radikale ($\cdot OH$) oder Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Begleitet wird die Akkumulation von ROS häufig von der Produktion von Stickstoffspezies (*Reactive Nitrogen Species*; RNS). Das Peroxinitrit-Anion ist ein RNS, welches durch die Reaktion von O_2^- und dem antiviralen Stickstoffmonoxid (NO) gebildet wird (González-Mariscal, Quirós, & Díaz-Coránguez, 2011; O'Donnell & Freeman, 2001).

Oxidativer Stress spielt zudem spezifisch in der Abwehr von HRV eine Rolle. So wurde eine erhöhte NO-Produktion in HRV-infizierten Probanden festgestellt, die die virale Beseitigung begünstigte (Sanders *et al.*, 2004).

Zu den Auswirkungen von oxidativem Stress auf die Funktion der epithelialen Barriere während einer HRV-Infektion liegen widersprüchliche Daten vor. So wurde einerseits gezeigt, dass durch HRV-induzierte ROS die Barrierefunktion von Epithelzellen *in vitro* beeinträchtigt werden kann (Comstock *et al.*, 2011). In einer anderen Studie wurde jedoch gezeigt, dass durch eine Infektion von mit HRV-C15 die Barrierefunktion bronchialer Epithelzellen beeinträchtigt und parallel die Bildung von ROS unterdrückt werden kann. Eine Behandlung mit Oligomycin A *in vitro* revidierte diese Effekte und zeigte einen schützenden Effekt auf die Barrierefunktion und gleichzeitig eine erhöhte ROS-Produktion. Laut dieser Studie könnte eine gesteigerte ROS-Aktivität zur Aufrechterhaltung der epithelialen Barriere beitragen (Michi, Yipp, Dufour, Lopes, & Proud, 2021).

2.2. Respiratorische virale Infektionen

Trotz der Abwehr des Immunsystems kann es zu respiratorischen Infektionen des Atemwegstraktes kommen. Unterschieden wird dabei zwischen einer Infektion der oberen und der unteren Atemwege. Meist beschränken sich die auftretenden Erkrankungen auf die oberen Atemwege und sind dort selbstlimitierend. Kommt es zu einer Infektion der unteren Atemwege, kann dies zu Erkrankungen wie Bronchiolitis und Lungenentzündung führen (Troy & Bosco, 2016). Diese Infekte zählen zu den am häufigsten vorkommenden Erkrankungen des Menschen (Taboada *et al.*, 2014). Dabei sind sowohl die Mortalität als auch die Morbidität durch eine Infektion der unteren Atemwege, speziell bei Kindern, deutlich erhöht (Demissie, Amele, Yitayew, & Yalew, 2021).

Zu den häufigsten viralen Pathogenen der Atemwege zählen Viren wie HRV, die Enteroviren der Spezies C und D, das humane Coronavirus, das humane Metapneumovirus, das Adenovirus, Influenza, Parainfluenza und das Respiratorische Synzytial-Virus (RSV). Diese Viren sind unter anderem die Hauptauslöser von viral-bedingten Exazerbationen in Patienten mit Asthma oder chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (*Chronic Obstructive Pulmonary Disease*; COPD) (Hewitt *et al.*, 2016; Rohde *et al.*, 2003; Royston & Tapparel, 2016; Troy & Bosco, 2016; Venarske *et al.*, 2006).

2.2.1. Humanes Rhinovirus

Anders als Influenza oder RSV, welche saisonal und hauptsächlich in den Wintermonaten zu Atemwegserkrankungen führen, sind HRVs als typische Erkältungsviren ganzjährig detektierbar. Weltweit ist HRV die häufigste Ursache von Infektionen der oberen Atemwege, gegen die bis heute keine spezifische Behandlung oder Impfprophylaxe existiert (Jacobs, Lamson, St George, & Walsh, 2013; Moriyama *et al.*, 2020).

HRVs sind unbehüllte, einzelsträngige RNA-Viren, deren RNA vier virale Proteine (VP1 - VP4) kodiert. HRVs gehören zur Familie der *Picornaviridae* und zum Genus *Enterovirus*. Mehr als 160 HRV-Stämme wurden bereits identifiziert und basierend auf ihrer Genomsequenz in Rhinovirus A, B oder C eingeteilt (Jacobs *et al.*, 2013; Troy & Bosco, 2016). Das interzelluläre Zelladhäsionsmolekül (*Intracellular Cell Adhesion Molecule*; ICAM-1) fungiert dabei als Eintrittsrezeptor für Rhinoviren der Majorgruppe, zu welchen HRV-B und die meisten HRV-A-Stämme, wie zum Beispiel HRV16, zählen. Rhinoviren der sogenannten Minorgruppe, eine Untergruppe der HRV-A-Stämme, nutzen hingegen den *Low-Density Lipoprotein* (LDL)-Rezeptor zum Eintritt in die Zelle (Bochkov & Gern, 2016; Palmenberg, 2017). Für HRV-C dient *Cadherin*-

Related Family Member 3 (CDHR3) als Zelleintritts-Rezeptor (Bochkov *et al.*, 2015; Palmenberg, 2017).

Die HRV-Stämme unterscheiden sich ebenfalls in ihrer Virulenz und im Schweregrad der durch sie verursachten Symptome. So zeigen HRV-A und HRV-C, im Vergleich zu HRV-B, eine höhere Virulenz (Bochkov & Gern, 2016; W. M. Lee *et al.*, 2012). Zusätzlich wurde eine geringere und langsamere Replikation, sowie eine geringere Zytotoxizität von HRV-B-Stämmen festgestellt (Nakagome *et al.*, 2014). Während HRV-C hauptsächlich in Zilien-tragenden Zellen des Atemwegsepithels repliziert, können HRV-A und HRV-B sowohl Zilien-tragende als auch nicht Zilien-tragende Zellen infizieren (Ganjan *et al.*, 2020; Griggs *et al.*, 2017).

Für HRV16, zugehörig zur Majorgruppe des HRV-A-Stamms, sind die gesamte Genomsequenz und die Struktur des Virons bekannt. Aus diesem Grund sowie der Reproduzierbarkeit der Symptome *in vivo* ist HRV16 ein wichtiges Modellvirus. Häufig wird es in *in vitro*-Studien genutzt, um molekulare Mechanismen nach einer viralen Infektion zu untersuchen (W. M. Lee & Wang, 2003; Sajjan, Wang, Zhao, Gruenert, & Hershenson, 2008).

2.2.2. Einfluss viraler Infektionen auf epitheliale Barrieren

Durch Virusinfektionen oder Entzündungen können die *Tight Junctions* des Atemwegsepithels morphologisch beeinflusst werden, was die Barriere-Integrität beeinträchtigen kann (Linfield, Raduka, Aghapour, & Rezaee, 2021).

Oft resultiert aus einer viralen Infektion der Zelltod der infizierten Zellen. Ausgelöst durch die antivirale Abwehr des Immunsystems kann der programmierte Zelltod aktiviert werden, um die virale Replikation einzuschränken (Upton & Chan, 2014). Einige Viren sind allerdings in der Lage zelluläre Mechanismen, wie den programmierten Zelltod, unter ihre Kontrolle zu bringen (Danthi, 2016; Imre, 2020). Zu diesen Viren zählen die Picornaviren, wie zum Beispiel HRV. Diese Viren können den Zelltod der befallenen Wirtszelle in unterschiedlichen Stadien des Viruszyklus modulieren. So wird zum Beispiel durch das Hemmen der Apoptose während der frühen Infektionsstadien das Überleben des Virus erleichtert und durch das Auslösen der Apoptose in einem späten Stadium die Virusfreisetzung unterstützt (Danthi, 2016; Imre, 2020; Kerr, Mathew, & Ghildyal, 2021).

Viele Virenarten, wie etwa HRV der Majorgruppen oder Adenoviren, verwenden Zelladhäsionsmoleküle (CAMs) als Rezeptoren für den Eintritt in die Zellen. Zu den Mitgliedern dieser Rezeptorfamilie gehören unter anderem Cadherine, Integrine und Selektine. Für Viren ergeben sich unterschiedliche Strategien, um die Plasmamembranbarriere der Epithelzellen zu

überwinden und somit in die Zellen einzudringen und auf deren Zellmaschinerie zuzugreifen. Eine mögliche Strategie besteht in der Bindung von Viren an Proteine der apikalen junctionalen Komplexe der Zelle, wie den *Tight* oder *Adherence Junctions* (Guttman & Finlay, 2009). Diese Komplexe dienen in diesem Zusammenhang als Rezeptor für die anschließende Internalisierung des Virus. Eine weitere Strategie ist der Abbau unterschiedlicher Proteine der *Tight* oder *Adherence Junctions* durch Viren, wodurch sie Zugang zum darunterliegenden Gewebe erhalten (Guttman & Finlay, 2009; Linfield *et al.*, 2021; Maginnis, 2018).

Für RSV wurde zum Beispiel in humanen bronchialen Epithelzellen der Abbau von *Tight* und *Adherence Junctions* Proteinen, wie ZO-1 und Claudin-4, gezeigt. Dabei war dieser Abbau nicht mit dem Zelltod der Epithelzellen verbunden (Linfield *et al.*, 2021; Rezaee *et al.*, 2017).

Auch HRV beeinflusst das Atemwegsepithel. So konnte *in vitro* in Atemwegs- und humanen bronchialen Epithelzellen gezeigt werden, dass durch die Infektion mit HRV der transepitheliale Widerstand der Zellen sank und sich die Permeabilität erhöhte, wodurch eine Beeinträchtigung der Barrierefunktion nachgewiesen wurde. Ebenfalls konnte eine verringerte Protein-Expression von ZO-1, Claudin-1, Claudin-4 und E-Cadherin gezeigt werden (Faris *et al.*, 2016; Gagliardi *et al.*, 2022; Linfield *et al.*, 2021; Looi *et al.*, 2016; Sajjan *et al.*, 2008).

Eine Infektion mit HRV wirkt sich allerdings nicht nur auf die Barrierefunktion des Atemwegsepithels aus. Es ist bekannt, dass durch eine Infektion mit HRV die Mukus-Produktion der Atemwegsepithelzellen erheblich gesteigert wird und es zu einer sogenannten Mukus-Hypersekretion kommt (Yuta *et al.*, 1998). Auch gibt es Beobachtungen die zeigen, dass durch eine virale Infektion die Morphologie und Struktur von Zilien verändert wird (Gagliardi *et al.*, 2022; Martinez-Giron, Van Woerden, & Martínez-Torre, 2020). Zusätzlich wurden Beeinträchtigungen in der mukoziliären *Clearance* während einer HRV-Infektion in humanen Atemwegsepithelzellen festgestellt (Gagliardi *et al.*, 2022).

Des Weiteren ist bekannt, dass durch eine viral-induzierte Störung der epithelialen Barriere und die damit einhergehende erhöhte Permeabilität, die Einwanderung von Bakterien sowie die Internalisierung von Krankheitserregern in die Zelle erleichtert werden kann (Sajjan *et al.*, 2008; Yang, Mitländer, Vuorinen, & Finotto, 2021). HRV-infizierte Epithelzellen besitzen außerdem eine höhere Anfälligkeit für eine Ko-Infektion mit Bakterien. So ist zum Beispiel die Adhäsion von *Streptococcus pneumoniae* an HRV-infizierte Zellen erhöht (V. Peltola *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2021).

2.2.3. Bakterielle Sekundärinfektionen

Durch virale Infektionen des unteren Atemwegepithels steigt die Wahrscheinlichkeit für eine zusätzliche, sekundäre Infektion mit Bakterien, eine sogenannte Superinfektion (Hanada, Pirzadeh, Carver, & Deng, 2018; Manna, Baidara, & Mandal, 2020; Paget & Trottein, 2019; V. T. Peltola & McCullers, 2004). So wird die Mortalität durch eine Superinfektion, wie etwa eine sekundäre bakterielle Pneumonie infolge einer Influenza-Infektion, erheblich gesteigert (Manna *et al.*, 2020; Morens, Taubenberger, & Fauci, 2008).

Die bakterielle Adhärenz an Epithelzellen des respiratorischen Traktes wird während einer viralen Infektion durch verschiedene Mechanismen erleichtert. Durch die direkte Bindung von RSV an Bakterien wie *Haemophilus influenzae* oder *S. pneumoniae* wird der Eintritt der Bakterien durch die Wirtszellrezeptoren vereinfacht (Manna *et al.*, 2020; C. M. Smith *et al.*, 2014). Viren wie Influenza und Parainfluenza begünstigen ebenfalls bakterielle Ko-Infektionen. Durch die Aktivität der viralen Neuraminidase (NA) werden terminale Sialinsäuren entfernt, welche sonst die bakteriellen Rezeptoren auf der Zell-Oberfläche bedecken. Hierdurch werden Pneumokokken-Rezeptoren auf der Wirtszelle exponiert, wodurch die bakterielle Adhärenz erhöht ist (V. T. Peltola & McCullers, 2004; Tong, Grants, Liu, & DeMaria, 2002).

Auch HRVs können die bakterielle Adhäsion an die Epithelzellen der Atemwege begünstigen. So zeigte eine Studie, dass durch die erhöhte Expression von *Platelet-Activating Factor* (PAF)-Rezeptoren während einer HRV14-Infektion humaner trachealer Epithelzellen die Adhäsion von *S. pneumoniae* an diese Zellen gesteigert war (Ishizuka *et al.*, 2003).

2.2.3.1. *Streptococcus (S.) pneumoniae*

S. pneumoniae sind grampositive Diplokokken, die durch eine Tröpfcheninfektion oder Aerosole von Mensch zu Mensch übertragen werden. Die extrazellulären Bakterien können mit einer Kapsel aus Polysacchariden umgeben sein, welche sie vor Phagozytose schützt (Henriques-Normark & Tuomanen, 2013). Nicht alle *S. pneumoniae*-Stämme sind von einer Polysaccharid-Kapsel umgeben. Die sogenannten *Non-Encapsulated S. pneumoniae*-Stämme lösen, im Gegensatz zu den bekapselten Stämmen, eher nicht-invasive Krankheiten aus, wie zum Beispiel Otitis media (Keller, Robinson, & McDaniel, 2016; Langereis & de Jonge, 2017).

S. pneumoniae gehört mit *Staphylococcus aureus*, *Legionella pneumophila*, *Chlamydia pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* und *Pseudomonas aeruginosa* zu den bakteriellen Haupterregern von Lungeninfektionen (Zhang *et al.*, 2021). Dabei ist *S. pneumoniae* der häufigste Auslöser für bakterielle Pneumonien in Kindern und Erwachsenen. Infektionen mit *S. pneumoniae* bergen ein starkes invasives Potential, wodurch weltweit viele Todesfälle

verursacht werden. (Henriques-Normark & Tuomanen, 2013; Mitchell & Mitchell, 2010). Zusätzlich wurde beobachtet, dass die Krankheitsschwere einer *S. pneumoniae*-Infektion durch eine vorangegangene virale Infektion erheblich zunimmt (Ishizuka *et al.*, 2003; Stille, Pierce, & Crawford, 1961).

2.2.4. Auswirkungen von respiratorischen Infektionen auf Patienten mit chronischen Atemwegserkrankungen

Weltweit sind chronische respiratorische Erkrankungen, wie COPD oder Asthma, eine der führenden Todesursachen. Laut WHO verursachte allein COPD 2019 3,23 Millionen Todesfälle, Asthma sorgte weltweit für weitere 461.000 Todesfälle (GBD Chronic Respiratory Disease Collaborators, 2020; World Health Organization, June 2021, May 2021). Von 1990 bis 2017 stieg die Anzahl der Patienten mit einer chronisch respiratorischen Erkrankung um 39,8 %. Durch diesen Anstieg wurde das Gesundheitssystem sowie auch die Wirtschaft deutlich mehr belastet. Einhergehend mit der Zunahme an Patienten erhöhte sich auch die Zahl der Todesfälle durch chronische Atemwegserkrankungen um 18 % (GBD 2015 Chronic Respiratory Disease Collaborators, 2017; GBD Chronic Respiratory Disease Collaborators, 2020).

Dabei steigern vor allem Exazerbationen die Sterblichkeitsrate von COPD- und Asthma-Patienten (Donaldson & Wedzicha, 2006; Johnston & Sears, 2006). Ausgelöst werden Exazerbationen unter anderem durch Luftverschmutzungen, hauptsächlich aber durch virale oder bakterielle Infektionen der Atemwege. Die bekanntesten viralen Auslöser von COPD- und Asthma-Exazerbationen sind dabei HRV, Influenza und RSV (Hewitt *et al.*, 2016; Rohde *et al.*, 2003; Venarske *et al.*, 2006). Während durch eine Infektion mit HRV in gesunden Personen hauptsächlich Symptome in den oberen Atemwegen ausgelöst werden, entwickeln Patienten mit chronischen Atemwegserkrankungen häufig schwerere Symptome der unteren Atemwege (Corne *et al.*, 2002; Mallia *et al.*, 2011).

Bei COPD- und Asthma-Patienten wurde im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden eine verminderte Produktion von Typ I und Typ III IFNs nach experimenteller HRV-Infektion gezeigt (Contoli *et al.*, 2006; Mallia *et al.*, 2011). Diese Ergebnisse deuten auf eine eingeschränkte antivirale Reaktion von COPD und Asthma-Patienten hin (Mallia *et al.*, 2011). Da eine HRV-Infektion für diese Patienten gravierende Folgen haben kann, wäre es sinnvoll sie vor solchen Infektionen und den daraus resultierenden Exazerbationen zu schützen. Für den Schutz vor HRVs existiert aber bis dato noch kein geeignetes Therapeutikum. Ein möglicher therapeutischer Ansatz könnte die reduzierte IFN-Produktion von Asthma und COPD Patienten sein, der auch für die Therapie neu auftretender Erreger von Vorteil sein könnte. In den letzten Jahren wurden

erste Ansätze in diese Richtung untersucht, die allerdings bis heute keine klinische Anwendung gefunden haben (Djukanović *et al.*, 2014; Monk *et al.*, 2021).

2.3. Zielsetzung

Eine HRV-Infektion hat Auswirkungen auf die Funktion des Atemwegsepithels. So ist das Virus in der Lage die Barrierefunktion und *Tight Junction*-Komplexe zu beeinträchtigen. Es ist jedoch nicht bekannt, ob eine Vorbehandlung mit Typ I/III IFN einen schützenden Effekt auf eben diese Barrierefunktion hat. Dies sollte in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von differenzierten pBECs in ALI-Kultur analysiert werden. Als erstes sollte dazu ein geeignetes IFN mit einer hohen antiviralen Aktivität ausgewählt werden. In HRV-infizierten, differenzierten Zellen sollten dann diese antiviralen Effekte nachgewiesen werden. Anschließend sollte überprüft werden, wie sich eine Vorbehandlung mit IFN und eine darauffolgende Infektion mit HRV auf die Barrierefunktion, die *Tight Junction*-Komplexe und die Zilien-tragenden Zellen des Epithels auswirkt.

Des Weiteren ist bekannt, dass sich die Permeabilität der epithelialen Barriere durch eine virale Infektion vergrößern kann, wodurch es zu einer erleichterten Invasion von Bakterien und einer erhöhten Chance auf eine viral-bakterielle Ko-Infektion kommen kann. In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls untersucht, ob eine IFN-Vorbehandlung die bakterielle Translokation in die Zellschicht während einer viral-bakteriellen Ko-Infektion beeinflusst.

Außerdem sollte ein Einblick in den Mechanismus, warum eine HRV-Infektion einen Einfluss auf die Barrierefunktion hat, generiert werden. Dazu sollte mittels Immunstimulanz überprüft werden, ob die molekulare Abwehr des Immunsystems oder die virale Replikation an der Störung der *Tight Junction*-Komplexe durch eine HRV-Infektion beteiligt sind. Zusätzlich sollte überprüft werden, wie sich oxidativer Stress nach einer IFN-Behandlung und während einer HRV-Infektion auf die Funktion der epithelialen Barriere auswirkt.

Eine IFN-Behandlung könnte künftig einen vielversprechenden, pharmakologischen Ansatz darstellen, um COPD- und Asthma-Patienten vor viralen Infektionen zu schützen. Erkenntnisse über die Auswirkungen exogener Typ I IFNe auf Barrierefunktion und angeborene Immunität des Atemwegsepithels können hierbei zur präklinischen Entwicklung solcher Therapieansätze beitragen.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Organismen

Die folgenden Organismen wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet (siehe Tabelle 3.1 und 3.2).

Tabelle 3.1: Verwendete Organismen

<u>Organismus</u>	<u>Hersteller</u>
Zelllinien	
A549	ATCC (Manassas; USA)
HeLa Ohio Strain	Sigma Aldrich (Taufkirchen; Deutschland)
Primäre bronchiale Epithelzellen	Lungengewebebank des Instituts für Pathologie der Medizinischen Hochschule Hannover
Viren	
Humanes Rhinovirus 16	ATCC (Manassas; USA)
Bakterien	
<i>Escherichia coli</i> NEB 5-alpha kompetente <i>E. coli</i> zur Klonierung	New England Biolabs (Ipswich; USA)
<i>Streptococcus pneumoniae</i> Danish Designation 19F	ATCC (Manassas; USA)

Tabelle 3.2: Spender der primären bronchialen Epithelzellen

<u>Interne Spender ID</u>	<u>Grunderkrankung</u>	<u>Alter</u>	<u>Geschlecht</u>
MHH-004	CF	42	Männlich
MHH-009B	CF	31	Männlich
MHH-015	CF	36	Weiblich
MHH-016	CF	45	Weiblich
MHH-017	CF	33	Weiblich

Lungengewebe für die Isolation primärer bronchialer Epithelzellen (*Primary Bronchial Epithelial Cells*; pBECs) wurde von der Lungengewebebank des Instituts für Pathologie der Medizinischen Hochschule Hannover (Prof. Dr. med. Danny Jonigk) bezogen. Dafür lag ein positives Ethikvotum der Ethikkommission der Medizinischen Hochschule Hannover (Nr. 2700-2015: Charakterisierung von Zytokinprofilen und Wirtsreaktion in akuten und chronischen Infektionen der Lunge) sowie der Philipps-Universität Marburg vor (AZ: 176/19: Präklinische Entwicklung einer Formulierung von Interferon Typ I und Typ III zur Prävention viraler Infektionen bei chronischen Lungenerkrankungen, Schreiben vom 13.12.2019).

3.1.2. Chemikalien, Enzyme, Medien, Puffer, Reagenzien

In der vorliegenden Arbeit wurden die folgenden Chemikalien, Enzyme, Medien, Puffer und Reagenzien verwendet (siehe Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3: Verwendete Chemikalien, Enzyme, Medien, Puffer, Reagenzien

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
Agarose, universal	VWR (Radnor; USA)
Amersham® ECL Prime Western-Blot-Detektionsreagenz	Cytiva (Marlborough; USA)
Anti-alpha Tubulin (acetyl K40) Antikörper	Abcam (Cambridge, England)
Antibiotic/Antimycotic Solution	Sigma Aldrich (Taufkirchen; Deutschland)
Anti-Mucin 5AC antibody	Abcam (Cambridge, England)
BD FACSClean Solution	BD (Franklin Lakes; USA)
BD FACSDiva™ CS&T Research Beads	BD (Franklin Lakes; USA)
BD FACSTri™ Trägerflüssigkeit	BD (Franklin Lakes; USA)
BD FACSTri™ Shutdown Solution	BD (Franklin Lakes; USA)
Bleinitrat	Riedl-de-Haen AG (Seelze; Deutschland)
Bovines Typ I/III Kollagen PureCol®	Sigma Aldrich (Taufkirchen; Deutschland)
BPE (<i>Bovine Pituitary Extract</i>)	Thermo Fisher Scientific (Waltham; USA)
BSA (Bovines Serumalbumin), niedriger Endotoxin-Gehalt	Sigma Aldrich (Taufkirchen; Deutschland)
Cacodylsäure-Na-salz	Serva (Heidelberg; Deutschland)
CellROX™ grünes Reagenz für den Nachweis von oxidativem Stress	Invitrogen (Waltham; USA)
Chloramphenicol	Sigma Aldrich (Taufkirchen; Deutschland)
DirectLoad™ Wide Range DNA Marker	Sigma Aldrich (Taufkirchen; Deutschland)
DMP 30 (2,4,6-Tris-(Dimethylaminomethyl)-Phenol)	Serva (Heidelberg; Deutschland)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma Aldrich (Taufkirchen; Deutschland)
Dodecenyln-bernsteinsäureanhydrid	Carl Roth (Karlsruhe; Deutschland)
EcoRI recombinant	New England Biolabs (Ipswich; USA)
EGF Recombinant Human Protein	Thermo Fisher Scientific (Waltham; USA)
Essigsäure 100 %	Carl Roth (Karlsruhe; Deutschland)
Ethanol 100%	Sigma Aldrich (Taufkirchen; Deutschland)
Ethanol 80% vergällt	Carl Roth (Karlsruhe; Deutschland)
Ethidiumbromidlösung	Carl Roth (Karlsruhe; Deutschland)
FITC-Dextran (3-5 kDa)	Sigma Aldrich (Taufkirchen; Deutschland)
Fötales Kälberserum (FKS)	Sigma Aldrich (Taufkirchen; Deutschland)
Gentamicin	Lonza (Basel; Schweiz)
Gibco® DMEM	Thermo Fisher Scientific (Waltham; USA)
Gibco® DPBS (Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung)	Thermo Fisher Scientific (Waltham; USA)
Gibco® RPMI 1640 Medium	Thermo Fisher Scientific (Waltham; USA)
Glutaraldehyd 25 %	Serva (Heidelberg; Deutschland)
Glycidether-100	Carl Roth (Karlsruhe; Deutschland)

Heparin Lösung	Stemcell™ Technologies (Vancouver; Kanada)
Humanes Fibronectin	VWR (Radnor; USA)
Hydrocortison	Stemcell™ Technologies (Vancouver; Kanada)
Hygromycin B	Invitrogen (Waltham; USA)
Isoproterenol	Sigma Aldrich (Taufkirchen; Deutschland)
Kaliumhexacyanoferrat-II-trihydrat	Merck (Darmstadt; Deutschland)
Keratinocyte-SFM	Thermo Fisher Scientific (Waltham; USA)
Lipofectamin™ 3000	Invitrogen (Waltham; USA)
Methylnadic-anhydrid	Carl Roth (Karlsruhe; Deutschland)
Mouse IgG2b kappa Isotype Control, APC	Invitrogen (Waltham; USA)
MycoZap™ Plus-PR	Lonza (Basel; Schweiz)
tri-Natriumcitrat-dihydrat	Carl Roth (Karlsruhe; Deutschland)
Natriumhypochlorit	Carl Roth (Karlsruhe; Deutschland)
Natronlauge 50 %	Carl Roth (Karlsruhe; Deutschland)
Osmiumtetroxid 4 %	Serva (Heidelberg; Deutschland)
Paraformaldehyd	VWR (Radnor; USA)
Penicillin-Streptomycin	Sigma Aldrich (Taufkirchen; Deutschland)
pGL4.45[luc2P/ISRE/Hygro] Vector	Promega (Madison; USA)
Pikrinsäure wässrig-gesättigt	Morphisto (Offenbach; Deutschland)
PneumaCult® ALI 100x Supplement	Stemcell™ Technologies (Vancouver; Kanada)
PneumaCult® ALI 10x Supplement	Stemcell™ Technologies (Vancouver; Kanada)
PneumaCult® ALI Basal Medium	Stemcell™ Technologies (Vancouver; Kanada)
PneumaCult® Ex 50x Supplement	Stemcell™ Technologies (Vancouver; Kanada)
PneumaCult® Ex Basal Medium	Stemcell™ Technologies (Vancouver; Kanada)
Poly(I:C) HMW	InvivoGen (San Diego; USA)
Primärantikörper Kaninchen-anti-Cytokeratin 5	BioLegend (San Diego; USA)
Primärantikörper Kaninchen-anti-p63	Abcam (Cambridge, England)
Primärantikörper Maus-anti-TE7	Sigma Aldrich (Taufkirchen; Deutschland)
ProLong® Diamond Antifade mit DAPI	Invitrogen (Waltham; USA)
Propylenoxid	Sigma Aldrich (Taufkirchen; Deutschland)
Protease XIV	Sigma Aldrich (Taufkirchen; Deutschland)
Rotiphorese® 50x TAE Puffer	Carl Roth (Karlsruhe; Deutschland)
Sall recombinant	New England Biolabs (Ipswich; USA)
Salzsäure 37 %	Thermo Fisher Scientific (Waltham; USA)
SBTI (Soy Bean Trypsin Inhibitor)	Sigma Aldrich (Taufkirchen; Deutschland)
SDS	Carl Roth (Karlsruhe; Deutschland)
Sekundärantikörper AlexaFluor 488(grün) Ziege-anti-Maus	Thermo Fisher Scientific (Waltham; USA)

Sekundärantikörper AlexaFluor 555(rot) Ziege-antiKaninchen	Thermo Fisher Scientific (Waltham; USA)
S.O.C.-Medium	Invitrogen (Waltham; USA)
Thiazolylblau (MTT)	Carl Roth (Karlsruhe; Deutschland)
Tobramycin	Sigma Aldrich (Taufkirchen; Deutschland)
Triton X-100	AppliChem (Darmstadt; Deutschland)
Trypsin-EDTA Lösung	Sigma Aldrich (Taufkirchen; Deutschland)
Tween® 20	Sigma Aldrich (Taufkirchen; Deutschland)
Uranylacetat-dihydrat	Serva (Heidelberg; Deutschland)
Vancomycin	Sigma Aldrich (Taufkirchen; Deutschland)
Wasserstoffperoxid, 30 %	Carl Roth (Karlsruhe; Deutschland)
ZO-1 Monoclonal Antibody, FITC	Thermo Fisher Scientific (Waltham; USA)

3.1.3. Molekularbiologische Kits

Die folgenden molekularbiologischen Kits wurden während des Anfertigens dieser Arbeit verwendet (siehe Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Verwendete molekularbiologische Kits

<u>Kit</u>	<u>Hersteller</u>
APC Conjugation Kit	Abcam (Cambridge; England)
ArC™ Amine Reactive Compensation Bead Kit	Invitrogen (Waltham; USA)
Cytometric Bead Array (CBA) Human Soluble Protein Master Buffer Kit	BD (Franklin Lakes; USA)
CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay	Invitrogen (Waltham; USA)
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I	BD (Franklin Lakes; USA)
Gesamt-RNA-Kit	VWR (Radnor; USA)
iScript gDNA Clear cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad (Hercules; USA)
Human IL-1b Flex Set	BD (Franklin Lakes; USA)
Human IL-6 Flex Set	BD (Franklin Lakes; USA)
Human IL-8 Flex Set	BD (Franklin Lakes; USA)
Human IL-10 Flex Set	BD (Franklin Lakes; USA)
Human IP-10 Flex Set	BD (Franklin Lakes; USA)
Human TNF-α Flex Set	BD (Franklin Lakes; USA)
Human IL-8 Uncoated ELISA	Invitrogen (Waltham; USA)
LIVE/DEAD™ Fixable Blue Dead Cell Stain Kit, for UV excitation	Invitrogen (Waltham; USA)
ONE glo luciferase assay system	Promega (Madison; USA)
Peqlab XChange Plasmid Midi Kit	VWR (Radnor; USA)
SsoAdvanced Universal Probes Supermix	Bio-Rad (Hercules; USA)
TGF beta-1 Human/Mouse Uncoated ELISA	Invitrogen (Waltham; USA)
Western Blotting-Detektionsreagenz Amersham™ ECL™ Prime	VWR (Radnor; USA)

3.1.4. PCR-Assays

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die folgenden PCR-Assays verwendet (siehe Tabelle 3.5).

Tabelle 3.5: Verwendete PCR-Assays

<u>Ziel</u>	<u>Funktion</u>	<u>Sequenz (5' - 3')</u>	<u>Hersteller</u>
GAPDH	VP ¹	ATTCCACCCATGGCAAATTC	Sigma Aldrich (Taufkirchen; Deutschland)
	RP ¹	CGCTCCTGGAAGATGGTGAT	
	S ¹	JOE-CGTTCTCAGCCTTGACGGTGCCA-BHQ1	
HRV	VP ²	GGTGTGAAGAGCCGCGTG	Sigma Aldrich (Taufkirchen; Deutschland)
	RP ²	CAAAGTAGTCGGTCCCATCC	
	S ²	FAM-TCCTCCGGCCCCCTGAATGTGG-BHQ1	
	g-Block	-	IDT (Coralville; USA)
OASL	VP	TGAGGCAGGAGCATTTCAG	Sigma Aldrich (Taufkirchen; Deutschland)
	RP	CTCCTGAGAACCGTGCCATT	
	S	FAM-AAGGAGCCCACCTTGACTAC C-BHQ1	
Mx1	VP	CAGCCTGCTGACATTGGGTA	Sigma Aldrich (Taufkirchen; Deutschland)
	RP	CCACATTACTGGGGACCACC	
	S	FAM-CCACATTACTGGGGACCACC -BHQ1	
ISG15	VP	CCTCTGAGCATCCTGGTGAG	Sigma Aldrich (Taufkirchen; Deutschland)
	RP	CGAAGGTCAGCCAGAACAGG	
	S	FAM-ATCCTGGTGAGGAATAACAAGGGCC-BHQ1	
RSAD2	VP	ATCCTTTGTGCTGCCCTTG	Sigma Aldrich (Taufkirchen; Deutschland)
	RP	CTTGCCCAGGTATTCTCCCC	
	S	FAM-CTTGCCCAGGTATTCTCCC C-BHQ1	
ZO-1	VP ³	GCGGTCAGAGCCTTCTGATC	Sigma Aldrich (Taufkirchen; Deutschland)
	RP ³	CATGCTTTACAGGAGTTGAGACAG	
	S ³	FAM-ACTCGCCGAGCAGCCAAGCAAT-BHQ1	
Claudin-4	VP	TCTGCTCACACTTGCTGGCT	Sigma Aldrich (Taufkirchen; Deutschland)
	RP	CAGAGTGCACCTTTGCACCG	
	S	FAM-TGCGCATCAGGACTGGCTTTATCTCC-BHQ1	
E-Cadherin	VP ³	CCCACCACGTACAAGGGTC	Sigma Aldrich (Taufkirchen; Deutschland)
	RP ³	CTGGGGTATTGGGGGCATC	
	S ³	FAM-CGAGGCTAACGTGTAATCACCACACTGA-BHQ1	

FOXJ-1	VP ⁴	CAACTTCTGCTACTTCCGCC	Sigma Aldrich (Taufkirchen; Deutschland)
	RP ⁴	CGAGGCACTTTGATGAAGC	
	S	FAM-ACGCAGATCCCACCTGGCAGAA-BHQ1	
SNTN	VP	GTCAGTAGCGACCTAGAGCAC	Sigma Aldrich (Taufkirchen; Deutschland)
	RP	GCCTGGCCAATTCATTACTGT	
	S	FAM-CATCTACTTGTGATGGAAGTCTGAGGA-BHQ1	
SCGB3A1	VP ⁴	CATAGAGGGCTCCCAGAAGTG	Sigma Aldrich (Taufkirchen; Deutschland)
	RP ⁴	CAGCGTCTTGCTCCTCAGGTG	
	S	FAM-ATGCTCCAGTCTCGGCTCAGC-BHQ1	

VP = Vorwärtsprimer, RP = Rückwärtsprimer, S = Sonde

Falls angegeben, wurden die Sequenzen der Primer/Sonden aus folgenden Quellen entnommen:

¹ (Hillyer et al., 2018); ² (Hauptmeier et al., 2010); ³ (Stewart, Torr, Mohd Jamili, Bosquillon, & Sayers, 2012); ⁴ (Tadokoro et al., 2014)

3.1.5. Geräte und Software

Die folgenden Geräte und die folgende Software wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet (siehe Tabelle 3.6 und 3.7).

Tabelle 3.6: Verwendete Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller</u>
Sterilbank	
Thermo Scientific™ Safe 2020 biologische Sicherheitswerkbänke der Klasse II	Thermo Fisher Scientific (Waltham; USA)
Inkubator	
Thermo Scientific™ Heracell™ 240i CO2 Incubator	Thermo Fisher Scientific (Waltham; USA)
Pipetten	
PIPETMAN L P1000L, 100-1000 µL, Metal Ejector	Gilson (Middleton; USA)
PIPETMAN L P200L, 20- 200 µL, Metal Ejector	Gilson (Middleton; USA)
PIPETMAN L P20L, 2-20 µL, Metal Ejector	Gilson (Middleton; USA)
PIPETMAN L P2L, 0,2- 2 µL, Metal Ejector	Gilson (Middleton; USA)
EP Research® plus G, 8-Kanalpipette, variabel, 30 - 300 µl	Eppendorf (Hamburg; Deutschland)
pipetus® Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt; Deutschland)
2ML/5ML/10ML/25ML Serological Pipette	Gilson (Middleton; USA)
Zentrifugen und Schüttler	
Analog Vortex Mixer	VWR (Radnor; USA)

Biofuge fresco	Thermo Fisher Scientific (Waltham; USA)
Centrifuge 5804 R	Eppendorf (Hamburg; Deutschland)
Kombischüttler KL 2	Edmund Bühler (Bodelshausen; Deutschland)
PerfectSpinP	Peqlab (VWR; Radnor; USA)
Reax 2000	Heidolph (Schwabach; Deutschland)
Sprout Minizentrifuge	Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf; Deutschland)
Thermocycler	
CFX OPUS 96	Bio-Rad (Hercules; USA)
GeneAmp® PCR System 9700	Thermo Fisher Scientific (Waltham; USA)
Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg; Deutschland)
Spektrometer	
BioPhotometer Model #6131	Eppendorf (Hamburg; Deutschland)
Nanodrop ND-1000	Peqlab (VWR; Radnor; USA)
Mikroskope	
Elektronenmikroskop EM-10	Zeiss (Jena; Deutschland)
Leica DMI6000, KLSM	Leica Microsystems (Wetzlar; Deutschland)
Trinocular microscope, IT 400	VWR (Radnor; USA)
Durchflusszytometer	
BD FACSCanto™ II	BD (Franklin Lakes; USA)
BD FACSVerser™ Cell Analyzer	BD (Franklin Lakes; USA)
Mikrotiterplatten-Lesegerät	
EnVision Multimode Plate Reader	PerkinElmer (Waltham; USA)
Gelelektrophorese	
Biometra Ti 1	Biometra (Göttingen; Deutschland)
Electrophoresis Power Supply - EPS 301	Amersham BioSciencis (Buckinghamshire; UK)
Gel Doc™ CR+	Bio-Rad (Hercules; USA)
Horizon® 11.14	Biometra (Göttingen; Deutschland)
Waage	
Analysenwaage Talent TE64	Sartorius (Göttingen; Deutschland)
Sonstige Geräte	
Fusion Fx	Vilber (Marne-la-vallée; Frankreich)
Membran-Vakuumpumpe LABOPORT® Mini KN Ausführung, N 811 KN.18	Carl Roth (Karlsruhe; Deutschland)
Millicell® ERS-2 Voltohmmeter	Merck (Darmstadt; Deutschland)
PCR Workstation Pro	VWR (Radnor; USA)
Reichert-Jung Ultracut-S Ultramicrotom	Leica Microsystems (Wetzlar; Deutschland)

Tabelle 3.7: Verwendete Software

<u>Software</u>	<u>Hersteller</u>
AxioVision Mikroskop 4.8.2	Carl Zeiss Microscopy (Jena; Deutschland)
BD FACSDiva™ Software 8.02	BD (Franklin Lakes; USA)
CFX Maestro	Bio-Rad (Hercules; USA)
FCAP Array Software v3.0	BD (Franklin Lakes; USA)
ImageJ-win64	Wayne Rasband (NIH; USA)
Leica LAS AF	Leica Microsystems (Wetzlar; Deutschland)
Office 2016	Microsoft (Redmond; USA)
Prism 7.04	Graphpad (La Jolla; USA)

3.1.6. Verbrauchsmaterialien

Die Verbrauchsmaterialien, die innerhalb des Anfertigens dieser Arbeit benötigt wurde, sind in Tabelle 3.8 aufgelistet.

Tabelle 3.8: Verwendete Verbrauchsmaterialien

<u>Material</u>	<u>Hersteller</u>
Amersham® Nitrozellulosemembran	Cytiva (Marlborough; USA)
Amicon® Ultra Centrifuge Filter 100K	Merck (Darmstadt; Deutschland)
Amicon® Ultra Centrifuge Filter 30K	Merck (Darmstadt; Deutschland)
Aspirationspipette 2 ml	Corning (Corning; USA)
Blutagarplatte	Thermo Fisher Scientific (Waltham; USA)
Cellstar® Tube Reaktionsgefäß 15 ml	Greiner Bio-one (Kremsmünster; Österreich)
Cellstar® Tube Reaktionsgefäß 50 ml	Greiner Bio-one (Kremsmünster; Österreich)
Cellstar® 24 Well Kulturplatte	Greiner Bio-one (Kremsmünster; Österreich)
Cellstar® Zellkultur Schale, 100x20 mm	Greiner Bio-one (Kremsmünster; Österreich)
Corning® Costar® 96 Well Mikrotiterplatte, flat bottom	Corning (Corning; USA)
Corning® Falcon® 5 mL Rundboden-Polystyrolröhrchen	Corning (Corning; USA)
Deckgläser 15x15 mm	Carl Roth (Karlsruhe; Deutschland)
DirectLoad™ Wide Range DNA Marker	Sigma Aldrich (Taufkirchen; Deutschland)
Feather® Einwegskalpell	Feather Safety Razor (Osaka; Japan)
Flacheinbettungsform Pelco	Plano GmbH (Wetzlar; Deutschland)
Haftplatten für Netzchen Pelco	Plano GmbH (Wetzlar; Deutschland)
Hard-Shell PCR Plates, 96 Well	Bio-Rad (Hercules; USA)
Injekt® Solo 20 mL Einmalspritze	B. Braun SE (Melsungen; Deutschland)
Kassette m. ID-Nr für Netzchen/ Grids	Plano GmbH (Wetzlar; Deutschland)
Kupfernetzchen, 200 mesh, hexagonal	Plano GmbH (Wetzlar; Deutschland)
Leica® Immersionsöl	Leica Microsystems (Wetzlar; Deutschland)
Messküvetten Tischphotometer Sarsted	Sarstedt (Nümbrecht; Deutschland)
Microseal 'B' PCR Plate Sealing Film	Bio-Rad (Hercules; USA)
Mikroreaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt (Nümbrecht; Deutschland)
Mikro-Schraubröhre 2 ml	Sarstedt (Nümbrecht; Deutschland)

Multiply Pro Gefäß 0,2 ml	Sarstedt (Nümbrecht; Deutschland)
Objektträger Kanten geschnitten, Mit Mattrand	Carl Roth (Karlsruhe; Deutschland)
Pro-Lab Diagnostics® Microbank® KonServierungssystem für Bakterien und Pilze	Thermo Fisher Scientific (Waltham; USA)
Stabpipette Costar® Stripette 10 ml	Corning (Corning; USA)
Stabpipette Costar® Stripette 25 ml	Corning (Corning; USA)
Stabpipette Costar® Stripette 5 ml	Corning (Corning; USA)
Whatman® Puradisc Spritzenvorsatzfilter, Porengröße 0,2 µm	Sigma Aldrich (Taufkirchen; Deutschland)
TC-Platte 6 Well	Sarstedt (Nümbrecht; Deutschland)
TC-Platte 12 Well	Sarstedt (Nümbrecht; Deutschland)
TC-Inserts 12 Well PET 0,4µm	Sarstedt (Nümbrecht; Deutschland)
TC-Platte 96 Well	Sarstedt (Nümbrecht; Deutschland)
TipOne® Pipettenspitzen 1 ml	Starlab (Hamburg; Deutschland)
TipOne® Pipettenspitzen 10 µl	Starlab (Hamburg; Deutschland)
TipOne® Pipettenspitzen 20 µl	Starlab (Hamburg; Deutschland)
TipOne® Pipettenspitzen 200 µl	Starlab (Hamburg; Deutschland)
Zellkulturflasche 250 ml, 75 cm ² , Filterverschluss	Greiner Bio-one (Kremsmünster; Österreich)
Zellkulturflasche 50 ml, 25 cm ² , Filterverschluss	Greiner Bio-one (Kremsmünster; Österreich)
Zellkulturflasche 550 ml, 175 cm ² , Filterverschluss	Greiner Bio-one (Kremsmünster; Österreich)
Zellschaber, Falcon®	Corning (Corning; USA)

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkultur

Alle Arbeitsschritte wurden unter einer Sterilwerkbank mit sterilen Medien, Lösungen und Materialien durchgeführt. Soweit nicht anders angegeben, erfolgten alle Inkubationsschritte im Brutschrank bei 37 °C / 5 % CO₂.

3.2.1.1. Immortalisierte Zelllinien

Die aus einem Adenokarzinom der Lunge stammenden adhärenenten A549-Zellen wurden im Nährmedium RPMI 1640 Medium mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum (FKS) kultiviert. Die Kultivierung der ebenfalls adhärenenten und aus einem Zervixkarzinom stammenden HeLa Ohio Zellen erfolgte im Nährmedium DMEM + 10 % FKS (v/v). Alle Nährmedien wurden bei 4 °C gelagert und vor Benutzung auf Raumtemperatur (RT) erwärmt. Die Kultivierung der Zellstämme erfolgte ohne Antibiotikazusatz in Zellkulturflaschen von 75 cm² oder 175 cm².

3.2.1.1.1. Auftauen von immortalisierten Zellen

Alle Zellstämme wurden als 1 mL Portionen in 1,5 mL-Schraubröhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert. Um Zellen in Kultur zu nehmen, wurde die Zellsuspension bei RT aufgetaut und anschließend in eine 75 cm² Zellkulturflasche mit 10 mL des jeweiligen Nährmediums überführt. Nachdem sich die Zellen am Boden der Kulturflasche angeheftet hatten, wurde das Medium gegen frisches Nährmedium ausgetauscht, um das im Einfriermedium enthaltene zelltoxische DMSO vollständig zu entfernen. Anschließend wurde das Nährmedium alle zwei Tage ausgetauscht, bis der Zellrasen eine Konfluenz von circa 80-90 % erreichte.

3.2.1.1.2. Passagieren von immortalisierten Zellen

Zum Passagieren der Zellen wurde zunächst das Medium entfernt und die Zellen mit 5 mL PBS gewaschen. Anschließend wurden 0,05 % Trypsin und 0,02 % EDTA (v/v) zugegeben, damit sich die Zellen von der Zellkulturflasche ablösen (bei 75 cm² Zellkulturflaschen 3 mL Trypsin, bei 175 cm² Zellkulturflaschen 5 mL Trypsin/EDTA). Nach dem Ablösen der Zellen vom Flaschenboden wurde die Zellsuspension auf mehrere 75 cm² Zellkulturflaschen mit 10 mL Nährmedium oder 175 cm² Zellkulturflaschen mit 20 mL Nährmedium verteilt.

3.2.1.1.3. Einfrieren von immortalisierten Zellen

Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu wurden die Zellen zuerst mit PBS gewaschen und anschließend mit Hilfe von Trypsin abgelöst. Die trypsinisierten Zellen wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 380 g für 7 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen und das Pellet in gekühltem Einfriermedium (Ansatz siehe unten) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde dann in Portionen von 1 mL mit einer Zellzahl von je 2×10^5 Zellen auf vorgekühlte 1,5 mL-Schraubröhrchen verteilt. Über Nacht wurden die Schraubröhrchen in einem Mr.Frosty™ Behälter in einem -80 °C Gefrierschrank gelagert, um eine kontrollierte Abkühlungsrate von 1 °C/Minute zu erreichen. Nach dem Einfrieren der Zellen wurden die Schraubröhrchen am nächsten Tag zur dauerhaften Lagerung in einen Kryokanister mit flüssigem Stickstoff überführt.

Einfriermedium:

Nährmedium	50 % (v/v)
FKS	40 % (v/v)
DMSO	10 % (v/v)

3.2.1.2. Primäre bronchiale Epithelzellen

3.2.1.2.1. Beschichtung von Zellkulturflaschen und *Tissue Culture*-Inserts

Für eine verbesserte Zelladhäsion wurden die verwendeten Zellkulturflaschen und *Tissue Culture* (TC)-Inserts (folgend Inserts genannt) mit einer steril-filtrierte Beschichtungslösung (Ansatz siehe unten) beschichtet. Dazu wurde die Lösung auf den Boden der Zellkulturflaschen beziehungsweise auf die apikale Seite der Inserts gegeben. Nach einer Inkubation von mindestens 2 h, aber maximal über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂, wurde die Lösung vollständig abgenommen. Die Flaschen und Inserts wurden dann entweder direkt verwendet oder bei 4 °C in einer luftundurchlässigen Verpackung für maximal 5 Tage bis zur Verwendung gelagert.

Beschichtungslösung:

Fibronectin 1 mg/mL	1 % (v/v)
Kollagen PureCol 3 mg/mL	1 % (v/v)
BSA 10 mg/mL	0,1 % (v/v)
PBS	97,9 % (v/v)

3.2.1.2.2. Isolation und Anzucht von primären bronchialen Epithelzellen

Lungengewebe für die Isolation primärer bronchialer Epithelzellen (*Primary Bronchial Epithelial Cells*; pBECs) wurde von der Lungengewebebank des Instituts für Pathologie der Medizinischen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt. Dabei lag ein positives Ethikvotum der Ethikkommission der Medizinischen Hochschule Hannover (Nr. 2700-2015: Charakterisierung von Zytokinprofilen und Wirtsreaktion in akuten und chronischen Infektionen der Lunge) sowie der Philipps-Universität Marburg vor (AZ: 176/19: Präklinische Entwicklung einer Formulierung von Interferon Typ I und Typ III zur Prävention viraler Infektionen bei chronischen Lungenerkrankungen, Schreiben vom 13.12.2019). Das Gewebe wurde im Rahmen von Lungentransplantationen explantiert und im Institut für Pathologie der Medizinischen Hochschule Hannover aufgearbeitet. Einzelne Bronchialringe wurden gekühlt in RPMI mit 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S; v/v) nach Frankfurt transportiert und die Zellen 24 h bis 48 h nach Explantation isoliert. Dazu wurden die Bronchialringe in eine Zellkulturschale mit 20 mL antibiotikahaltiger Spüllösung (PBS+, Ansatz siehe Seite 38) gegeben. Überschüssiges Gewebe wurde entfernt und der Bronchialring mit PBS+ gespült, bevor ein Aufschneiden des Rings erfolgte. Der geöffnete Ring wurde in 10 mL Protease XIV-Lösung (Ansatz siehe Seite 38) überführt und 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde der Bronchialring wieder in frisches PBS+ gegeben und die Innenseite des Rings vorsichtig mit einer geschlossenen, stumpfen Präparier-Schere abgeschabt um die Zellen zu lösen. Die Zellen wurden dann mit der Spüllösung in ein Zentrifugenröhrchen transferiert. Anschließend wurde die Zellkulturschale

noch zweimal mit PBS+ gewaschen und die gepoolten Spüllösungen bei 380 g für 5 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 10 mL PBS+ aufgenommen und wie zuvor zentrifugiert. Das gewaschene Pellet wurde in 12 mL KFSM *Complete* Medium (Ansatz siehe unten) aufgenommen, in eine vorbeschichtete 75 cm² Zellkulturflasche überführt und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Alle 2-3 Tage wurde das alte Medium abgenommen, die Zellen wurden mit 10 mL PBS+ gewaschen und frisches KFSM *Complete* Medium wurde zugegeben. Die Zellen erreichten nach 7-10 Tagen Konfluenz und wurden nachfolgend zur späteren Verwendung eingefroren (siehe Kapitel 3.2.1.2.4.).

PBS+ (500 mL):

PBS	98,8 % (v/v)
MycoZap	0,002 % (v/v)
P/S	0,01 % (v/v)

Protease XIV

1,82 mg/mL in PBS

KFSM *Complete*:

<i>Antibiotic/Antimycotic</i>	1 % (v/v)
BPE	0,0025 % (w/v)
Chloramphenicol 50 mg/mL	0,01 % (v/v)
EGF	0,02 % (w/v)
Gentamicin	0,2 % (v/v)
Isoproterenol	0,1 % (w/v)
MycoZap	0,2 % (v/v)
Tobramycin 50 mg/mL	0,2 % (v/v)
Vancomycin 100 mg/mL	0,1 % (v/v)
KFSM	98,16 % (v/v)

3.2.1.2.3. Ablösen von primären bronchialen Epithelzellen

Um die primären Zellen von der Zellkulturflasche zu lösen, wurde der Zellrasen zunächst mit 10 mL PBS gewaschen und anschließend wurden 3 mL Trypsin hinzugegeben. Nachdem sich die Zellen gelöst hatten, wurde das Trypsin durch Zugabe von 6 mL *Soybean Trypsin Inhibitor* (SBTI) neutralisiert. Die Zellsuspension wurde bei 380 g für 7 min bei RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 3 mL frischem KFSM *Complete* Medium aufgenommen. Im Anschluss wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt (je 4 Kammern mit 0,1 mm³ Volumen).

3.2.1.2.4. Einfrieren von primären bronchialen Epithelzellen

Zur Lagerung der pBECs in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen nach dem Zählen zunächst erneut bei 380 g für 7 min und RT zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes, wurden die Zellen in pBEC-Einfriermedium (Ansatz siehe Seite 39) aufgenommen. Hierbei wurde die Zellkonzentration auf $1,7 \times 10^5$ Zellen/mL eingestellt. Die Zellsuspension wurde dann in 1,5 mL-

Schraubröhrchen aliquotiert (1 mL Zellsuspension/Schraubröhrchen), in einem Mr.Frosty™ Gefrierbehälter -80 °C über Nacht eingefroren und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

pBEC-Einfriermedium:

<i>Bovine Pituitary Extract</i>	30 % (w/v)
DMSO	10 % (v/v)
Keratinocyte-SFM	60 % (v/v)

3.2.1.2.5. Charakterisierung von primären bronchialen Epithelzellen mittels Immunfluoreszenz

Die Charakterisierung der isolierten pBECs erfolgte durch Immunfluoreszenz-Färbung mit unterschiedlichen Antikörpern. Hierzu wurden 60 µL Zellsuspension (beschrieben in Kapitel 3.2.1.2.3) in 6 mL KFSM *Complete* aufgenommen. Jeweils 500 µL dieser Verdünnung wurden zur Inkubation und Kultivierung auf vorbeschichtete 15 mm-Deckgläser in einer 24-Well Platte gegeben. Nachdem die Zellen eine Konfluenz von circa 50 % erreicht hatten, wurde das Medium abgenommen. Nach diesem und jedem weiteren Schritt folgten drei Waschschrte mit je 1 mL PBS. Die Zellen wurden dann in je 1 mL 4 % Formaldehyd (w/v) für 15 min bei RT fixiert und anschließend mit 1 mL 0,1 % Triton X-100 (v/v) für 15 min bei RT permeabilisiert. Direkt im Anschluss erfolgte das Auftragen des Primärantikörpers, verdünnt in 1 % BSA (w/v) in PBS und dessen Inkubation über Nacht bei 4 °C. Die einstündige Inkubation mit dem passenden Sekundärantikörper, verdünnt in 1 % BSA (w/v) in PBS, bei RT schloss sich daran an. Am Ende wurden die Deckgläser mit dem Eindeckmedium ProLong™ Diamond Eindeckmittel mit DAPI auf Objektträgern fixiert. Nach Aushärtung bei RT über Nacht konnten die gefärbten Zellen unter dem Fluoreszenz Mikroskop begutachtet werden.

Für jede Charakterisierung wurden auf verschiedenen Präparaten die folgenden Marker angefärbt:

<u>Primärantikörper</u>	<u>Sekundärantikörper</u>	<u>Marker für</u>
<i>Rabbit-anti-p63</i> (1:1000)	Alexa555 (rot) <i>Goat-anti-Rabbit</i> (1:1000)	Basale Zellen
<i>Rabbit-anti-Cy5</i> (1:1000)	Alexa555 (rot) <i>Goat-anti-Rabbit</i> (1:1000)	Epithelzellen
<i>Mouse- anti-Fibroblasten- Antikörper, Klon TE-7</i> (1:500)	Alexa488 (grün) <i>Goat-anti-Mouse</i> (1:1000)	Mesenchymale Zellen

Durch Färbung mit anti-p63 wurde gezeigt, dass es sich bei den isolierten Zellen um basale Zellen handelte und mit Cytokeratin 5 wurde sichergestellt, dass die Zellen epithelialen Ursprungs waren. Um eine Kontamination mit Fibroblasten auszuschließen, wurde zusätzlich ein Präparat mit TE-7 gefärbt. Das im Eindeckmedium enthaltene 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) wurde zur Kernfärbung genutzt.

3.2.1.2.6. Kultivierung und Differenzierung von primären bronchialen Epithelzellen

Zur Kultivierung der pBECs wurde zuerst ein eingefrorenes Schraubröhrchen Zellsuspension (siehe Kapitel 3.2.1.2.4.) aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in eine beschichtete 25 cm² Zellkulturflasche mit 5 mL PneumaCultEx *Complete* Medium (Ansatz siehe Seite 41) überführt und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nachdem sich die Zellen am Boden der Kulturflasche abgesetzt hatten, wurde das Medium abgenommen und gegen frisches PneumaCultEx *complete* Medium ersetzt. Das Medium wurde alle 2 bis 3 Tage ausgetauscht, bis die Zellen nach circa 3-5 Tagen eine Konfluenz von circa 80 % erreicht hatten und passagiert werden konnten. Wie in Kapitel 3.2.1.2.3. beschrieben, wurden die Zellen vom Flaschenboden gelöst und die Zellsuspension zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 mL PneumaCultEx *Complete* Medium aufgenommen und die Zellsuspension wurde in eine 75 cm² Zellkulturflasche überführt. An jedem zweiten bis dritten Tag wurde das Medium ausgetauscht, bis erneut eine Konfluenz von circa 80 % erreicht wurde. Danach konnten die Zellen in beschichtete TC-Inserts in 12-Well Platten ausgesät werden. Auch hierzu erfolgte wie zuvor beschrieben die Ablösung der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche. Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet in 3 mL PneumaCultEx *Complete* Medium aufgenommen und die Zellen wurden in einer Neubauer Zählkammer gezählt. In jedes Insert wurden apikal 4×10^4 Zellen in 500 µL PneumaCultEx *Complete* Medium gegeben. Basal wurden 1,5 mL PneumaCultEx *Complete* Medium ohne Zellen hinzugefügt. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank. Alle 2 bis 3 Tage wurde das Medium auf der apikalen und basalen Seite der Inserts gewechselt. Mit dem Erreichen der 100%-igen Konfluenz (nach circa 5-10 Tagen) wurde das basale Medium gegen 1 mL antibiotikahaltiges PneumaCultALI *Complete+* (Ansatz siehe Seite 41) ausgetauscht. Anschließend wurde das apikale Medium entfernt, sodass die Zellen nun Luft-exponiert waren (*Air-liquid Interface*-Kultur; ALI). Das basale Medium wurde alle 2 bis 3 Tage gewechselt, gleichzeitig wurden die Zellen im apikalen Bereich des Inserts dreimal mit je 500 µL PBS gewaschen. Die Differenzierung wurde mit einem Lichtmikroskop geprüft. Nach circa 2 bis 3 Wochen konnten die ersten Zilienbewegungen an zilientragenden Zellen beobachtet werden. Nach circa 4 bis 6 Wochen war die Differenzierung der pBECs in ALI-Kultur, erkennbar an einer flächigen Zilienbewegung im ganzen Insert, unter diesen Bedingungen abgeschlossen (siehe Abbildung 3.1).

PneumaCultEx Complete Medium:

Hydrocortison Stock Lösung	0,1 % (v/v)
PneumaCultEx 50x Supplement	2 % (v/v)
PneumaCultEx basal Medium	97,9 % (v/v)

PneumaCultALI Complete+

Hydrocortison Stock Lösung	0,5 % (v/v)
Heparin Lösung	0,2 % (v/v)
PneumaCultALI 10x Supplement	10 % (v/v)
PneumaCultALI 100x Maintenance Supplement	1 % (v/v)
MycoZap	0,2 % (v/v)
Antibiotic/Antimycotic	1 % (v/v)
PneumaCultALI Basal Medium	87,1 % (v/v)

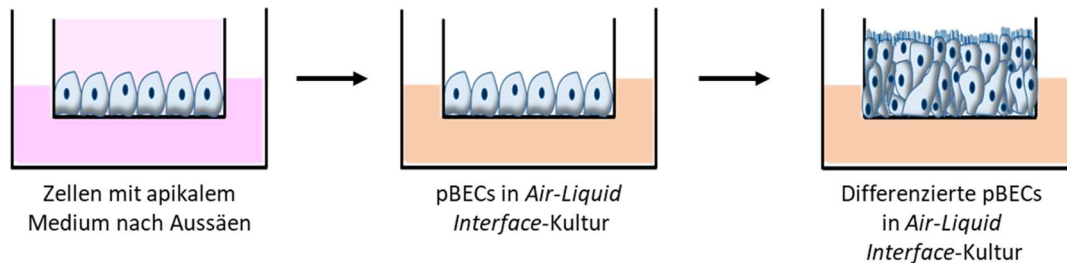


Abbildung 3.1: Differenzierungsprozess primärer bronchialer Epithelzellen in *Air-Liquid Interface*-Kultur

3.2.1.2.7. Messung des transepithelialen Widerstands

Zur quantitativen Bestimmung des interzellulären Zusammenhalts der pBECs in ALI-Kultur wurde der transepitheliale elektrische Widerstand (*Transepithelial Electrical Resistance; TEER*) gemessen. Die Messung wurde während des Differenzierungsprozesses der pBECs einmal pro Woche durchgeführt, zeitgleich mit dem Mediumwechsel und der apikalen Waschungen.

Nach dreimaligem apikalem Waschen mit PBS wurden hierzu 500 μ L PBS apikal auf die Zellen gegeben. Das basale Medium wurde durch 1 mL PBS ersetzt. Während der Waschschrte wurde die Elektrode des TEER-Messgeräts für 10 min in 80 % Ethanol (v/v) desinfiziert und anschließend in PBS gewaschen, um restliches Ethanol wieder zu entfernen. Zuerst wurde ein Leerwert (R_{Leerwert}) eines Inserts ohne Zellen bestimmt. Die Elektrode wurde dazu so platziert, dass die längere Seite der Elektrode außerhalb des Inserts lag und die kürzere Seite innerhalb des Inserts, knapp oberhalb der TC-Insert Membran. Anschließend wurde der TEER der *Air-Liquid Interface*-Kulturen bestimmt (R_{Insert}).

Zur Berechnung des korrigierten Widerstandes, der die Oberfläche der Inserts (A_{Insert}) berücksichtigt, wurde folgende Formel benutzt: $(R_{\text{Insert}} - R_{\text{Leerwert}}) \times A_{\text{Insert}}$

3.2.1.2.8. FITC-Dextran-Assay

Neben der TEER-Messung wurde als weiterer Indikator für die Barrierefunktion der ALI-Kulturen die Permeabilität der Zellschicht für FITC-markiertes Dextran (3-5 kDa) bestimmt. Dextran ist ein Anhydroglukose-Polymer, der mit FITC, einem fluoreszierenden Farbstoff, gekoppelt ist. FITC-Dextran ist in der Lage, parazellulär vom apikalen in das basale Kompartiment eines TC-Inserts zu gelangen. Hierbei ist die Menge an FITC-Dextran im basalen Kompartiment proportional zu der Permeabilität der Zellschicht.

Zur Durchführung des Assays wurden die ALI-Kulturen zunächst zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 100 µL einer 5 mg/mL FITC-Dextran-Lösung apikal zugegeben. Um die maximale FITC-Dextran Menge zu messen, welche vom apikalen in das basale Kompartiment des TC-Inserts gelangen kann, wurde FITC-Dextran zusätzlich in ein zellfreies Insert gegeben. Nach einer Inkubation von 1 h bei 37 °C (oder 33 °C nach Virus-Infektion), wurden aus dem basalen Kompartiment 120 µL entnommen und bis zur Messung bei 4 °C in einem lichtundurchlässigen Reaktionsgefäß aufbewahrt. Zur Analyse wurden je 100 µL des entnommenen Mediums in eine lichtundurchlässige 96-Well-Platte überführt. Zur Messung des Leerwertes wurde frisches basales Medium verwendet. Die Platte wurde dann am Plattenlesegerät (EnVision Multimode Plate Reader) bei 490/520 nm ausgelesen.

3.2.1.2.9. *Dot-Blot* zur Verifizierung der Mukusbildung

Die Mukusproduktion der mukusbildenden Becherzellen wurde durch den Nachweis des Glykoproteins Mucin5AC mittels *Dot-Blot* gezeigt. Nachdem die pBECs in ALI gebracht wurden, wurden die Inserts an Tag 3, 7, 10, 14, 21 und 28 jeweils vor dem normalen Waschen mit je 100 µL PBS gespült. Die abgenommene Spüllösung wurde bei -20 °C gelagert. Nachdem alle Proben vollständig waren, wurden je 10 µL der wieder aufgetauten Spüllösungen auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen. Nach 15 min Trocknung bei RT wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Membran für 1 h bei RT mit 3 % BSA in TBS-T (Ansatz siehe Seite 43) blockiert. Direkt im Anschluss folgte, unter ständigem Schütteln, eine einstündige Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper *Mouse-anti-Mucin5AC* (1:250 in TBS-T). Die Membran wurde dann dreimal für je 5 min mit TBS-T gewaschen, bevor sie mit einem HRP-markierten Sekundärantikörper (*Goat-anti-Mouse*; 1:5000 in TBS-T) für 1 h bei RT und unter ständigem Schütteln inkubiert wurde. Danach wurde die Membran erneut dreimal mit TBS-T gewaschen und anschließend entwickelt. Dazu wurde das PBS von der Membran entfernt und die Membran für circa 1 min mit ECL-Detektionsreagenz inkubiert. Detektiert und dokumentiert wurde das Ergebnis im Dokumentationssystem Fusion Fx.

TBS-T

Tris/HCl pH 7,5	100 mM
NaCl	150 mM
Tween20	0,1 % (v/v)

3.2.2. Viren3.2.2.1. Herstellung und Aufkonzentrierung eines Pools HRV

Zur Anzucht von HRV16 und der Herstellung eines neuen Viruspools wurden zuerst HeLa Ohio-Zellen in 175 cm² Zellkulturflaschen ausgesät. Nachdem der Zellrasen eine Konfluenz von circa 80 % erreicht hatte, wurde das Nährmedium gegen DMEM + 2 % FKS ausgetauscht und die Zellen mit HRV16 infiziert. Dabei lag das Verhältnis der Viren zu den Zellen, die sogenannte Multiplizität der Infektion (*Multiplicity of Infection; MOI*), bei 0,1. Die Zellen wurden anschließend für 2 h bei 33 °C und 5 % CO₂ inkubiert, wonach das Medium und bis dahin nicht gebundene Viruspartikel verworfen wurden. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen bevor 15 mL frisches DMEM + 2 % FKS zugegeben wurden. Anschließend wurden die Zellen circa 3-5 Tage bei 33 °C und 5 % CO₂ inkubiert, bis 90-99 % der Zellen einen zytopathischen Effekt (*Cytopathic Effect; CPE*) aufwiesen. Die Zellen wurden dann mit Hilfe eines Zellschabers von den Böden der Zellkulturflaschen abgelöst. Die so entstandene Zellsuspension wurde bei 1800 g und RT für 10 min zentrifugiert. Der Überstand mit dem extrazellulären Virus wurde vom Pellet entfernt und bei RT zwischengelagert. Um auch intrazelluläre Viruspartikel in den bis dahin intakten Zellen zu gewinnen, wurde das Zellpellet in 2 mL DMEM + 2 % FKS aufgenommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um die Zellen aufzuschließen. Nach dem Auftauen wurde die Zellsuspension bei 1800 g und RT für 10 min zentrifugiert. Erneut wurde der virushaltige Überstand abgenommen und zu dem bereits erhaltenen Überstand aus dem vorherigen Schritt gegeben.

Zur Aufkonzentrierung und Aufreinigung des Viruspools wurden Amicon Ultra Centrifuge Filter (*Molecular Weight Cut-Off* 30 K) verwendet. Vor der Aufkonzentrierung wurden die Filter 30 min mit 80 % Ethanol desinfiziert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Die Filter wurden dann mit je 15 mL des Überstandes aus der Ernte beladen. Anschließend wurden die Filter bei 1800 g für 15 min bei RT zentrifugiert. Diese Schritte wurden so oft wiederholt, bis der gesamte Überstand der Ernte auf den Zentrifugenfilter geladen wurde und das Volumen auf circa 1,5 mL reduziert wurde. Der so entstandene, circa 10fach aufkonzentrierte Viruspool wurde dann aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.2.2.2. Bestimmung der *Tissue Culture Infectious Dose* (TCID₅₀)

Um die Infektionsdosis von HRV zu bestimmen wurde die *Tissue Culture Infectious Dose* 50 (TCID₅₀) bestimmt. Dazu wurden HeLa Ohio-Zellen in DMEM + 10 % FKS in 96-Well Platten ausgesät (je 2×10^4 Zellen in 100 μ L /Well). Die Zellen wurden für 24 h kultiviert und bei einer Konfluenz von 80 % infiziert. Hierfür wurden die zu testenden Überstände oder Viruspools in DMEM + 2 % FKS verdünnt (10^{-2} bis 10^{-10}). Pro Verdünnung wurden jeweils 8 Wells infiziert und bei 33 °C und 5 % CO₂ für 2 h inkubiert. Anschließend wurden die virushaltigen Verdünnungen von den Zellen entfernt und mit je 200 μ L frischem, virusfreiem DMEM + 2 % FKS ersetzt. Es folgte eine fünftägige Inkubation bei 33 °C und 5 % CO₂. Nach dieser Zeit wurden die Zellschichten mit einem Lichtmikroskop auf CPE geprüft. Waren die Zellen abgerundet oder vom Wellboden abgelöst, lag ein CPE vor. Das entsprechende Well wurde dann als positiv gewertet, ansonsten als negativ. Die Berechnung der TCID₅₀ erfolgte mit der Spearman-Kärber Formel (Ramakrishnan, 2016).

Für jeden neu hergestellten Viruspool wurde die TCID₅₀ in mindestens drei unabhängigen Versuchen bestimmt.

3.2.2.3. Virale Infektion von Zellen

Zu Infektion immortalisierter Zelllinien in einer 24-Well-Platte wurden die Viruspools in 400 μ L RPMI + 2 % FKS (v/v) pro Well verdünnt, um eine MOI von 1 zu erzielen und anschließend auf die Zellschicht gegeben. Zur Infektion von ALI-Kulturen wurden die Zellen vor Zugabe von HRV dreimalig apikal mit PBS gewaschen und das basale Medium wurde gewechselt. Die Zellen wurden anschließend apikal mit 100 μ L in PBS verdünntem HRV infiziert. Es erfolgte sowohl bei den immortalisierten Zellen als auch bei den ALI-Kulturen eine Inkubation für 2 h bei 33 °C und 5 % CO₂, bevor das virushaltige Medium wieder entfernt und die Zellen, je nach Versuch, für 2 h bis 72 h weiter bei 33 °C und 5 % CO₂ inkubiert wurden.

Die Stimulation der Zellen mit 50 μ g/mL des Immunstimulanz Poly(I:C) *High Molecular Weight* (HMW) erfolgte identisch wie die oben beschriebene HRV-Infektion.

3.2.3. Bakterien

3.2.3.1. Anzucht von Bakterien

Streptococcus pneumoniae (Danish Designation 19F) wurde auf Columbia-Blutagar mit Schafblut (im Folgenden Blutagarplatten genannt) angezüchtet. Dazu wurden die Blutagarplatten auf RT gebracht und der jeweilige Bakterienstamm, gelagert in Röhrchen mit Mikrobankkügelchen bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, wurde angetaut. Mit einer ausgeglühten Impföse erfolgte auf ein bis zwei Agarplatten ein Dreiösenausstrich mit je einem Mikrobankkügelchen pro Platte. Die Platten wurden dann über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $5\text{ }\%$ CO_2 inkubiert.

3.2.3.2. Lagerung von Bakterien

Zur Lagerung und für die spätere Vervielfältigung von Bakterien wurden zuerst Einzelkolonien der angezüchteten Bakterien (siehe Kapitel 3.2.3.1.) mit einer ausgeglühten Impföse in ein Pro-Lab Diagnostics™ Microbank™ KonServierungssystem für Bakterien und Pilze (anschließend Röhrchen mit Mikrobankkügelchen genannt) überführt. Nach vorsichtigem Schütteln wurde das Röhrchen 2 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit in dem Röhrchen abgenommen und verworfen, bevor das Röhrchen bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurde.

3.2.3.3. Einstellung der Bakterienkonzentration

Für die Reproduzierbarkeit der MOI in den Experimenten musste die Anzahl der Bakterien bekannt sein. Dazu wurde für jedes Experiment anhand einer Bakterienlösung des jeweiligen Stammes die Bakterienkonzentration mit einer festgelegten optischen Dichte (OD_{600}) bestimmt. Von den angezüchteten Bakterien (siehe Kapitel 3.2.3.1.) eines Stammes wurden mit einer ausgeglühten Impföse mehrere Abstriche der Bakterienkultur in 10 mL steriles PBS überführt. Die Suspension wurde gemischt und bei 5000 g für 10 min und bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 2 mL sterilem PBS aufgenommen. Zur Bestimmung der OD_{600} wurde ein Tischphotometer benutzt. Vor der Messung von $500\text{ }\mu\text{L}$ der jeweiligen Bakteriensuspension wurde ein Leerwert mit PBS bestimmt, der dann von allen gemessenen Proben subtrahiert wurde. Je nach Messwert wurde die initiale Bakteriensuspension soweit mit PBS weiter verdünnt und repetitiv im Photometer gemessen, bis die $\text{OD}_{600} = 1,3$ war

Zur Bestimmung der Bakterienkonzentration wurde die auf $\text{OD}_{600} = 1,3$ eingestellte Bakteriensuspension $1:10^5$ verdünnt und $100\text{ }\mu\text{L}$ dieser Lösung mit Hilfe eines abgeflamten Drigalskispatels auf Blutagarplatten ausplattiert. Die Platten wurden bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $5\text{ }\%$ CO_2 über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Auszählung der Einzelkolonien und damit die Berechnung der *Colony Forming Units* (CFU)/mL.

3.2.3.4. Bakterielle Infektion von primären bronchialen Epithelzellen

Vor einer bakteriellen Infektion wurden die ALI-Kulturen sieben Tage mit antibiotikafreiem basalem Medium kultiviert. Am Tag der Infektion erfolgte ein basaler Mediumwechsel sowie eine zweifache apikale Waschung der pBECs in ALI-Kultur mit PBS. Für die bakterielle Infektion mit *S. pneumoniae*, wurden die Bakterien wie beschrieben auf Blutagarplatten ausgestrichen (siehe Kapitel 3.2.3.1.), über Nacht inkubiert und am nächsten Tag die OD auf $OD_{600} = 1,3$ eingestellt (siehe Kapitel 3.2.3.3.). Die Zellen wurden dann mit je 300 μL bakterienhaltigem PBS (Verdünnung je nach MOI) apikal infiziert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO_2 für 8 h. Anschließend wurden die Zellen fixiert oder für weitere Versuche lysiert.

3.2.4. Analysen zur Zellviabilität

Zur Untersuchung der Toxizität von verschiedenen Bedingungen, Behandlungen oder Stimuli kamen zwei unterschiedliche kolorimetrische Anwendungen zum Einsatz.

3.2.4.1. MTT-Assay

Nach der Inkubation der Zellen mit unterschiedlichen Proteinen wurde die metabolische Aktivität von Zellen kolorimetrisch mittels MTT-Assay bestimmt. Bei diesem Assay wird das gelbe MTT ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazoliumbromid) von Mitochondrien in lebenden Zellen zu violetter Formazan reduziert. Je mehr lebende, metabolisch aktive Zellen vorhanden sind, desto mehr Formazan wird gebildet, sodass dadurch eine quantitative Bestimmung der Zellvitalität möglich ist.

Für einen MTT-Assay wurden zuerst in 96-Well Platten $0,5 \times 10^5$ A549-Zellen pro Well in je 100 μL RPMI + 10 % FKS ausgesät. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert, bis die Zellschichten konfluent waren. Dem Versuchsansatz entsprechend wurden die Zellen stimuliert und für 24 h bis 48 h erneut bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Zusätzlich wurden bei jedem MTT-Assay unbehandelte Kontrollzellen mitgeführt. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit je 100 μL PBS gewaschen. Anschließend wurden je 100 μL einer 1:6-Verdünnung des sterilfiltrierten MTT-Reagenzes (5mg/ml in PBS) auf die Zellen gegeben. Bei 37 °C und 5 % CO_2 erfolgte daraufhin eine zweistündige Inkubation. Direkt danach wurde das MTT-Reagenz abgenommen und die Zellen bei RT getrocknet. Je 100 μL der MTT-Entfärbelösung (Ansatz siehe Seite 47) wurden auf die Zellen und zusätzlich zur Leerwert-Bestimmung in leere Wells gegeben. Danach inkubierten die Platten im Dunkeln für 20 min und RT auf einem Schüttler und wurden anschließend bei 570 nm am EnVision Multimode Plate Reader ausgewertet.

Alle Messungen erfolgten in Triplikaten. Für die Auswertung in Excel wurde der Mittelwert der Messwerte, abzüglich des Leerwertes, verwendet ($OD_{\text{korrigiert}}$). Die unbehandelten Kontrollzellen fungierten für jeden MTT als 100 % der Zellviabilität.

Die Zellviabilität der behandelten Zellen wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{Zellviabilität [\%]} = \left[\frac{OD_{\text{korrigiert. behandelte Zellen}}}{OD_{\text{korrigiert. unbehandelte Zellen}}} \right] \times 100 \%$$

Eine Reduktion der Zellviabilität um $\geq 20 \%$ wurde als zytotoxische Wirkung angesehen.

MTT-Entfärbelösung

SDS	10 % (w/v)
Essigsäure	0,6 % (v/v)
DMSO	89,4 % (v/v)

3.2.4.2. LDH-Assay

Für eine Bestimmung der Zellviabilität aus dem Zellüberstand/apikalen Überstand, wurde ein Lactatdehydrogenase (LDH)-Assay (CyQUANT™ LDH *Cytotoxicity Assay*) verwendet. LDH ist ein Enzym, welches in vielen Zelltypen vorkommt. Bei Beschädigungen der zellulären Plasmamembran wird LDH freigesetzt und in das Nährmedium/apikalen Überstand abgegeben. Das freigesetzte, extrazelluläre LDH kann dann kolorimetrisch quantifiziert werden. LDH katalysiert über eine NAD⁺-Reduktion in NADH die Umwandlung von Lactat in Pyruvat. Die Reduktion eines zugesetzten Tetrazoliumsals (INT) durch Diaphorase zusammen mit NADH lässt dann ein rotes Formazan-Produkt entstehen, das bei 485 nm quantifiziert werden kann. Dabei ist die Menge an Formazan proportional zur Menge an freigesetztem LDH und damit auch zur Anzahl an geschädigten Zellen.

Zur Durchführung eines LDH-Assays wurden zunächst 50 µL aus Zellüberständen oder apikalen Überständen in Duplikaten in eine leere 96-Well-Platte überführt. Zur Leerwert-Bestimmung wurde Nährmedium oder PBS in zwei Wells der 96-Well-Platte gegeben. Anschließend wurden in jedem Well 50 µL der CyQUANT™LDH *Cytotoxicity Assay Kit Reaction Mixture* (angeseht gemäß Herstellerangaben) mit der darin enthaltenen Probe gemischt. Unter Lichtausschluss erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei RT. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µL der Stopplösung beendet und die Absorption der Proben bei 485 nm mit dem EnVision Multimode Plate Reader bestimmt.

Alle Messungen erfolgten in Duplikaten. Zur Auswertung wurde der Mittelwert der Messwerte, abzüglich des Leerwertes, verwendet.

3.2.5. Analyse und Modifikation von Nukleinsäuren

3.2.5.1. RNA-Isolation

RNA aus Zelllysaten wurde mit dem peqGOLD Gesamt-RNA-Kit nach Herstellerangaben isoliert. Die RNA wurde am Ende der RNA-Isolation jeweils in 50 µL RNase-freiem Wasser eluiert. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte anschließend durch das NanoDrop ND1000 Mikrovolumen-Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm. Dazu wurden 2 µL jeder Probe in die Messeinheit des Spektrometers gegeben und photometrisch bestimmt. Die isolierte RNA wurde bei -80 °C gelagert.

3.2.5.2. cDNA-Synthese

Zur Umschreibung viraler RNA und zellulärer mRNA in cDNA (*complementary DNA* / komplementäre DNA) wurde das *iScriptTM gDNA Clear cDNA Synthesis Kit* verwendet. Zuerst wurde genomische DNA (gDNA) mit Hilfe eines DNase-Verdau entfernt. Dazu wurden 2 µL *DNase Mastermix* zu zuvor isolierter RNA gegeben, die mit RNase-freiem Wasser so verdünnt wurde, dass in einem Volumen von 14 µL 200 ng RNA enthalten war. Im Thermozykler erfolgte dann bei 25 °C für 5 min ein DNase-Verdau, auf den eine 30-minütige DNase-Inaktivierung bei 75 °C folgte. Anschließend wurden 4 µL *iScript Reverse Transcription Supermix* hinzugegeben. Die in diesem Supermix enthaltene reverse Transkriptase schrieb die RNA in cDNA um. Für diese Synthese wurden zunächst bei 25 °C für 5 min Oligonukleotide als Startpunkte der reversen Transkription angelagert. Die reverse Transkription selbst erfolgte bei 46 °C für 20 min, direkt im Anschluss wurde bei 95 °C für 1 min die reverse Transkriptase inaktiviert. Zum Einsetzen der cDNA in eine quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion (*Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction*; qPCR), wurde die cDNA 1:5 in DNase-freiem Wasser verdünnt und bei -20 °C gelagert.

3.2.5.3. Quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion

Bei einer qPCR werden Nukleinsäureamplifikationen einer klassischen PCR mit der Detektion und Quantifizierung des Amplicons verbunden (Higuchi, Fockler, Dollinger, & Watson, 1993). Zur Durchführung der qPCR, wurden der eingesetzten 1:5 verdünnten cDNA, Primer zum Start der Amplifikation hinzugegeben (siehe Pipettierschema qPCR, Seite 49). Um Fluoreszenz zu erzeugen, wurden Sonden (*Probes*) zugesetzt. Diese Sonden enthalten ein Fluorophor und einen *Quencher* und hybridisieren, zwischen Vorwärts- und Rückwärtsprimer, an eine Nukleotidsequenz. Kommt es zur räumlichen Trennung von Fluorophor und *Quencher*, etwa durch den Abbau des 5'-Endes der Probe durch die 5'→3' Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase, kann Fluoreszenz gemessen werden. Werden Fluorophor und *Quencher* nicht voneinander getrennt, löscht der *Quencher* die Fluoreszenz und es kann dadurch zu keinem

Nachweis kommen.

Während der Amplifikation wird dann die Fluoreszenzintensität gemessen. Diese ist proportional zur Produktmenge, wodurch eine Quantifizierung der Ausgangs-DNA möglich ist. Die Durchführung der qPCRs erfolgte immer als Duplex-PCR des jeweiligen Zielgens mit GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase). Dieses Gen fungierte als konstitutiv exprimierte, interne Kontrolle (*Housekeeping Gene*). Alle qPCRs wurden in 96-Well-PCR-Platten pipettiert und nach einem kurzen Zentrifugieren der Platten in der Plattenzentrifuge im CFX Opus durchgeführt. In Tabelle 3.9 ist der Ablauf des qPCR-Programms aufgelistet. Die Schritte 2 und 3 wurden insgesamt 40-Mal wiederholt.

Pipettierschema qPCR (20 µL Ansatz):

cDNA	5 µL
SsoAdvanced Universal Probes Supermix	10 µL
Vorwärtsprimer (20 µM)	0,8 µL
Rückwärtsprimer (20 µM)	0,8 µL
Probe Amplicon (10 µM)	0,5 µL
Vorwärtsprimer GAPDH (10 µM)	0,5 µL
Rückwärtsprimer GAPDH (10 µM)	0,5 µL
Probe GAPDH (10 µM)	0,5 µL
H ₂ O	1,4 µL

Tabelle 3.9: Ablauf des qPCR-Programms unter Verwendung des SsoAdvanced Universal Probes Supermix

Schritt	Dauer	Temperatur [°C]	Cycles
1.Enzym-Aktivierung	2 min	95	1
2.Denaturierung	15 sec	95	40
3.Annealing/ Elongation/Aquire	1 min	60	

Für die Analysen wurden im CFX Opus *Cycle Threshold* (CT)-Werte gemessen, welche dem ersten Zyklus entsprachen, bei dem die gemessene Fluoreszenz einen bestimmten Schwellenwert überschritt. Damit waren die CT-Werte invers-proportional zur DNA-Menge.

Die Genexpressionen wurden durch relative Quantifizierung bestimmt. Die gemessenen CT-Werte wurden zuerst gegen GAPDH normalisiert (CT des Zielgens – CT GAPDH = ΔCT).

Das ΔCT der Kontrollbedingung wurde dann vom ΔCT der eigentlichen Bedingung subtrahiert ($\Delta CT(\text{Bedingung}) - \Delta CT(\text{Kontrolle}) = \Delta\Delta CT$). Aus der Formel $2^{-\Delta\Delta CT}$ ergab sich dann der *Fold Change*, der relative Expressionsunterschied des Gens gegenüber der Kontrollbedingung (Livak & Schmittgen, 2001).

Zur Quantifizierung der Rhinovirus-RNA wurde eine Standardkurve, bestehend aus synthetischen DNA-Fragmenten (sogenannte „gBlocks“) bekannter Konzentration genutzt.

3.2.6. Generierung einer stabilen Reporterzelllinie zur Quantifizierung der Typ I/III Interferon-Aktivität

Zur Untersuchung unterschiedlicher Interferone wurde eine stabile Reporter-Zelllinie kloniert. Dazu wurde in klassische A549-Zellen der Vektor pGL4.45[luc2P/ISRE/Hygro] transfiziert. Dieser Vektor enthält fünf Kopien des ISRE, sowie Luciferase (siehe Abbildung 3.2).

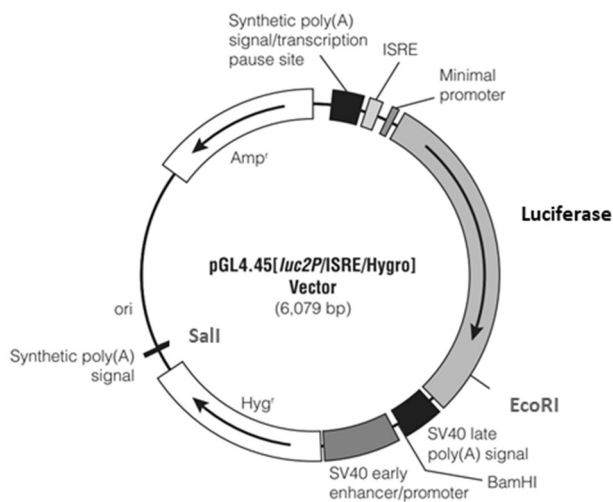


Abbildung 3.2: Vektorkarte pGL4.45[luc2P/ISRE/Hygro]

pGL4.45[luc2P/ISRE/Hygro]; Abbildung modifiziert nach Promega; Hyg = Hygromycin-Resistenz

3.2.6.1. Transformation in *E. coli*

Der Vektor pGL4.45[luc2P/ISRE/Hygro] wurde zuerst in kompetente *Escherichia coli*-Zellen transformiert. Dazu wurden 100 μL chemisch kompetente *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut. Zu den aufgetauten Zellen wurde 10 ng des Vektors in 1 μL Volumen gegeben. Der Ansatz wurde gemischt und dann für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte ein Hitzeschock bei 42 $^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad für 25 Sekunden. Die Zellen wurden erneut für 2 min auf Eis gelagert, bevor 90 μL S.O.C.-Medium hinzugegeben wurden. Es erfolgte dann, unter ständigem Schütteln, eine

Inkubation für 90 min bei 37 °C. Anschließend wurde der Ansatz 1:100 mit S.O.C.-Medium verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden 50 µL auf Ampicillin-haltigen LB-Agar-Platten (Ansatz siehe unten) ausplattiert, welche bei 37 °C über Nacht inkubierten.

Am nächsten Tag wurde mit Hilfe von sterilen Pipettenspitzen Einzelkolonien der Transformation von LB-Agar-Platten gepickt. Diese Spitzen wurden in jeweils einem Erlenmeyerkolben mit Ampicillin-haltigem LB-Medium (Ansatz siehe unten) überführt. Anschließend erfolgte die Inkubation schüttelnd bei 37 °C über Nacht.

LB-Agar-Platten

LB-Agar	3,5 % (w/v)
Destilliertes Wasser	96,4 % (v/v)
→ Autoklavierung	
Ampicillin	0,1 % (v/v)
→ Platten in sterile Petrischalen gießen	

LB-Medium

LB-Medium	2,5 % (w/v)
Destilliertes Wasser	97,4 % (w/v)
→ Autoklavierung	
Ampicillin	0,1 % (v/v)

3.2.6.2. Plasmidisolation aus *E. coli*

Plasmid DNA wurde aus 40 mL *E. coli*-Übernachtskultur mit dem XChange Plasmid Midi Kit, peqGOLD nach Herstellerangaben isoliert und in 40 µL DNase-freiem Wasser eluiert. Die Plasmid-DNA-Konzentration wurde im Anschluss mit dem NanoDrop ND1000 Mikrovolumen-Spektralphotometer gemessen. Die Plasmid-DNA wurde nach der Konzentrationsbestimmung bei -20 °C gelagert.

3.2.6.3. Überprüfung der Transformation

Zur Kontrolle der Transformation wurde die Plasmid-DNA zuerst durch Restriktionsenzyme an den korrespondierenden Enden geschnitten. Die Fragmentgrößen des gespaltenen Plasmids wurden dann mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Dabei wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 1 % und 0,2 % Ethidiumbromid genutzt. Als Längenstandard wurde der *DirectLoad™ Wide Range* DNA Marker eingesetzt. 1 µg der aufgereinigten Plasmid-DNA wurde jeweils parallel mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Sall für 1 h bei 37 °C verdaut und dann auf das 1 %-ige Agarosegel aufgetragen. Anschließend wurde eine Spannung von 100 V angelegt. Die DNA wandert dann, bedingt durch ihre negative Ladung, in Richtung der Anode. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde das Gel aus der Kammer genommen und mit Hilfe des Gel Doc™ CR+ Gel-Dokumentationssystem wurden die DNA-Fragmente sichtbar gemacht und elektronisch erfasst.

3.2.6.4. Transfektion von A549-Zellen

Die Transfektion von A549-Zellen mit dem aufgereinigten Vektor pGL4.45[luc2P/ISRE/Hygro] erfolgte mit Hilfe von Lipofectamin 3000.

Durch die Lipiduntereinheiten des Lipofectamin werden mit der Plasmid-DNA in wässriger Umgebung Liposome gebildet, sogenannte Transfektionskomplexe, die in der Lage sind die Zellmembran der Zielzellen zu überwinden.

Für eine Transfektion wurden 5×10^5 A549-Zellen je Well in einer 6-Well-Platte mit 2 mL RPMI + 10 % FKS ausgesät. Nach einer Übernacht-Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde das Nährmedium am nächsten Tag durch 2 mL OptiMEM ersetzt. Anschließend wurde der Transfektionsansatz in OptiMEM vorbereitet. Dazu wurden zu 125 µL OptiMEM 3,75 µL Lipofectamin hinzugegeben. Nach einer Durchmischung wurden weitere 125 µL OptiMEM ergänzt, bevor 2 µg/mL der Plasmid-DNA zugegeben wurde. Der fertige Transfektionsansatz wurde 5 min bei RT inkubiert und anschließend tröpfchenweise auf die vorbereiteten Wells verteilt. Anschließend wurden die Platten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Die Platten, sowie die Negativkontrollen mit nicht transfizierten Zellen, wurden täglich kontrolliert. Nach 48 h wurde das Nährmedium zu RPMI + 10% FKS ausgetauscht. Zur Selektion der transfizierten Zellen wurden 400 µg/mL Hygromycin-B zum Medium hinzugegeben. Die Kontrolle der Platten erfolgte weiter täglich und das Medium (RPMI + 10% FKS + 400 µg/mL Hygromycin-B) wurde alle zwei Tage erneuert, bis die transfizierten Zellen nach anhaltender Konfluenz weiter in Kultur genommen werden konnten.

3.2.6.5. Kulturhaltung der stabilen Reporterzelllinie

Nachdem die transfizierten und selektierten Zellen im Well der 6-Well-Platte angewachsen waren, wurden die Zellen zu Einzelzell-Kolonien vereinzelt.

Dazu wurden die Zellen im Well mit PBS gewaschen und mit Hilfe von 1 mL Trypsin gelöst. Die abgelösten Zellen wurden in 13 mL frisches RPMI + 10 % FKS + 400 µg/mL Hygromycin-B – Medium gegeben und die so entstandene Zellsuspension wurde anschließend zentrifugiert (380 g, 7 min, RT). Das Zellpellet wurde in 1 mL RPMI + 10 % FKS + 400 µg/mL Hygromycin-B-Medium aufgenommen und die Zellen wurden, mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer, gezählt.

Nach der Zählung wurden die Zellen wieder in Hygromycin-haltigem Nährmedium aufgenommen und vereinzelt. Dazu wurde so viel Nährmedium hinzugeben, dass in je 200 µL Medium rechnerisch jeweils eine Zelle enthalten war. Diese Zellsuspension wurde dann in 96-Well-Platten überführt (je 200 µL/Well).

Die Platten wurden anschließend bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Waren in einem Well direkt nach dem Überführen mehr Zellen vorhanden, wurde dieses Well verworfen. Zellen, die einzeln

in ihren Wells vorlagen, wurden weiter inkubiert, täglich kontrolliert und das Medium wurde alle zwei Tage ausgewechselt. Nachdem sich aus den Einzelzell-Kolonien ein konfluenter Zellrasen gebildet hatte, wurden die Zellen mit 100 μ L Trypsin gelöst und in ein Well einer 6-Well-Platte mit 2 mL Nährmedium + Hygromycin-B überführt. Nachdem die Zellschicht auch in dieser Well-Größe konfluent war, wurden die Zellen zur Überprüfung der Klonierung mit Hilfe des Luciferase-Assays (beschrieben in Kapitel 3.2.6.6.) getestet. Alle Zellen, bei welchen keine erfolgreiche Transfektion festgestellt werden konnte, wurden verworfen. Die Zellen, bei welchen eine erfolgreiche Transfektion mit dem Vektor pGL4.45[luc2P/ISRE/Hygro] nachgewiesen wurde, wurden weiter kultiviert und in eine 25 cm²-Zellkulturflasche überführt. Von dort wurden die Klone der stabilen Reporterzelllinie (ab jetzt A549-pGL4.45-Zellen genannt) in größere Zellkulturflaschen passagiert und niedrige Passagen wurden, ohne die Zugabe von Hygromycin B, eingefroren (siehe Kapitel 3.2.1.1.2. und Kapitel 3.2.1.1.3.).

3.2.6.6. Luciferase-Assay

Zur Bestimmung der Luciferase-Aktivität wurde das *ONE-Glo™ Luciferase Assay System* genutzt. Die Bildung der Luciferase im Reporter-Konstrukt wird durch ein ISRE, das an einen Minimal-Promoter gekoppelt ist, kontrolliert. Bei einer Stimulation mit Typ I/III IFNen und Aktivierung von ISRE wird Luciferase transkribiert (siehe Abbildung 3.2 für ein Schaubild des Vektors). Luciferase katalysiert die Umwandlung von Luciferin zu Oxyluciferin. Dabei wird eine Lichtemission erzeugt. Das emittierte Licht, auch relative Lichtausbeute (*Relative Light Units*; RLU) genannt, ist dabei proportional zur Anzahl der Luciferase-Enzymmoleküle.

Zur Durchführung des Assays wurde die stabile A549-pGL4.45-Zelllinie in 96-Well-Platten ausgesät (0,5 \times 10⁵ Zellen/Well in je 100 μ L). Nach Erreichen der Konfluenz durch eine Inkubation von 24 h bei 37 °C, 5 % CO₂, wurden die Zellen für 16 h und bei 37 °C und 5 % CO₂ mit verschiedenen IFN-Konzentrationen stimuliert (je 100 μ L); unstimulierte Zellen fungierten dabei als Kontrolle. Nach der Inkubationszeit wurden die Platten in 20 min auf RT gebracht. Anschließend wurden je 100 μ L *ONE-Glo™ Luciferase Assay Reagent* zu jedem Well hinzugefügt. Nach einer dreiminütigen Inkubation bei RT wurden die Platten im Plattenlesegerät EnVision Multimode Plate Reader bei 560 nm analysiert.

Alle Messungen erfolgten in Triplikaten. Für die Auswertung (Angabe in RLU) wurde der *Fold Change* anhand der Mittelwerte der Messwerte von stimulierten und unstimulierten Zellen gebildet.

$$\text{Fold Change} = \text{RLU}_{\text{stimulierte Zellen}} / \text{RLU}_{\text{unstimulierte Zellen}}$$

3.2.7. Messung von Zytokinkonzentrationen

3.2.7.1. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

Mittels *Enzyme Linked Immunosorbent Assays* (ELISAs; Sandwich ELISAs) wurden Zytokinkonzentrationen in basalen Zellkulturmedien gemessen. ELISAs gehören zur Gruppe der Immunassays und basieren auf einer enzymatischen Farbreaktion. In dieser Arbeit wurde das Prinzip des *Sandwich* ELISAs angewandt. Zur Bestimmung von IL-8 wurde das *Human IL-8 Uncoated ELISA-Kit* genutzt und für die Messung von humanen TGF- β das *Human/Mouse TGF beta 1 Uncoated ELISA-Kit*. Die Anwendung beider Kits erfolgte nach Herstellerangaben.

Die Absorption der Assays wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm quantifiziert, der Hintergrund bei einer Wellenlänge von 570 nm. In der anschließenden Auswertung wurde, nach Abzug des Hintergrund-Signals, das Proben-Signal mit dem einer Standardkurve rekombinanten Proteins verglichen. Dadurch konnte die vorliegende Protein-Konzentration quantitativ bestimmt werden.

3.2.7.2. *Cytometric Bead Array*

Mit Hilfe eines *Cytometric Bead Arrays* (CBA) können mittels Durchflusszytometrie mehrere Zytokinkonzentrationen gleichzeitig gemessen werden. Dabei wurden Polystyrolpartikel, sogenannte *Beads*, die sich durch ihre mittlere Fluoreszenzintensität unterscheiden, an monoklonale Fangantikörper gebunden. Mit diesen an *Beads* gekoppelten Fangantikörpern konnte dann das entsprechende, zu bestimmende Analyt gebunden und detektiert werden. Durch die ausgehende mittlere Fluoreszenzintensität, wurde die Menge des gebundenen Analyts im Vergleich zu einer Standardkurve wiedergegeben.

Zuerst erfolgte eine serielle Verdünnungsreihe des Zytokinstandards. Aus *Testbeads* Lösung und *Test Capture Bead diluent* wurde ein Mastermix hergestellt, von welchem je 50 μ L/Well in eine 96-Well Platte verteilt wurde. Anschließend wurden 50 μ L der Zytokinstandardreihe oder 50 μ L der zu testenden Probe hinzugegeben. Nach einer Stunde Inkubation im Dunkeln bei RT wurde je 50 μ L Detektionsantikörper zu den Proben pipettiert. Es erfolgte eine 2 h-Inkubation bei RT im Dunkeln. Direkt danach wurden pro Well 200 μ L Waschpuffer zugegeben und die Platte wurde für 10 min und RT bei 300 g zentrifugiert. Nach dem vorsichtigen Abnehmen des Überstands wurde das *Bead*-Pellet erneut in 200 μ L Waschpuffer aufgenommen. Anschließend erfolgte, mit Hilfe des Durchflusszytometers FACS Verse, die Messung der Proben. Die Daten wurden nach der Messung mit der FCAP Software ausgewertet. Die quantitative Nachweisgrenze (*Lower Limit of Quantification*, LLoQ) lag für alle hier genutzten Zytokine bei 10 pg/mL. Wurde diese Grenze unterschritten, wurden die Daten als messbar aber nicht quantifizierbar eingestuft und die Werte mit 0,5 x 10 pg/mL ersetzt.

3.2.8. Fluoreszenzmikroskopische Methoden

3.2.8.1. Vorbereitung der Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie

Mit der Hilfe von Immunfluoreszenz konnten bestimmte Zellbereiche oder Bakterieninfektionen angefärbt und sichtbar gemacht werden. Zur Analyse fluoreszenzgefärbter Zellen wurde das konfokale Laserscan Mikroskop Leica DMI6000 verwendet. Für die Herstellung von Dauerpräparaten wurden ALI-Kulturen, nach Beenden des jeweiligen Experiments, zweimal apikal und basal mit PBS gewaschen. Es erfolgte eine apikale (500 µL) und basale (1000 µL) Fixierung mit 4 % Formaldehyd (w/v) für 15 min bei RT. Anschließend wurde das apikale und basale Kompartiment zweimal erneut mit PBS gewaschen. Die Zellen konnten in diesem Zustand und in frischem PBS bei 4 °C gelagert oder direkt für die Färbung weiterverwendet werden.

Für die Färbung wurde nach der Fixierung die Zellmembran durch eine 15-minütige Inkubation bei RT mit 500 µL (apikal) 0,25 % Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Nach der Permeabilisierung wurden die Zellen zweimal apikal mit PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte eine Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen mit 500 µL (apikal) 1 % BSA in PBS für 1 h bei RT. Nach der Blockierung folgte direkt die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper, jeweils apikal in 500 µL 1 % BSA in PBS (siehe Tabelle 3.10 für die Übersicht der primären und sekundären Antikörper, sowie deren Konzentrationen und Inkubationszeiten). Insofern der genutzte Primärantikörper bereits mit einem Fluorophor konjugiert war, erfolgte die Inkubation abgedunkelt. Bei Mehrfachfärbungen wurden die Primärantikörper parallel inkubiert. An die Inkubation eines ungekoppelten Primärantikörpers schlossen sich erneut zwei Waschschriffe an, bevor der passende Sekundärantikörper in 500 µL 1 % BSA in PBS zugegeben und erneut im Dunkeln für 1 h bei RT inkubiert wurde. Nachdem alle Inkubationsschritte erfolgt waren, wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und in 500 µL PBS zwischengelagert. Zum Eindecken der gefärbten Zellen und Herstellen der Dauerpräparate wurde ein Tropfen des Eindeckmittels (ProLong™ Diamond Eindeckmittel mit DAPI) auf einen Objektträger gegeben. Durch das Verwenden eines Eindeckmittels mit DAPI wurden die Zellkerne parallel zum Eindecken gefärbt. Das PBS wurde von den Zellen entfernt und das Insert mit den Zellen wurde auf den Tropfen DAPI-haltigen Eindeckmittels platziert. Anschließend wurde die Membran mit den Zellen mit Hilfe eines Skalpell vom Insert gelöst. Auf die Membran wurde ein weiterer Tropfen des DAPI-haltigen Eindeckmittels gegeben, bevor ein Deckgläschen auf die Membran gegeben und leicht angedrückt wurde.

Die Präparate wurden im Dunkeln und über Nacht bei RT getrocknet und waren dann bereit für die Analyse mit dem konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskop (KLSM).

Tabelle 3.10: Übersicht über primäre und sekundäre Antikörper für die Färbung zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung

<u>Primärantikörper</u> Ziel	Antigen	Konzentration; Inkubationszeit	<u>Sekundär-</u> <u>antikörper</u>	Konzentration; Inkubationszeit
<i>Tight Junctions</i>	ZO-1 (FITC- konjugiert)	2,5 µg/mL; 3 h bei RT	-	-
Basale Zellen	p63	1 µg/mL; 1 h bei RT	<i>Goat α-rabbit</i> (AF555)	2 µg/mL; 1 h bei RT
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	8 µg/mL; 1 h bei RT	<i>Goat α-rabbit</i> (AF555)	2 µg/mL; 1 h bei RT
Zellkerne	DAPI	1m Eindeckmedium	-	-

3.2.8.2. Konfokale *Laser Scanning* Mikroskopie

Die Bildaufnahme der Dauerpräparate wurden mittels 63x/1,4 *OIL*-Objektiv und mit Hilfe von Immersionsöl in einem KLSM Leica DMI6000 durchgeführt.

In der Konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskopie erfolgt, durch den Einsatz einer Lochblende (Detektionsblende) zwischen Objekt und Detektor, die Abschirmung der Fluoreszenzsignale außerhalb der Fokusebene. Zusätzlich wird das Anregungslicht, durch eine zweite Lochblende (Anregungsblende) zwischen Präparat und anregendem Laser, punktförmig auf eine Stelle im Präparat fokussiert. Durch diese Fokussierung werden nur in dem spezifischen Teil des Präparates Fluorophore angeregt (siehe Tabelle 3.11 für eine Übersicht der Spektren der Fluorophore). Dieser angeregte Teil wird dann Punkt für Punkt für die Bildaufnahme 'abgefahren' (Elliott, 2020).

Bei der für diese Arbeit gewählten Einstellungen wurde jeder Punkt mindestens viermal gescannt, die Auflösung belief sich auf 512×512 Lichtpunkte. Um eine Detektion von Fluorophor A im Kanal von Fluorophor B (*Cross Talk*) zu verhindern, wurden die Fluorophore nacheinander, im sequenziellen Modus, angeregt.

Ausgewertet wurden die aufgenommenen Bilder mit der Software Fiji ImageJ. Mit Hilfe dieser Software wurden Z-Stapel (Bilderstapel) und orthogonale Ansichten generiert und Kanäle übereinandergelegt.

Tabelle 3.11: Übersicht über die angeregten Fluorophore während der Fluoreszenzmikroskopie

Fluorophor	Anregungs- / Emissions-Maximum [nm]
AlexaFluor555	488/532
AlexaFluor568	555/580
DAPI	359/457
FITC	490/525

3.2.8.3. Nachweis von oxidativem Stress mit Hilfe von CellROX™

Um oxidativen Stress in behandelten pBEC-Inserts messen zu können, wurde CellROX™ grünes Reagenz verwendet.

CellROX™ ist eine fluorogene membrangängige Sonde. In reduziertem Zustand ist der Farbstoff schwach fluoreszierend und weist bei Oxidierung durch ROS eine photostabile Fluoreszenz und anschließende Bindung an die DNA auf.

Zum Nachweis von oxidativem Stress in ALI-Inserts wurden zuerst 500 µL PBS apikal hinzugegeben. Dieses PBS wurde zum Spülen der Zellen und zur Färbung genutzt. Um eine Endkonzentration von 5 µM zu erreichen, wurde je 1 µL CellROX™ zu jedem Insert zugegeben. Die 12-Well Platten mit den Inserts wurden dann unter Lichtausschluss bei 37 °C und 5 % CO₂ für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Inserts, unter Vermeidung von direkter Lichteinstrahlung, je einmal apikal mit PBS gewaschen und mit 4 % Formaldehyd (w/v) (500 µL apikal, 1000 µL basal) für 15 min, im Dunkeln und bei RT fixiert. Wieder erfolgte ein Waschschrift mit PBS, bevor die Membran aus dem Insert gelöst und mit Hilfe von ProLong™ Diamond Eindeckmittel mit DAPI, eingedeckt wurde (beschrieben in Kapitel 3.2.8.1.).

Da der Farbstoff nach der Färbung nur 24 h stabil bleibt, erfolgte die Analyse innerhalb dieses Zeitfensters bei einem Anregungs- bzw. Emissions-Maximum von ~485 nm beziehungsweise 520 nm an einem KLSM.

3.2.8.4. Quantifizierung von *Tight Junctions*

Nach der KLSM-Analyse von Dauerpräparaten (siehe Kapitel 3.2.8.2.) in welchen mit Hilfe eines ZO-1-Antikörpers (ZO-1-AK) die *Tight Junctions* der pBECs in ALI-Kultur gefärbt waren, wurde die Fläche der *Tight Junctions* quantifiziert. Dazu wurde in Fiji ImageJ der Kanal isoliert, welcher die Fluoreszenz von gefärbtem ZO-1 zeigte. Anschließend wurde mit Hilfe einer Befehlsfolge, einem so genannten ‚Macro‘, die Fläche der *Tight Junctions* pro Z-Stapel bestimmt. Dabei maß das Skript die Fläche aller 0 bis 1,5 µm² großen zusammenhängenden Färbeflächen im Bild.

,Macro' Skript¹:

```
run("Set Measurements...", "display area decimal=3");
run("8-bit");
setAutoThreshold("Li dark");
setOption("BlackBackground", true);
run("Convert to Mask");

run("Analyze Particles...", "size=0.0-1.5 include add_in_situ");
array1 = newArray("0");;
for (i=1;i<roiManager("count");i++){
    array1 = Array.concat(array1,i);
    Array.print(array1);
}
roiManager("select", array1);
roiManager("Combine");
run("Clear", "slice");
run("Select None");
roiManager("Show None");
roiManager("Delete");

run("Create Selection");
run("Measure");
close();
```

¹Geschrieben wurde das ,Macro' von Herrn Hans Schwarzbach, aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Philipps-Universität Marburg.

3.2.8.5. Quantifizierung der bakteriellen Translokation in die Zellschicht

Nach der Begutachtung der Dauerpräparate mittels KLSM (beschrieben in Kapitel 3.2.8.2.), in welchen mit Hilfe eines *S. pneumoniae*-Antikörpers *S. pneumoniae* angefärbt war, wurde die bakterielle Translokation in die Zellschicht quantifiziert. Dazu wurde aus den Aufnahmen eines Präparats ein Z-Stapel generiert, von welchem wiederum je fünf orthogonale Ansichten in Fiji ImageJ hergestellt wurden. Von jeder dieser orthogonalen Ansichten wurde, ebenfalls mit Fiji ImageJ, die Höhe der Zellschicht ermittelt. Dafür wurde die Höhe an drei unterschiedlichen Punkten gemessen und die Werte dann gemittelt. Die Bakterien waren in den orthogonalen Ansichten als rot fluoreszierende Punkte sichtbar (siehe Abbildung 3.3). Um die Translokation

der Bakterien in die Zellschicht zu quantifizieren, wurde der Abstand jedes einzelnen Bakterienpunktes zum basalen Ende der Zellschicht vermessen, die Werte wurden ebenfalls gemittelt und anhand der mittleren Höhe der Zellschicht wurde berechnet, wie weit die Bakterien in die Zellschicht eingedrungen waren (später angegeben in % der durchschnittlichen Zellschichttiefe).

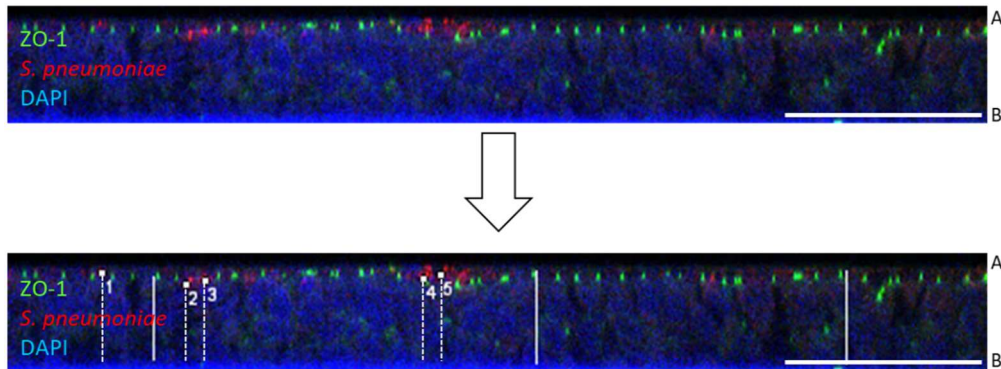


Abbildung 3.3: Beispiel für die Quantifizierung der bakteriellen Translokation in die Zellschicht
Gezeigt ist eine Infektion differenzierter pBECs in ALI-Kultur für 8 h mit *S. pneumoniae* (MOI 10). Die Zellen wurden fixiert, gegen ZO-1 und *S. pneumoniae* immunfluoreszenzgefärbt und nach der Markierung der Zellkerne mit DAPI mittels KLSM analysiert. Oben: Zellschicht mit *S. pneumoniae*-Infektion, ohne Vermessung; unten: identische Zellschicht, vertikale Linien repräsentieren die drei Punkte mit denen die Höhe der Zellschicht bestimmt wurde, die nummerierten Punkte zeigen die Bakterienpunkte von welchen die zurückgelegte Strecke (gestrichelte vertikale Linien) der Bakterien in die Zellschicht ermittelt wurde; 63fache Vergrößerung, Maßstabsbalken: 50 μ m, orthogonale Ansicht; A: apikale Seite, B: basale Seite; *Tight Junctions* (grün, ZO-1 markiert), *S. pneumoniae* (rot, *S. pneumoniae*-AK markiert); Zellkerne (blau, DAPI markiert).

3.2.9. Elektronenmikroskopie

Um Details der zellulären Strukturen und interzellulären Verbindungen abzubilden, wurden die Zellen zusätzlich mit Hilfe eines Elektronenmikroskops analysiert. Dazu wurden die Inserts nach Behandlung zweimal apikal und basal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde je 1 mL $\frac{1}{2}$ ITO (Ansatz siehe Seite 61) in 0,1 M Cacodylatpuffer (Ansatz siehe Seite 61) apikal und basal hinzugegeben. Die so fixierten Inserts wurden bis zur Weiterverarbeitung, mindestens jedoch für 24 h, in $\frac{1}{2}$ ITO in 0,1 M Cacodylatpuffer gelagert. Alle weiteren Schritte für die elektronenmikroskopische Untersuchung erfolgten im Institut für Anatomie und Zellbiologie der Philipps-Universität Marburg.

Die Inserts wurden mehrfach mit 0,1 M Cacodylatpuffer gewaschen, bis die überschüssige Pikrinsäure aus der ITO-Fixierung herausgespült war. Nach einer 15-minütigen Inkubation in

Cacodylatpuffer, erfolgte für 90 min die Osmierung in reduziertem Osmium (Ansatz siehe Seite 61). Anschließend wurden die Inserts 7x20 min und 4x1 h mit 0,1 M Cacodylatpuffer gewaschen. Die Membranen der Inserts wurden dann mit Hilfe eines Skalpell von den Inserts gelöst und in vier gleichgroße Teile zerschnitten. Anschließend erfolgte die Einbettung der Membranstücke nach folgendem Schema (siehe Tabelle 3.12):

Tabelle 3.12: Einbettungsschema der Proben zur Elektronenmikroskopie

Schritt	Reagenz	Inkubation
1	Cacodylatpuffer	2x 15 min
2	30 % Ethanol	1x 15 min
3	50 % Ethanol	2x 15 min
4	70 % Ethanol	1x 15 min
5	90 % Ethanol	1x 15 min
6	100 % Ethanol	1x 20 min
7	100 % Ethanol	2x 30 min
8	Propylenoxid	1x 10 min
9	Propylenoxid	1x 15 min
10	Propylenoxid	1x 20 min
11	2 Teile Propylenoxid/ 1 Teil Epon (A+B) (Ansatz siehe Seite 61)	1x 1 h
12	1 Teil Propylenoxid/ 1 Teil Epon (A+B)	2x 1h
13	1 Teil Propylenoxid/ 3 Teile Epon (A+B)	1x 1h
14	1 Teil Propylenoxid/ 5 Teile Epon (A+B)	1x 1h
15	1 Teil Propylenoxid/ 5 Teile Epon (A+B)	1x 2h
16	Epon (A+B)	2x 1h
17	Epon (A+B)	2x 2 h
18	Epon C (A+B+DMP 30) (Ansatz siehe Seite 61)	1x 8 h
19	Epon C (A+B+DMP 30)	1x 16 h

Zum Schluss wurden die Membranstücke dann mit Epon C in Flacheinbettungsformen gegeben und über Nacht bei 60 °C polymerisiert. Nach der Auslösung aus der Form wurden die Blöcke dann am Ultracut-S Ultramikrotom mit einem Glasmesser geschnitten. Die so entstandenen circa 0,5 µm dünnen Semidünnschnitte wurden auf Objektträger gezogen, mit Methylenblau gefärbt und unter dem Lichtmikroskop überprüft. Nachdem so sichergestellt wurde, dass die Zellen komplett eingebettet und die Membranstücke vollständig waren, wurden die Epon-Blöcke erneut am Ultracut-S geschnitten. Diesmal wurde ein Diamantmesser verwendet,

wodurch 70-80 nm dünne Ultradünnschnitte entstanden, welche dann auf Kupfernetzchen gezogen wurden. Diese Schnitte wurden über Nacht getrocknet und am nächsten Tag mit Uran und Blei kontrastiert. Die Schnitte auf den Netzchen wurden dafür 10 min in 2 % Uranylacetatlösung inkubiert, 30x mit Wasser gewaschen, 5 min in Bleicitratlösung (Ansatz siehe unten) inkubiert und wieder 30x mit Wasser gewaschen. Nach einer Trocknung über Nacht konnten die Schnitte dann am Elektronenmikroskop EM-10 analysiert werden.

ITO

25 % Formaldehyd 1,25 % (w/v)
 25 % Glutaraldehyd 2,5 % (v/v)
 Pikrinsäure 0,05 % (v/v)
 Wasser 46,2 % (v/v)
 0,2 M Cacodylatpuffer 50 % (v/v)

0,2 M Cacodylatpuffer

0,2 M Dimethylarsinsäure-Na 42,81 g (w/v)
 Wasser 1 L (v/v)
 → 0,1 M Cacodylatpuffer:
 1 Teil 0,2 M Cacodylatpuffer + 1 Teil Wasser

→ ½ ITO: 1 Teil ITO + 1 Teil 0,1 M Cacodylatpuffer

Reduziertes Osmium

1 Teil 2 % Osmiumtetroxid-Lösung (v/v)
 1 Teil 3 % Kaliumhexacyanoferrat-II (v/v)

Bleicitrat-Lösung

Bleinitrat 1,33 g (w/v)
 Natriumcitrat x 2H₂O 1,75 g (w/v)
 Wasser (CO₂-frei) 30 mL (v/v)
 → Mit NaOH titrieren

Epon (A/B/C)

Tabelle 3.13: Ansätze Epon A/B/C

Lösung	Glycidether 100	Methylnadic-anhydrid	Dodecenyln-bernsteinsäureanhydrid	2,4,6-Tris-(Dimethylaminomethyl)-Phenol
A	62 mL	-	100 mL	-
B	100 mL	89 mL	-	-
C	1 Teil Epon A + 1 Teil Epon B			0,15 mL

3.2.10. Durchflusszytometrische Analysen

3.2.10.1. Ernte und Vorbereitung der Zellen

Um Zellen mit immunfluoreszierenden Antikörpern gegen intrazelluläre oder membranständige Antigene zu markieren und anschließend mit Hilfe eines Durchflusszytometers zu analysieren, mussten die adhärennten Zellen zuerst geerntet und gewaschen werden. Dazu wurden sowohl immortalisierte Zellen, wie HeLa Ohio- oder A549-Zellen als auch pBECs in ALI-Kultur jeweils dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin vom Boden des Wells beziehungsweise des Inserts gelöst. Die Ablösung der ALI-Kulturen dauerte dabei circa 20 min, in denen die Zellen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert wurden. Nach der Ablösung wurden die Zellsuspensionen bei 380 g für 7 min und bei RT zentrifugiert. Das so entstandene Pellet wurde in je 1 mL PBS aufgenommen und erneut mit den vorherigen Einstellungen

zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands wurde das Zellpellet wieder in 1 mL PBS aufgenommen und die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Anschließend konnten die Zellen mit Antikörpern gefärbt und später durchflusszytometrisch analysiert werden.

3.2.10.2. Färbung der Zellen

3.2.10.2.1. Annexin V- Propidiumiodid-Färbung

Um den Einfluss auf die Zellviabilität bestimmter Stimuli und Behandlungen auch mittels durchflusszytometrischer Analysen zeigen zu können, wurde *das FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I* verwendet.

Phosphatidylserin (PS) wird, im frühen Stadium der Apoptose von der inneren an die äußere Seite der Plasmamembran translokalisiert. Annexin V ist in der Lage an PS zu binden. Parallel zu Annexin V wurden die Zellen mit Propidiumiodid gefärbt. Propidiumiodid interkaliert zwischen Basen der Nukleinsäuren und kann so genutzt werden, um Nukleinsäuren von Zellen mit geschädigter Plasmamembran oder von Zelltrümmern zu detektieren. Durch diese beiden Farbstoffe kann zwischen lebenden (Annexin V und Propidiumiodid negativ), apoptotischen (Annexin V positiv und Propidiumiodid negativ) und nekrotischen Zellen (Annexin V und Propidiumiodid positiv) unterschieden werden.

Zur Analyse mittels Annexin V- und Propidiumiodid-Färbung wurden zuerst 1×10^7 abgelöste Zellen bei 380 g, 7 min, RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 mL *1x Binding Buffer* des Kits aufgenommen. Zu je 100 μ L der Zellsuspension wurden je 5 μ L der im Kit beiliegenden Farbstoffe Annexin V und Propidiumiodid zugegeben. Um bei der durchflusszytometrischen Messung eine Kompensation der beiden Farbstoff-Spektren durchführen zu können, wurden zusätzlich Einzelfärbungen von Annexin V und Propidiumiodid inkubiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation im Dunkeln bei RT, wurden je 400 μ L des *1x Binding Buffers* auf die gefärbten Zellen gegeben und es erfolgte die Analyse am Durchflusszytometer BD FACSCanto™ II.

Das mit FITC konjugierte Annexin V wurde mit eingestellten Extinktionsfiltern von 530 nm und die Eigenfluoreszenz von Propidiumiodid mit eingestellten Extinktionsfiltern von 630 nm gemessen.

3.2.10.2.2. LIVE/DEAD-Assay

In einem Teil der Versuche wurde der Einfluss von HRV und IFN β auf die Zellviabilität von pBECs in ALI-Kultur untersucht. In diesen Versuchsreihen wurden die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet und gefärbt. Um die Möglichkeit zu schaffen, die Zellen gleichzeitig und mit denselben Bedingungen am Durchflusszytometer zu analysieren, wurde sie mit Hilfe des *LIVE/DEAD™* Fixierbares blaues Totzellen-Farbstoff-Kit für die UV-Anregung gefärbt und konnten

anschließend fixiert werden. Dabei markiert der fluoreszierende Reaktivfarbstoff (*LIVE/DEAD™ Fixable Blue Stain*) des Kits freie Amine der Zellen. Der Farbstoff ist nicht in der Lage die Zellmembran zu penetrieren, wodurch die Fluoreszenz bei lebenden Zellen gering ist. Bei Zellen mit geschädigter Zellmembran kann der Farbstoff an Amine im Zellinneren und auf der Zelloberfläche binden. Dadurch ist die Fluoreszenzintensität bei geschädigten/toten Zellen höher und so eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen möglich.

Für die Färbung wurde 1 μL des fluoreszierenden Reaktivfarbstoff zu 1×10^6 Zellen in 1 mL PBS hinzugegeben. Nach einer Inkubation für 30 min im Dunkeln und bei RT wurden die Zellen zentrifugiert (380 g, 7 min, RT) und das Zellpellet mit PBS gewaschen, bevor die Zellen fixiert wurden. Dazu wurde das gewaschene Zellpellet in 1 mL 4 % Formaldehyd (w/v) aufgenommen und erneut im Dunkeln für 15 min und bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation wurde der Überstand entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in 1 mL 1 % BSA in PBS aufgenommen. Nun konnten die Zellen bei 4 °C und vor Licht geschützt gelagert oder direkt analysiert werden.

Zur Kontrolle und korrekten Einstellung des benötigten Lasers, wurden zwei Arten von Polystyrol-Mikrokugeln (*Beads*) aus dem *ArC™ Aminreaktive Kompensations-Bead-Kit* nach Herstellerangaben ebenfalls mit dem fluoreszierenden Reaktivfarbstoff gefärbt und gemeinsam mit den Zellen analysiert.

Gemessen wurde der fluoreszierenden Reaktivfarbstoff mit Hilfe des UV-Laser und eingestellten Extinktionsfiltern von 450 nm.

3.2.10.2.3. Bestimmung der Zilien-Entwicklung

Zur Charakterisierung der Zilien-Entwicklung in differenzierten und undifferenzierten pBECs in ALI-Kultur wurden die Zilien-tragenden Zellen per Antikörper markiert und durchflusszytometrisch analysiert (Bonser *et al.*, 2021). Dazu wurden die von der Insert-Membran gelösten und gewaschenen Zellen im ersten Schritt mit 4 % Formaldehyd (w/v) für 15 min und bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, abzentrifugiert (380 g, 7 min, RT) und erneut in PBS aufgenommen. Die unpermeabilisierten Zellen wurden dann mit einer Zellzahl von $1 \times 10^6/\text{mL}$ in 200 μL PBS mit einem *Mouse- anti-acetylated Alpha Tubulin*-Antikörper (1,1 mg/mL) über Nacht, bei 4 °C und vor Licht geschützt, inkubiert. Der Antikörper wurde vor dem Färben mittels *APC Conjugation Kit* mit dem Fluorophor APC konjugiert, um einen weiteren Zellverlust bei einer Zweitantikörperfärbung zu verhindern. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen dreimal mit je 1 mL FC-WaschPuffer (Ansatz siehe Seite 64) gewaschen und anschließend im Durchflusszytometer BD FACSCanto™ II mit eingestellten Extinktionsfiltern von 660 nm gemessen.

Um eine Autofluoreszenz der Zellen oder unspezifischen Bindungen auszuschließen, wurden zusätzlich ungefärbte Kontrollzellen und eine Isotypenkontrolle (*Mouse IgG2b Kappa Isotype Control*, APC) in derselben Konzentration wie der jeweilige immunfluoreszierende Antikörper mitgeführt.

FC-WaschPuffer:

FKS	10 % (v/v)
Natriumazid	1 % (w/v)
PBS	89 % (v/v)

3.2.10.3. Messen mit dem Durchflusszytometer

Bei der Messung der gefärbten Zellen am Durchflusszytometer werden die einzelnen Zellen in Suspension an Lasern vorbeigeführt. Dabei wird ein Teil des Lichts durch Größe und Granularität der Zellen gestreut. Durch die Aktivierung des Fluoreszenzkanals können die Zellen, die mit fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt wurden, mittels Detektoren erfasst werden. Zum Einsatz kam dabei das Durchflusszytometer BD FACSCanto™ II in der 8-Farb-Option mit drei Lasern. Dadurch konnten unterschiedliche Fluorochrome, wie zum Beispiel Phycoerythrin (PE), Fluorescein Isothiocyanat (FITC), Allophycocyanin (APC) und Peridinin-Cy7 (PE-Cy7) parallel gemessen werden. Im Falle von mehrfach gefärbten Zellen (Mehrfarbanalysen), erfolgten jeweils Kompensationen der Fluoreszenzspektren mit Hilfe von Einzelfärbungen mit dem jeweiligen Antikörper. So wurde das Signal überlappender Emissionsspektren unterschiedlicher Fluorochrome korrigiert.

Die Messung der Zellen, das Erfassen der Daten und die sequenzielle Identifizierung der interessierenden Zellpopulation, das sogenannte *Gaten*, erfolgte mit der BD FACSDiva™ Software. Die Daten wurden später in Microsoft Excel ausgewertet.

Für das *Gating* der Zellen wurden im ersten Schritt mit Hilfe der Streulächendichte des *Forward Scatters* (FSC, Bestimmung der Zellgröße) und des *Side Scatters* (SSC, Bestimmung der Zellgranularität) die interessanten Zellpopulationen identifiziert und somit Zelltrümmer (Debris) ausgeschlossen (*Parental* (P) 1 Generation; siehe Abbildung 3.4). Im zweiten Schritt wurde dann über die FSC-Streuhöhe (FSC-H) und FSC-Streulächendichte (FSC-A) Dubletten von der Messung exkludiert, so dass nur Einzelzellen in die Messung mit aufgenommen wurden (P2 Generation). Im dritten und letzten Schritt wurden, bei Einzelfärbungen, diese Einzelzellen dann in einem Histogramm dargestellt. Die Zellzahl wurde dort gegen das Fluoreszenzkanal-Signal geplottet, um sie bezüglich der Expression des Fluoreszenzmarkers zu analysieren. Häufig wurden zwei Spitzen identifiziert, die als positive (P3) und negative Population zu werten waren.

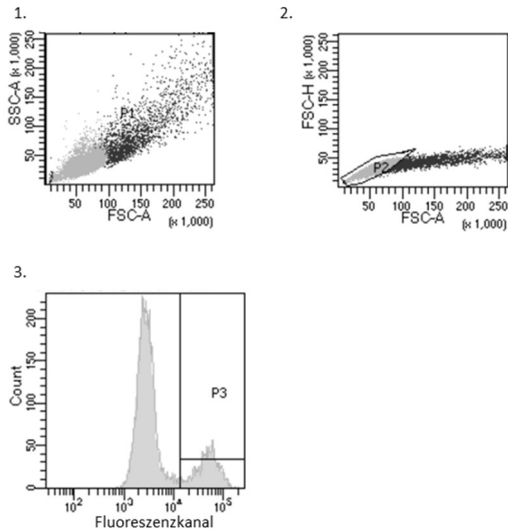


Abbildung 3.4: Gating Beispiel für die Messung am Durchflusszytometer

Beispiel für einen *Gating*-Prozess während der Messung am Durchflusszytometer. 1. Schritt: Streulächendichte-FSC (FSC-A) gegen SSC-A; Zellpopulation identifizieren, Zelltrümmer ausschließen = P1; 2. Schritt: FSC-Streuhöhe (FSC-H) gegen FSC-A; Zelldubletten ausschließen = P2; 3. Schritt: Zellzahl gegen Fluoreszenzmarker; positive (=P3) und negative Population.

3.2.11. Statistik

Die statistische Auswertung aller Experimente erfolgte mit Hilfe von GraphPad Prism, falls nicht anderweitig beschrieben. Hierzu wurden Daten von unabhängigen Experimenten verwendet, die unter identischen Versuchsbedingungen durchgeführt wurden. Jedes unabhängige Experiment enthielt pro Bedingung technische Duplikate. Aus diesen Werten wurde der arithmetische Mittelwert gebildet.

Wurden zwei Gruppen verglichen, wie etwa bei der Viruspartikel-Messung, wurde von den Werten jeweils der Logarithmus zur Basis 10 gebildet, bevor ein gepaarter T-Test durchgeführt wurde.

Sollten mehrere Gruppen, beispielsweise einer Zeitreihe, miteinander verglichen werden, wurde, abhängig von den einbezogenen Faktoren, eine Zweiweg oder Dreiweg Varianzanalyse (*Two-Way/Three-Way ANOVA*), gefolgt von einem *Tukey's Multiple Comparison Test* durchgeführt. Das Signifikanzniveau für den Fehler erster Art wurde auf 0,05 festgelegt.

3.2.12. Übersichtsschemata der Versuchsreihen dieser Arbeit

Zur besseren Übersicht über die Abläufe der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchsreihen, sind diese in den folgenden Schaubildern zusammengefasst (siehe Abbildungen 3.5, 3.6 und 3.7 für die jeweiligen Schemata der unterschiedlichen Experimente).

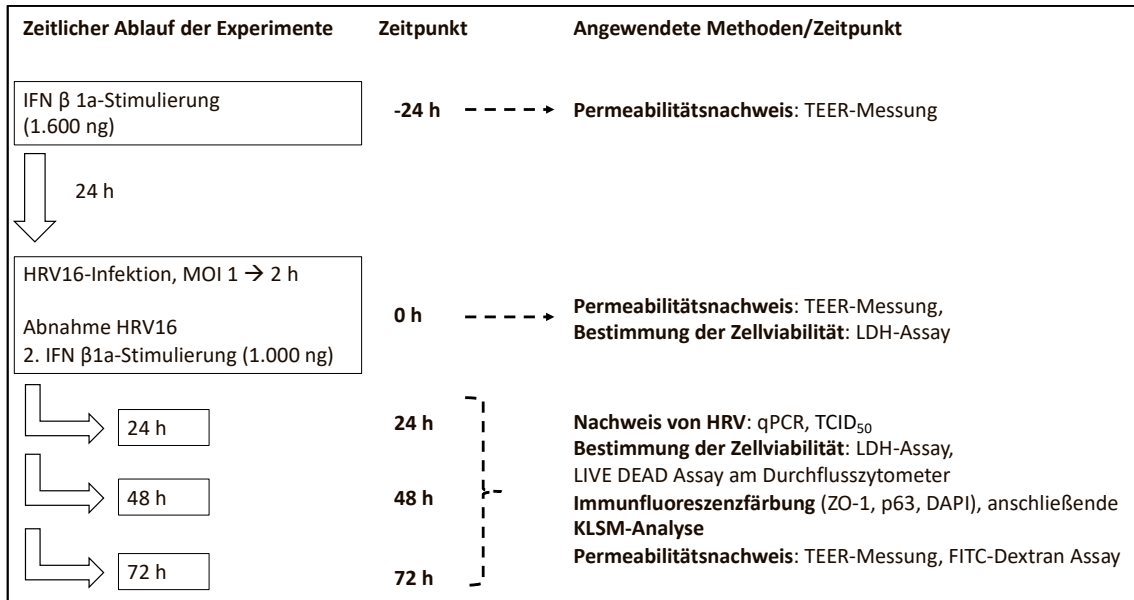


Abbildung 3.5: Methoden und Schema des Ablaufs der Versuche zur Untersuchung des Effekts einer IFN β 1a-Behandlung auf die Barrierefunktion von pBECs in ALI-Kultur während einer HRV-Infektion

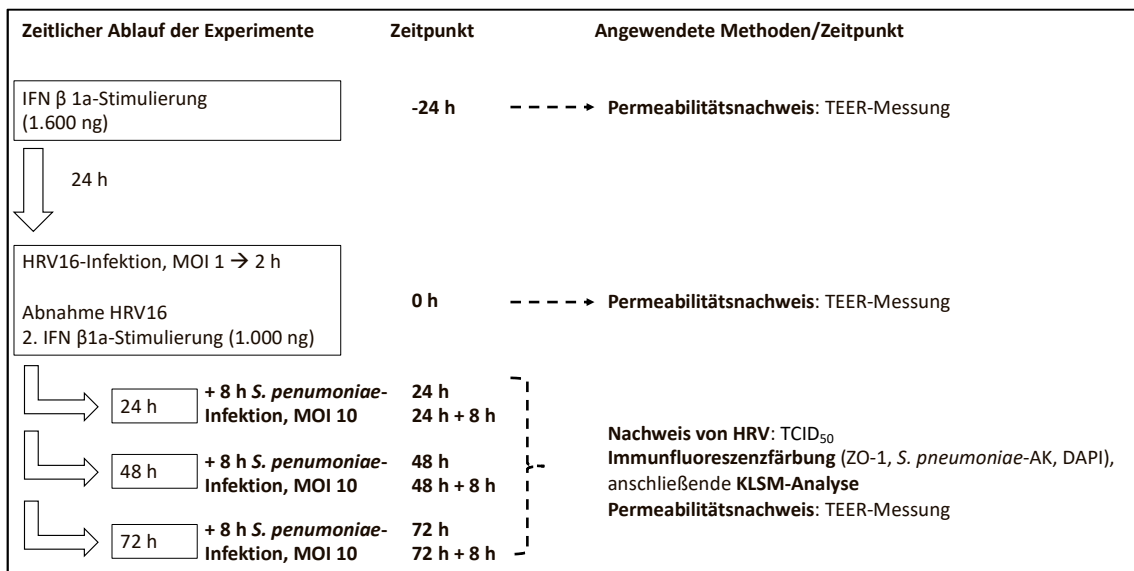


Abbildung 3.6: Methoden und Schema des Ablaufs der Versuche zur Untersuchung des Effekts einer IFN β 1a-Behandlung in pBECs in ALI-Kultur während einer viral-bakteriellen Ko-Infektion

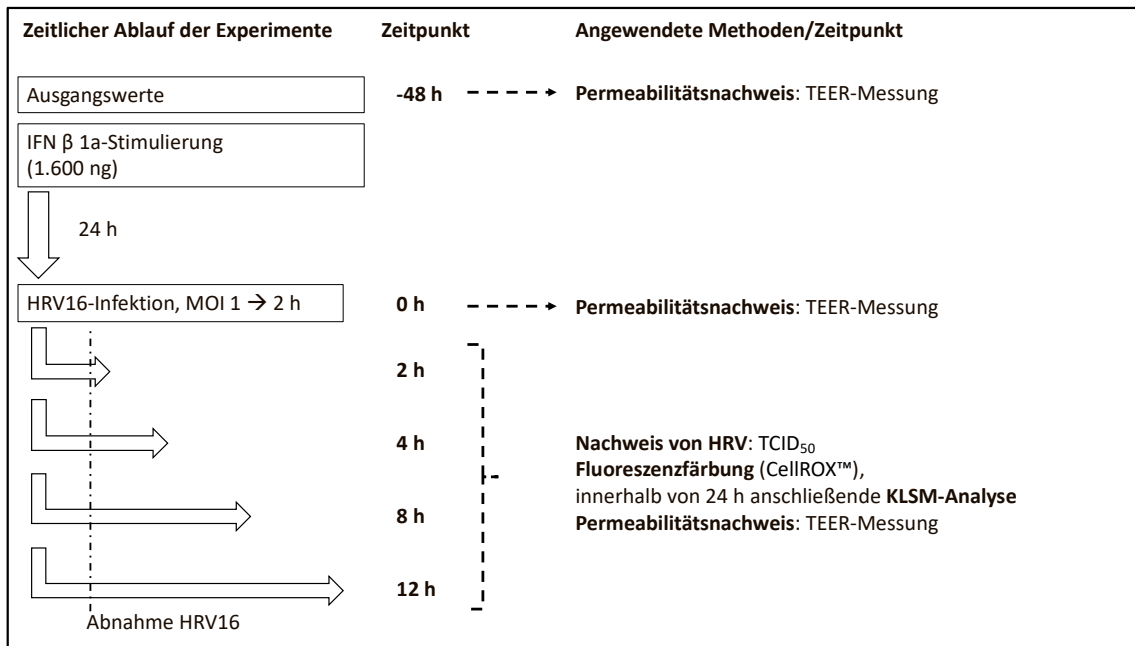


Abbildung 3.7: Methoden und Schema des Ablaufs der Versuche zur Untersuchung von oxidativem Stress in pBECs in ALI-Kultur während einer IFN β 1a-Stimulation und HRV-Infektion

4. Ergebnisse

4.1. Vergleich verschiedener IFN-Subtypen

4.1.1. Klonierung und IFN-Stimulation einer stabilen Reporterzelllinie

Zu Beginn sollte ein IFN aus der Gruppe der Typ I oder Typ III IFNe mit hoher viraler Aktivität ausgewählt werden. Dazu wurde, wie in Kapitel 3.2.6. beschrieben, eine stabile Reporterzelllinie generiert (A549-pGL4.45-Zellen). In diesen Zellen wurde ein Konstrukt integriert, das jeweils fünf Kopien des ISRE enthielt, die wiederum an das Reporterogen *luc2P* gekoppelt waren. Bei Stimulation mit unterschiedlichen IFNen wurde so die ISRE vermittelte Transkription des Gens *luc2P* angeregt, die proportional zur indirekten antiviralen Aktivität der IFNe stand. Diese Anregung konnte anschließend durch Biolumineszenz (Luciferase-Aktivität) mit Hilfe des Luciferase-Assays (siehe Kapitel 3.2.6.6.) quantifiziert werden. Umso stärker die ISRE vermittelte Transkription durch IFN-Stimulation aktiviert wurde, desto mehr Luciferase-Aktivität und damit indirekte antivirale Aktivität konnte nachgewiesen werden.

Die Typ I IFNe $\alpha 2b$, $\alpha 8$, $\beta 1b$ und die Typ III IFNe IFN $\lambda 1$, IFN $\lambda 2$, IFN $\lambda 3$ wurden ausgewählt und mit dem Reportersystem getestet.

Um gleichzeitig auch eine geeignete Konzentration des Interferons in zukünftigen Experimenten zu bestimmen, wurden die A549-pGL4.45-Zellen für 16 h mit unterschiedlichen Konzentrationen (1 - 1000 ng/mL) aller IFNe stimuliert.

Es wurde deutlich, dass durch die Stimulation mit jedem der getesteten IFNe Luciferase-Produktion induziert wurden. Dabei stieg diese Gesamtaktivität nach der Stimulation mit unterschiedlichen IFNen proportional zu den eingesetzten IFN-Konzentrationen an. So löste zum Beispiel IFN $\alpha 2b$ bei einer Konzentration von 1 ng/mL eine Luciferase-Aktivität von $25,92 \pm 6,02$ RLU (Mittelwert \pm Standardabweichung) aus, während sich die Aktivität nach der Stimulation mit einer Konzentration von 50 ng/mL IFN $\alpha 2b$ bereits bei $49,72 \pm 12,43$ RLU befand. Sichtbar wurde, dass die IFNe $\alpha 2b$ (1000 ng/mL: $52,62 \pm 12,20$ RLU) und $\beta 1b$ (1000 ng/mL: $50,83 \pm 2,96$ RLU) eine starke Transkription des Luciferase-Reportergens auslösten als das IFN $\alpha 8$ (1000 ng/mL: $29,50 \pm 3,56$ RLU; Mittelwert \pm Standardabweichung). Die Auswahl des IFN erfolgte deshalb zwischen IFN $\alpha 2b$ und IFN $\beta 1b$.

Allerdings erreichte die gemessene Luciferase-Aktivität ab einer Konzentration von circa 50 ng/mL bei allen IFN-Subtypen ein Plateau (zum Beispiel; Luciferase Aktivität: IFN $\alpha 2b$: 50 ng/mL $49,72 \pm 12,43$ RLU; 100 ng/mL $51,40 \pm 11,60$ RLU; 250 ng/mL $54,61 \pm 9,64$ RLU; 500 ng/mL $58,01 \pm 8,65$ RLU; 1000 ng/mL $52,62 \pm 12,20$ RLU; Luciferase Aktivität IFN $\lambda 1$: 50 ng/mL $37,48 \pm 6,03$ RLU; 100 ng/mL $40,68 \pm 5,27$ RLU; 250 ng/mL $37,50 \pm 11,18$ RLU; 500 ng/mL $34,78 \pm 14,23$ RLU; 1000 ng/mL $35,58 \pm 14,71$ RLU;

Mittelwert \pm Standardabweichung, siehe Abbildung 4.1). Aufgrund dieser Limitation war es nicht möglich die Luciferase-Aktivität nach einer Stimulation mit höheren IFN-Konzentrationen von der Aktivität nach einer Stimulation mit niedrigeren IFN-Konzentrationen zu differenzieren. Somit waren die Ergebnisse dieses Assays allein nicht ausreichend um ein IFN für weitere Versuche auszuwählen, weswegen die Auswahl des Interferons mit Hilfe weiterer Experimente erfolgte.

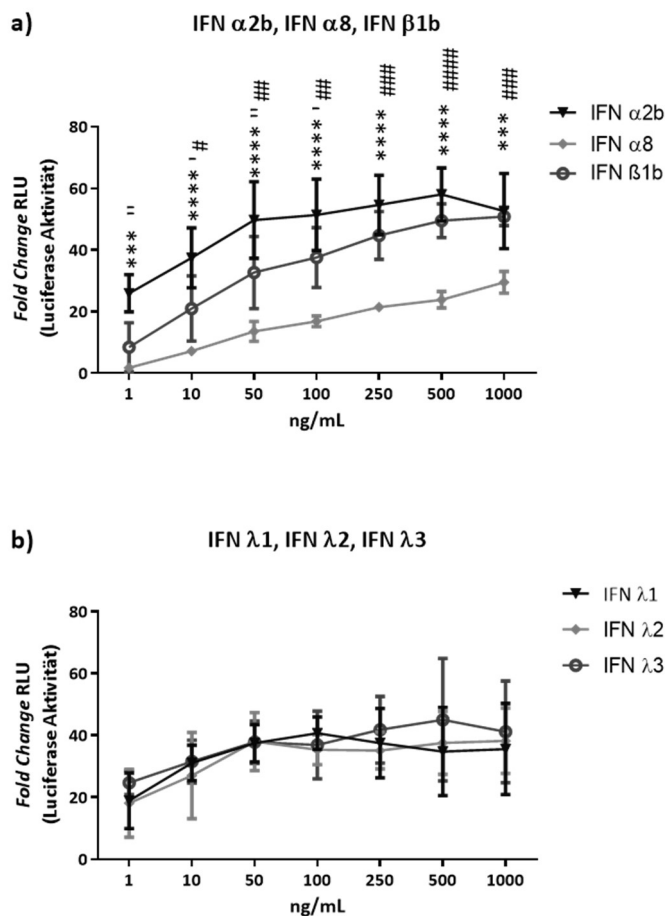


Abbildung 4.1: Vergleich der Luciferase-Aktivität ausgelöst durch unterschiedliche IFN-Subtypen in der Reporterzelllinie A549-pGL4.45

Bestimmung der Luciferase-Aktivität mittels Luciferase-Assay nach Stimulation der stabilen Reporterzelllinie A549-pGL4.45 mit unterschiedlichen IFN-Subtypen in verschiedenen Konzentrationen; Mittelwert \pm Standardabweichung, (n=4). a) Typ I IFNe; b) Typ III IFNe (nicht signifikant). Signifikanzniveau: * IFN α 2b vs. IFN α 8; ' IFN α 2b vs. IFN β 1b; # IFN β 1b vs. IFN α 8; */'/# p \leq 0,05; **/'/'/## p \leq 0,01; ***/''''/### p \leq 0,001, ****/'''''/#### p \leq 0,0001; Two-Way Anova IFNe pro Konzentration, Tukey's Multiple Comparison Test.

4.1.2. ISG-Expression und Zellviabilität nach IFN-Stimulation in A549-Zellen

Zur weiteren Charakterisierung der antiviralen Aktivität der getesteten Typ I IFNe wurden Wildtyp A549-Zellen mit 100 ng/mL IFN α 2b oder 100 ng/mL IFN β 1b für jeweils 4 h, 8 h, 24 h, 48 h und 72 h stimuliert. Anschließend wurde mittels qPCR die mRNA-Expression vier exemplarischer ISGs (Mx1, OASL, ISG15 und RSAD2) bestimmt (siehe Kapitel 3.2.5.3.). Nach der Stimulation mit beiden Interferonen stieg die Expression der getesteten ISGs über die Zeit an (siehe Abbildung 4.2). Beide IFNe lösten, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle, eine ähnliche und signifikant erhöhte mRNA-Expression während der unterschiedlichen Zeitpunkte aus. So lag zum Beispiel die Expression von OASL nach einer Stimulation mit IFN α 2b für 8 h bei $9,44 \pm 0,66$ ($p=0,0016$) nach einer Stimulation mit IFN β 1b für 8 h bei $10,32 \pm 0,63$ ($p=0,0012$; alle Werte in $\log_2(\text{Fold Change})$).

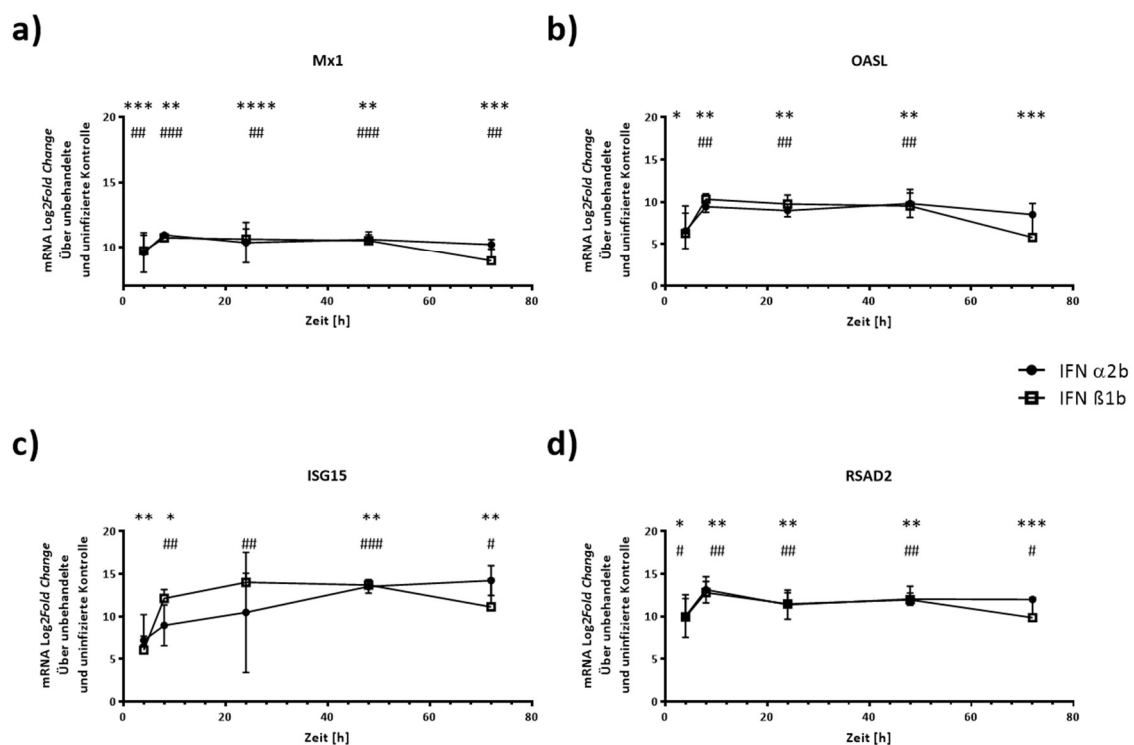


Abbildung 4.2: ISG-Expression nach IFN-Stimulation in A549-Zellen

A549-Zellen wurden für 4 h, 8 h, 24 h, 48 h und 72 h mit 100 ng/mL IFN α 2b oder 100 ng/mL IFN β 1b stimuliert. Anschließend erfolgte die Messung der mRNA-Expression der ISGs (MX1, OASL, ISG15, RSAD2) mittels qPCR; die relative Veränderung wurde gegenüber unbehandelten, uninfizierten Kontrollzellen bestimmt und gegen GAPDH normalisiert; Mittelwert \pm Standardabweichung, ($n=3$). a) mRNA-Expression von Mx1, b) mRNA-Expression von OASL, c) mRNA-Expression von ISG15, d) mRNA-Expression von RSAD2. * IFN α 2b vs. Kontrolle (theoretischer Wert = 0), # IFN β 1b vs. Kontrolle (theoretischer Wert = 0), Signifikanzniveau: */# $p \leq 0,05$; **/## $p \leq 0,01$, ***/### $p \leq 0,001$, ****/#### $p \leq 0,0001$; *One Sample t-Test* gegen Kontrolle (theoretischer Wert = 0).

Zusätzlich zur Bestimmung der ISG mRNA-Expression wurde die Zellviabilität von A549-Zellen nach der IFN-Stimulation gemessen. Dazu wurden A549-Zellen mit 1, 10, 50 und 100 ng/mL IFN α 2b oder IFN β 1b stimuliert. Nach jeweils 24 h und 48 h wurde die metabolische Zellaktivität mittels MTT-Assay bestimmt. Dabei wurde die Extinktion unbehandelter Zellen auf 100 % normalisiert und die Extinktion behandelter Zellen dazu ins Verhältnis gesetzt (siehe Kapitel 3.2.4.1.).

Im getesteten Konzentrationsbereich hatten weder IFN α 2b noch IFN β 1b einen signifikanten Einfluss auf die metabolische Aktivität der Zellen (siehe Abbildung 4.3).

In der Kollaboration mit dem Fraunhofer IGB wurde IFN β 1a in CHO (*chinese hamster ovary*)-Zellen hergestellt und für Experimente in der vorliegenden Arbeit zur Verfügung gestellt. Es sollte aus diesem Grund getestet werden, ob der protektive Effekt von IFN β 1b mit dem Effekt von IFN β 1a vergleichbar ist, um für weitere Experimente IFN β 1a verwenden zu können.

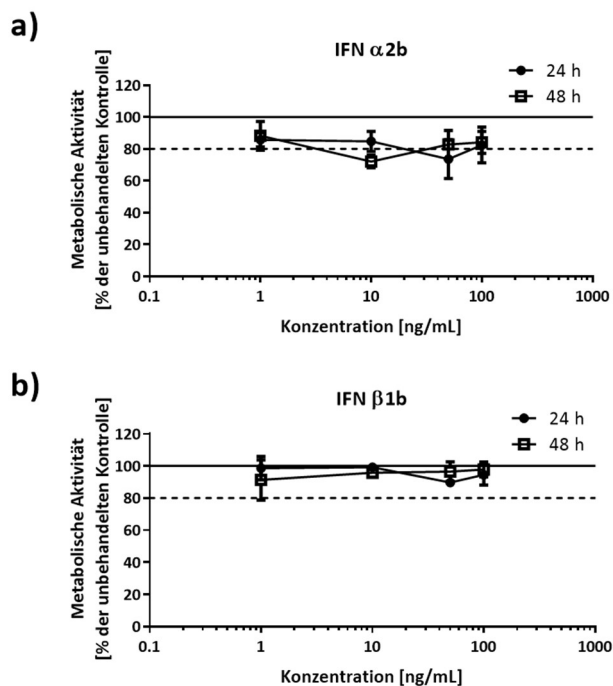


Abbildung 4.3: Metabolische Aktivität der A549-Zellen nach Stimulation mit unterschiedlichen IFN-Konzentrationen

A549-Zellen wurden für 24 h und 48 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von IFN α 2b oder IFN β 1b stimuliert. Mittels MTT-Assay wurde die metabolische Zellaktivität bestimmt; Mittelwert \pm Standardabweichung, (n=3). Die Extinktion unbehandelter Kontrollzellen fungierte als 100 % der metabolischen Aktivität (durchgängige Linie), über die die Viabilität der behandelten Zellen berechnet wurde; zytotoxische Wirkung ab einer Reduktion der metabolischen Zellaktivität um ≥ 20 % (gepunktete Linie), a) Metabolische Zellaktivität nach Stimulation mit IFN α 2b; b) Metabolische Zellaktivität nach Stimulation mit IFN β 1b.

4.2. Antiviraler Effekt von IFN β auf A549-Zellen während einer HRV-Infektion

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob eine Vorbehandlung mit IFN β 1b, beziehungsweise IFN β 1a, protektiv gegen eine HRV16-Infektion wirkt und die Viruslast reduziert wird.

Dazu wurden A549-Zellen für 24 h mit jeweils einer niedrigen (1 ng/mL) und einer hohen (100 ng/mL) Konzentration von IFN β 1b oder IFN β 1a stimuliert. So sollte gleichzeitig überprüft werden, ob eine IFN-Stimulation einen konzentrationsabhängigen Effekt aufwies. Anschließend erfolgte eine 2-stündige Inkubation mit HRV16 ohne IFN-haltiges Medium, bevor wiederum das HRV16-haltige Medium von den Zellen entfernt und erneut das vorher abgenommene IFN-haltige Medium zugegeben wurde. Nach einer 48-stündigen Inkubation wurde dann die Viruslast mittels qPCR (beschrieben in Kapitel 3.2.5.3.) und zusätzlich mit TCID₅₀ (beschrieben in Kapitel 3.2.2.2.) bestimmt.

Sichtbar wurde, dass sowohl die niedrigen, als auch die hohen Konzentrationen beider IFN β s in der Lage waren, die Viruslast in ähnlichem Maß zu reduzieren (siehe Abbildung 4.4). Die HRV16-infizierten Zellen ohne IFN-Vorbehandlung wiesen eine Viruslast von $9,91 \times 10^9 \pm 1,83 \times 10^9$ HRV-Kopien/200 ng RNA auf. Eine Vorbehandlung der Zellen mit 100 ng/mL IFN β 1a reduzierte die Viruslast auf $3,32 \times 10^7 \pm 2,64 \times 10^7$ HRV-Kopien/200 ng RNA ($p < 0,0001$, Mittelwert \pm Standardabweichung; siehe Abbildung 4.4 a). In davon unabhängigen Experimenten wurde eine vergleichbare Reduktion mit 100 ng/mL IFN β 1b-Stimulation festgestellt (-IFN/+HRV $1,05 \times 10^{10} \pm 7,75 \times 10^9$ HRV-Kopien/200 ng RNA vs. +100 ng/mL IFN β 1b/+HRV $1,77 \times 10^8 \pm 2,34 \times 10^8$ HRV-Kopien/200 ng RNA, $p=0,0143$, Mittelwert \pm Standardabweichung, siehe Abbildung 4.4 b).

Während nach einer Stimulation mit 1 ng/mL IFN β 1b ein Trend zur Reduktion der Viruslast im Vergleich zu unbehandelten, HRV16-infizierten Zellen festgestellt wurde (-IFN/+HRV $1,05 \times 10^{10} \pm 7,75 \times 10^9$ HRV-Kopien/200 ng RNA vs. 1 ng/mL IFN β 1b/+HRV $3,76 \times 10^9 \pm 5,52 \times 10^9$ HRV-Kopien/200 ng RNA, $p=0,0931$, Mittelwert \pm Standardabweichung), konnte durch die Stimulation mit 1 ng/mL IFN β 1a eine signifikante Reduktion um 98,35 % der Viruskopien im Vergleich zu unbehandelten, HRV16-infizierten Zellen nachgewiesen werden (-IFN/+HRV $9,91 \times 10^9 \pm 1,83 \times 10^9$ HRV-Kopien/200 ng RNA vs. 1 ng/mL IFN β 1a/+HRV $1,63 \times 10^8 \pm 2,45 \times 10^8$ HRV-Kopien/200 ng RNA, $p < 0,0001$, Mittelwert \pm Standardabweichung).

Mittels TCID₅₀ wurde die signifikante Reduktion von infektiösem HRV16 durch beide Konzentrationen IFN β 1a bestätigt. Nach Vorbehandlung mit 100 ng/mL IFN β 1b war ebenfalls ein Trend zur Reduktion sichtbar (IFN β 1a: -IFN/+HRV $6,90 \times 10^5 \pm 4,90 \times 10^5$ TCID₅₀/mL vs. 1 ng/mL IFN β 1a/+HRV $9,71 \times 10^3 \pm 1,57 \times 10^4$ TCID₅₀/mL, $p=0,0151$; bzw. 100 ng/mL IFN β 1a/+HRV

$1,55 \times 10^4 \pm 2,89 \times 10^4$ TCID₅₀/mL, $p=0,0158$; IFN β 1b: IFN/+HRV $7,17 \times 10^4 \pm 6,24 \times 10^4$ TCID₅₀/mL vs. 1 ng/mL IFN β 1b/+HRV $1,72 \times 10^4 \pm 1,96 \times 10^4$ TCID₅₀/mL, $p=0,241$; bzw. 100 ng/mL IFN β 1b/+HRV $6,62 \times 10^2 \pm 3,79 \times 10^2$ TCID₅₀/mL, $p=0,0948$), Mittelwert \pm Standardabweichung; siehe Abbildung 4.4 c und d).

Sowohl für die Bestimmung der Viruslast mittels qPCR als auch mittels TCID₅₀ waren die uninferierten Proben konstant negativ und werden aus diesem Grund nicht gezeigt.

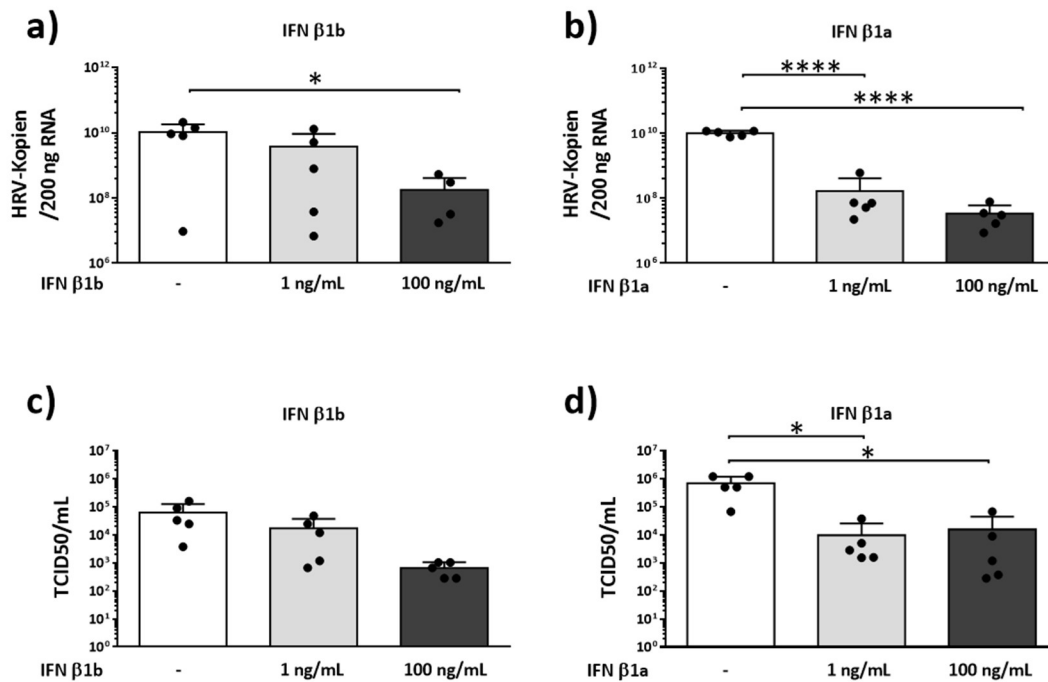


Abbildung 4.4: Viruslast in A549-Zellen nach IFN β -Stimulation

A549-Zellen wurden für 24 h mit 1 ng/mL oder 100 ng/mL IFN β 1a oder IFN β 1b vorbehandelt und anschließend für 48 h mit HRV16 infiziert. Die Bestimmung der HRV-Kopienzahl (a+b) erfolgte via qPCR und die Bestimmung der Anzahl infektiöser Partikel (c+d) erfolgte mittels TCID₅₀; Mittelwert \pm Standardabweichung, (n=5) a) HRV-Kopienzahl nach Stimulation mit IFN β 1b; b) HRV-Kopienzahl nach Stimulation mit IFN β 1a; c) Anzahl infektiöser Partikel nach Stimulation mit IFN β 1b (nicht signifikant); d) Anzahl infektiöser Partikel nach Vorbehandlung mit IFN β 1a; Signifikanzniveau: * $p \leq 0,05$; **** $p \leq 0,0001$; Two-Way ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test.

Um zu überprüfen, ob eine Behandlung mit 1 ng/mL und 100 ng/mL IFN β 1a oder IFN β 1b einen Einfluss auf die Zellviabilität hat, wurden zusätzlich A549-Zellen mit Lösungen beider IFN β s stimuliert. Anschließend wurden nach 24 h und 48 h MTT-Assays durchgeführt.

Deutlich wurde, dass die eingesetzte Konzentration von 100 ng/mL IFN β 1a nach 48 h mit $68,62 \pm 10,19$ % Zellviabilität einen Effekt auf die metabolische Aktivität der Zellen zeigte (siehe

Abbildung 4.5). Im Gegensatz dazu hatten die Stimulationen mit 1 ng/mL und 100 ng/mL IFN β 1b, beziehungsweise 1 ng/mL IFN β 1a weder nach 24 h noch nach 48 h einen nennenswerten Einfluss auf die Zellviabilität. Aufgrund der antiviralen Aktivität und der geringen Zytotoxizität wurde IFN β 1a in der Konzentration 1 ng/mL für weitere Versuche verwendet.

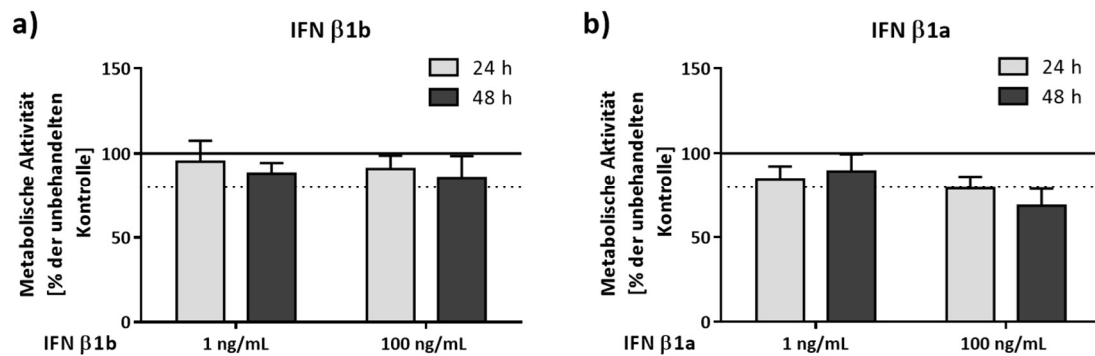


Abbildung 4.5: MTT nach 1 und 100 ng/mL IFN β -Stimulation in A549-Zellen

A549-Zellen wurden für 24 h und 48 h mit 1 ng/mL und 100 ng/mL IFN β 1b oder IFN β 1a stimuliert. Mittels MTT-Assay wurde die metabolische Zellaktivität bestimmt; Mittelwert \pm Standardabweichung, (n=5). Die Extinktion unbehandelter Kontrollzellen fungierte als 100 % der metabolischen Aktivität (durchgängige Linie), über die die Viabilität der behandelten Zellen berechnet wurde; zytotoxische Wirkung ab einer Reduktion der metabolischen Zellaktivität um ≥ 20 % (gepunktete Linie) a) Metabolische Zellaktivität nach Stimulation mit IFN β 1b; b) Metabolische Zellaktivität nach Stimulation mit IFN β 1a.

4.3. Primäre bronchiale Epithelzellen als Modell

Nachdem die antivirale Aktivität von IFN β 1a in A549-Zellen bestätigt werden konnte, wurden pBECs in ALI-Kultur als ein physiologisch relevanteres Modell für die folgenden Experimente verwendet. Mit Hilfe dieses Zellmodells war es nicht nur möglich die antivirale Aktivität von IFN zu analysieren, sondern auch den Effekt einer IFN-Behandlung während viraler und bakterieller Infektionen auf die Funktion der epithelialen Barriere zu beobachten.

Nach der Isolation aus Explantatgewebe (siehe Kapitel 3.2.1.2.2.) wurden die Zellen mittels Immunfluoreszenz charakterisiert (beschrieben in Kapitel 3.2.1.2.5.). Die Epithelzellen waren dabei positiv für den epithelialen Marker Cytokeratin-5 und den Basalzellmarker p63. Zum Ausschluss einer Kontamination mit Fibroblasten erfolgte zusätzlich eine Färbung mit TE-7, die jedoch in den verwendeten pBECs kein Signal aufwies (siehe Anhang, Abbildung 7.1 für ein Beispiel der Charakterisierung einer Zelllinie).

Um die Barrierefunktion untersuchen zu können, wurden die pBECs zunächst differenziert. Dafür wurden die Zellen, wie in Kapitel 3.2.1.2.6 beschrieben, kultiviert und nach Erreichen der Konfluenz im Insert in ALI-Kultur gebracht.

Als Indikator für die Differenzierung der Zellen wurde in regelmäßigen Abständen der TEER gemessen (beschrieben in Kapitel 3.2.1.2.7.). Der TEER ist dabei proportional zum interzellulären Zusammenhalt der ALI-Kulturen, wodurch indirekt auch der Differenzierungsgrad der Zellen gezeigt werden kann. Es konnte über die Zeit eine Zunahme des TEERs von 109,13 % (Vergleich Tag 9 und Tag 37) festgestellt werden. So lag der TEER der Kultur beispielsweise an Tag 9, nach Überführung der Zellen in ALI-Kultur, bei $423,32 \pm 55,50 \text{ Ohm} \cdot \text{cm}^2$, während er bereits an Tag 23 bei $595,83 \pm 105,94 \text{ Ohm} \cdot \text{cm}^2$ lag und sich an Tag 37 bei $885,32 \pm 21,39 \text{ Ohm} \cdot \text{cm}^2$ befand (Mittelwert \pm Standardabweichung; siehe Abbildung 4.6 a). Als weiterer Indikator für die Differenzierung der pBECs in ALI-Kultur wurde das Einsetzen der Zilienbewegung regelmäßig und vor jedem Waschen lichtmikroskopisch überprüft. So konnte im zeitlichen Verlauf, circa zwei bis drei Wochen nach dem Überführen der Zellen in ALI-Kultur, vereinzelte und nach circa vier Wochen eine flächige und koordinierte Zilienbewegung in den Inserts beobachtet werden. Dabei war von einer Differenzierung auszugehen, wenn sich die Zilien im gesamten Insert bewegten.

Zur weiteren Charakterisierung der Differenzierung wurden Semidünnschnitte der pBEC-haltigen Inserts im Institut für Anatomie und Zellbiologie der Philipps-Universität Marburg angefertigt, welche anschließend mit Methylenblau gefärbt wurden (beschrieben in Kapitel 3.2.9.). Dadurch konnten die vorhandenen Zilien deutlich dargestellt werden (siehe Abbildung 4.6 b).

Mit Hilfe von Durchflusszytometrie (beschrieben in Kapitel 3.2.10.2.3.) konnte außerdem

bestätigt werden, dass die Anzahl der Zilien-tragenden Zellen, wie bereits vorher im Lichtmikroskop beobachtet, über den zeitlichen Verlauf zunahm. So zeigten *acetylated* Alpha Tubulin-APC gefärbte Zellen an Tag 1 in ALI-Kultur keine positive Alpha Tubulin Population (0,4 % der Gesamtzellpopulation), an Tag 27 war dagegen eine eindeutig positive Alpha Tubulin Population sichtbar (22,7 % der Gesamtzellpopulation; siehe Abbildung 4.6 c). Die ungefärbten Kontrollzellen und die Isotypen Kontrolle blieben immer ohne Signal (0,0 % der Gesamtzellpopulation), so dass von einer spezifischen Färbung ausgegangen werden konnte.

Während der Kultivierung der pBECs als ALI-Kulturen differenzierte ein Teil der Zellen zu Mukus-produzierenden Becherzellen. Der abgegebene Mukus, der das Glykoprotein Muzin 5AC enthielt, konnte nach einigen Tagen der Kultivierung auf der apikalen Seite der pBECs in ALI-Kultur beobachtet werden. Apikale Muzin 5AC-Ausscheidung wurde mit Hilfe von *Dot-Blots* (beschrieben in Kapitel 3.2.1.2.9.) nachgewiesen. Ab Tag 7 konnte Muzin 5AC im *Dot-Blot* gezeigt werden und war ab diesem Tag zu jedem gemessenen Zeitpunkt nachweisbar (siehe Abbildung 4.6 d).

Da Experimente durchgeführt werden sollten, die die epitheliale Barriere betrafen, wurde zusätzlich die *Tight Junction*-Ausbildung in differenzierten pBECs in ALI-Kultur untersucht. Dazu wurden die primären Zellen nach ihrer bestätigten Differenzierung, wie in Kapitel 3.2.8.1. beschrieben, gegen ZO-1 und p63 immunfluoreszenzgefärbt und mittels KLSM analysiert. Durch die Färbung gegen ZO-1 wurde die Ausbildung der *Tight Junctions* sichtbar (siehe Abbildung 4.6 e). Die DAPI-Färbung konnte, aufgrund unspezifischer Färbung der Polyester-Membran des TC-Inserts, nicht als Zellmarker genutzt werden. Deswegen fungierte der Marker für basale Zellen, p63, als Kontrolle für vorhandene basale Zellen in den Inserten.

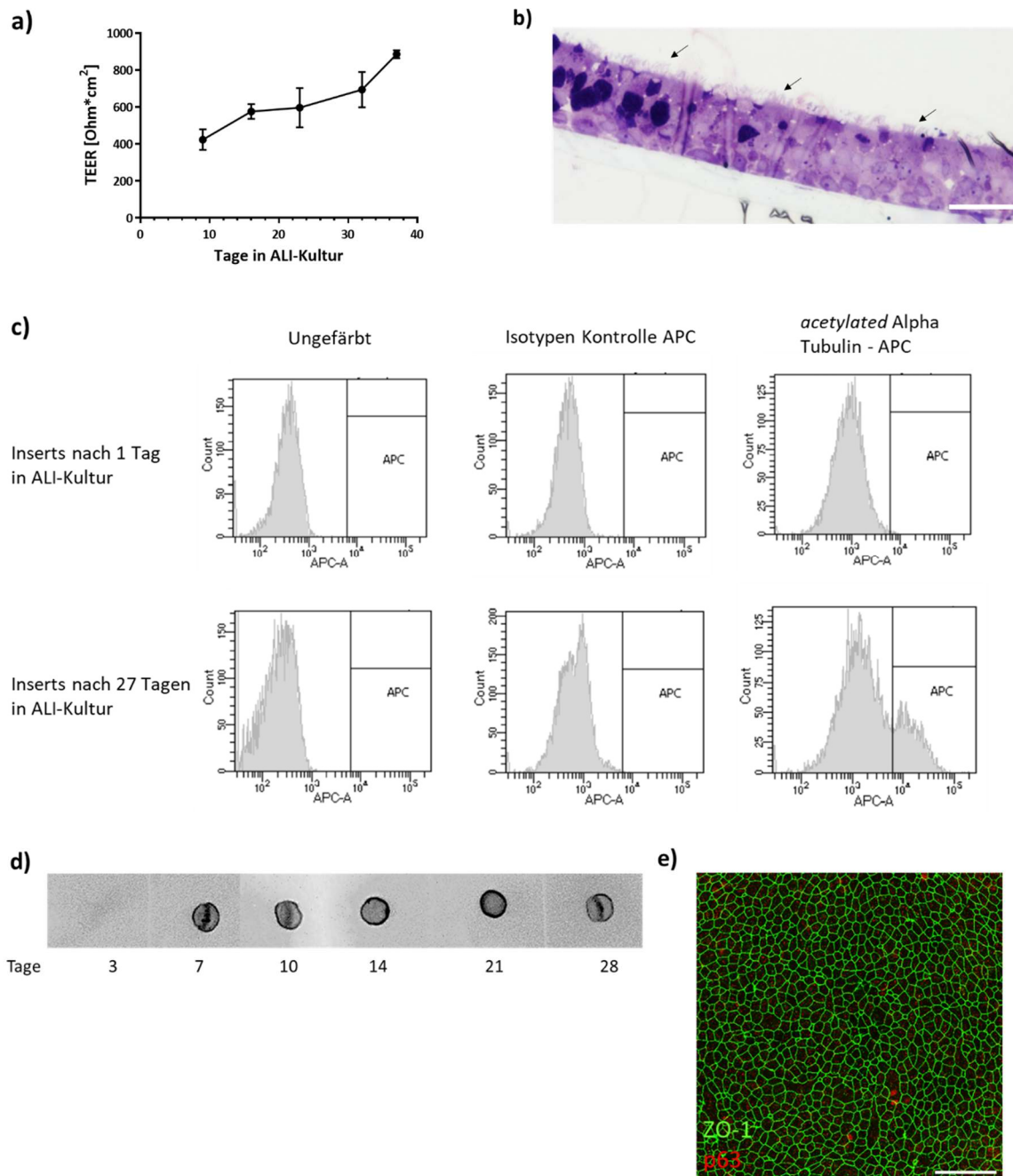


Abbildung 4.6: Charakterisierung primärer bronchialer Epithelzellen in Ali-Kultur

Nachweis der Differenzierung der pBECs mit unterschiedlichen Methoden. Repräsentative Ergebnisse der Zellen eines Spenders. a) Zunahme des transepithelialen Widerstands über die Zeit; b) Semidünnschnitt eines pBEC-Inserts mit Methyleneblau-Färbung, Maßstabsbalken: 0,5 μm , Zilien markiert durch Pfeile; c) Durchflusszytometrische Analyse von 1 Tag und 27 Tage alten pBECs in ALI-Kultur gefärbt mit *acetylated* Alpha Tubulin-APC; d) Muzin 5AC-*Dot-Blot* zur Verifizierung von Mukus-produzierenden Becherzellen über die Zeit; e) KLSM-Aufnahme von pBECs in ALI-Kultur, sichtbares *Tight Junction*-Netz durch ZO-1-Färbung (grün), basale Zellen sind über p63 angefärbt (rot); Maßstabsbalken: 50 μm .

4.4. Antiviraler Effekt von IFN β auf primäre bronchiale Epithelzellen während einer HRV-Infektion

Um das Ergebnis des protektiven Effekts einer IFN β 1a-Stimulation während einer HRV16-Infektion im physiologisch relevanten Modell, den primären bronchialen Epithelzellen, zu verifizieren, wurden diese Zellen ebenfalls mit IFN β 1a stimuliert. Die in A549-Zellen ausgewählte Konzentration von 1 ng/mL IFN β 1a wurde auf die Zellzahl der pBECs in ALI-Kultur (2×10^6 Zellen/Insert) angepasst, so dass diese für 24 h apikal mit 1.600 ng IFN β 1a in PBS stimuliert wurden. Anschließend wurde der restliche IFN-Überstand entfernt und die Zellen wurden apikal für 2 h mit HRV16 (MOI 1) infiziert, bevor auch dieser virushaltige Überstand abgenommen und anschließend 1.000 ng frisches IFN β 1a in PBS apikal zu den Zellen zugegeben wurde (siehe Abbildung 3.5 für eine Übersicht des zeitlichen Ablaufs der Experimente). In jedem Experiment wurden zusätzlich zu den unbehandelten, HRV16-infizierten Zellen sowie den IFN β 1a-behandelten, HRV16-infizierten Zellen, unbehandelte, uninfizierte Kontrollzellen und IFN β 1a-behandelte, uninfizierte Zellen mitgeführt.

Nach 24 h, 48 h und 72 h wurden die Viruslast, die Expression eines exemplarischen ISGs, die Zellviabilität und Konzentrationen ausgewählter Zytokine bestimmt. Alle hier beschriebenen Versuche erfolgten mit Zellen von jeweils vier unterschiedlichen Spendern (n=4; siehe Material Kapitel 3.1.1., Tabelle 3.2).

4.4.1. Protektiver Effekt von IFN β in HRV-infizierten primären bronchialen Epithelzellen

Nach der Messung der Anzahl viraler Kopien durch qPCR zeigte sich, dass eine Vorbehandlung mit IFN β 1a die Viruskopien zu allen Zeitpunkten (24 h bis 72 h nach HRV16-Infektion) signifikant um bis zu 99,9 % verringerte (24 h: -IFN β 1a/+ HRV $6,63 \times 10^9 \pm 1,28 \times 10^9$ HRV-Kopien/200 ng RNA vs. +IFN β 1a/+HRV $5,29 \times 10^6 \pm 6,18 \times 10^6$ HRV-Kopien/200 ng RNA, p=0,021; 48 h: -IFN β 1a/+ HRV $4,56 \times 10^8 \pm 8,81 \times 10^8$ HRV-Kopien/200 ng RNA vs. +IFN β 1a/+HRV $4,39 \times 10^5 \pm 8,11 \times 10^5$ HRV-Kopien/200 ng RNA, p=0,004; 72 h: -IFN β 1a/+ HRV $1,47 \times 10^8 \pm 2,85 \times 10^8$ HRV-Kopien/200 ng RNA vs. +IFN β 1a/+HRV $1,70 \times 10^5 \pm 1,78 \times 10^5$ HRV-Kopien/200 ng RNA, p=0,013, Mittelwert \pm Standardabweichung; siehe Abbildung 4.7 a)

Dieses Ergebnis wurde durch die Bestimmung der Anzahl der infektiösen Partikel mittels TCID₅₀ bestätigt. Auch hier zeigte sich eine signifikante Reduktion um bis zu 99,9 % der Viruspartikel durch eine IFN β 1a-Vorbehandlung an allen überprüften Zeitpunkten (24 h: -IFN β 1a/+ HRV $1,45 \times 10^5 \pm 1,39 \times 10^5$ TCID₅₀/mL vs. +IFN β 1a/+HRV $1,42 \times 10^1 \pm 1,17 \times 10^1$ TCID₅₀/mL, $p=0,002$; 48 h: -IFN β 1a/+HRV $7,42 \times 10^4 \pm 9,33 \times 10^4$ TCID₅₀/mL vs. +IFN β 1a/+HRV $6,87 \times 10^0 \pm 1,53 \times 10^0$ TCID₅₀/mL, $p=0,002$; 72 h: -IFN β 1a/+ HRV $1,96 \times 10^4 \pm 2,11 \times 10^4$ TCID₅₀/mL vs. +IFN β 1a/+HRV $4,40 \times 10^0 \pm 3,50 \times 10^1$ TCID₅₀/mL, $p=0,003$, Mittelwert \pm Standardabweichung; siehe Abbildung 4.7 b)

In den nicht-HRV16 infizierten Proben konnten weder virale RNA noch infektiöse Partikel nachgewiesen werden. Aus diesem Grund werden diese Bedingungen hier nicht gezeigt.

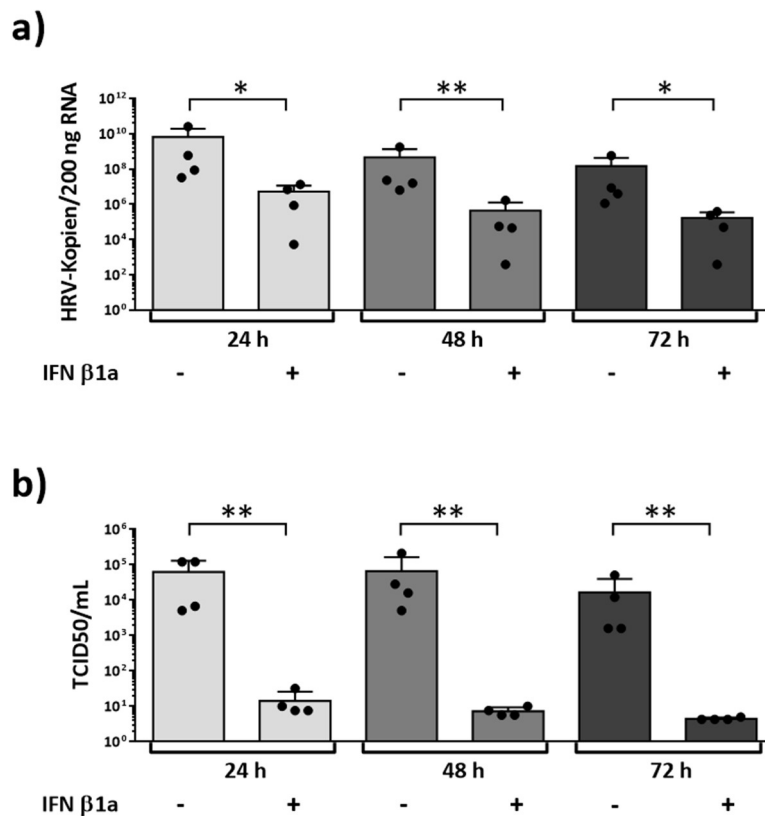


Abbildung 4.7: Viruslast von differenzierten pBECs in ALI-Kultur nach IFN β 1a-Stimulation und HRV16-Infektion für 24 h - 72 h

Differenzierte pBECs in ALI-Kultur wurden für 24 h mit 1.600 ng IFN β 1a stimuliert, anschließend für 2 h mit HRV16 infiziert, bevor erneut 1.000 ng IFN β 1a zugegeben wurde. Nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation wurde mittels a) qPCR die HRV-Kopienzahl und b) via TCID₅₀ die Anzahl infektiöser Partikel bestimmt; Mittelwert \pm Standardabweichung, (n=4). Signifikanzniveau: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; Werte wurden für die statistische Auswertung Log10 transformiert, pro Zeitpunkt: gepaarter t-Test, zweiseitig.

4.4.2. ISG-Expression nach IFN β -Vorbehandlung in primären bronchialen Epithelzellen

Zur zusätzlichen Prüfung der antiviralen Aktivität von IFN β 1a nach HRV16-Infektion wurde exemplarisch die mRNA-Expression des Interferon-stimulierten Gens OASL mittels qPCR überprüft.

Deutlich wurde ein Anstieg von OASL an allen drei überprüften Zeitpunkten in den unbehandelten, HRV16-infizierten Zellen (alle Werte in $\log_2(\text{Fold Change})$; 24 h: $14,70 \pm 0,90$; 48 h: $10,24 \pm 1,62$; 72 h: $7,37 \pm 3,75$, Mittelwert \pm Standardabweichung), sowie in den IFN β 1a-behandelten, uninfizierten Zellen (24 h: $10,02 \pm 3,26$; 48 h: $10,92 \pm 0,59$; 72 h: $9,62 \pm 2,68$) und in den IFN β 1a-behandelten, HRV16-infizierten Zellen (24 h: $12,19 \pm 1,70$; 48 h: $8,80 \pm 2,41$; 72 h: $6,46 \pm 3,40$, Mittelwert \pm Standardabweichung; siehe Abbildung 4.8). Die mRNA-Expression der unbehandelten, HRV16-infizierten Zellen und der IFN β 1a-behandelten, HRV16-infizierten Zellen waren zu allen Zeitpunkten ähnlich.

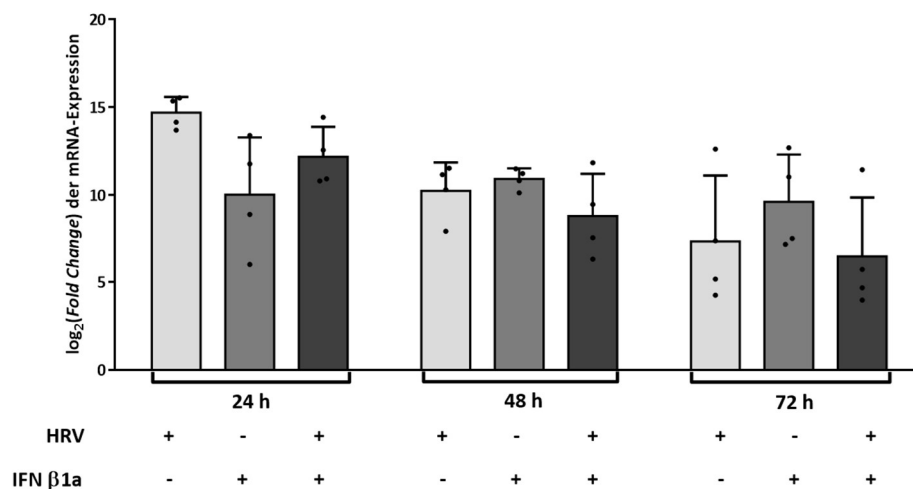


Abbildung 4.8: mRNA-Expression von OASL in differenzierten pBECs in ALI-Kultur nach IFN β 1a-Stimulation und HRV16-Infektion

Differenzierte pBECs in ALI-Kultur wurden für 24 h mit 1.600 ng IFN β 1a stimuliert, anschließend für 2 h mit HRV16 infiziert, bevor erneut 1.000 ng IFN β 1a zugegeben wurde. Nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation erfolgte die Bestimmung der mRNA-Expression von OASL mittels qPCR; die relative Veränderung wurde gegenüber unbehandelten, uninfizierten Kontrollzellen berechnet und gegen GAPDH normalisiert; Mittelwert \pm Standardabweichung, (n=4). Signifikanzniveau: nicht signifikant; *Two-Way ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test*.

4.4.3. Zellviabilität von IFN β -stimulierten und HRV16-infizierten primären bronchialen Epithelzellen

Die Zellviabilität der pBECs in ALI-Kultur nach der Stimulation mit IFN β 1a und HRV16-Infektion wurde mittels LDH-Assays und *LIVE/DEAD*-Assays bestimmt.

Der LDH-Assay wurde vor der Infektion mit HRV16 (Zeitpunkt 0 h), sowie 24 h, 48 h und 72 h nach der HRV16-Infektion durchgeführt (siehe Abbildung 3.5 für einen zeitlichen Verlauf der Experimente). Die Zellen zeigten durch die Vorbehandlung mit IFN β 1a und vor der HRV16-Infektion (Zeitpunkt 0 h), keinerlei Veränderung in ihrer Zellviabilität. Allerdings konnte bereits 24 h nach HRV16-Infektion eine vermehrte Freisetzung von LDH in unbehandelten, HRV16-infizierten Zellen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.9 a). Diese erhöhte LDH-Freisetzung war zu allen Zeitpunkten nach HRV16-Infektion signifikant nachweisbar, verglichen mit unbehandelten, uninfizierten Kontrollzellen (LDH; 24 h: -IFN β 1a/+HRV OD₄₅₈ 0,25 \pm 0,09 vs. -IFN β 1a/-HRV OD₄₅₈ 0,02 \pm 0,02, p=0,002; 48h: -IFN β 1a/+HRV OD₄₅₈ 0,39 \pm 0,13 vs. -IFN β 1a/-HRV OD₄₅₈ 0,03 \pm 0,02, p<0,0001; 72 h: -IFN β 1a/+HRV OD₄₅₈ 0,46 \pm 0,21 vs. -IFN β 1a/-HRV OD₄₅₈ 0,03 \pm 0,01, p<0,0001, Mittelwert \pm Standardabweichung). Nach 48 h und 72 h wurde zusätzlich ein signifikanter Unterschied zwischen den unbehandelten, HRV16-infizierten Zellen und IFN β 1a-behandelten, HRV16-infizierten Zellen nachgewiesen (48h: -IFN β 1a/+HRV OD₄₅₈ 0,39 \pm 0,13 vs. +IFN β 1a/+HRV OD₄₅₈ 0,11 \pm 0,04, p=0,0001; 72 h: -IFN β 1a/+HRV OD₄₅₈ 0,46 \pm 0,21 vs. +IFN β 1a/+HRV OD₄₅₈ 0,10 \pm 0,02, p<0,0001, Mittelwert \pm Standardabweichung).

Bestätigt wurden diese Ergebnisse mit einem zusätzlichen Toxizitäts-Assay, dem *LIVE/DEAD*-Assay, der 24 h, 48 h und 72 h nach HRV16-Infektion durchgeführt wurde.

So konnte im Vergleich mit den unbehandelten, uninfizierten Kontrollzellen nach 72 h eine signifikante Erhöhung um 98,06 % des Anteils toter Zellen in unbehandelten, HRV16-infizierten Zellen festgestellt werden (*LIVE/DEAD*-Assay; 72 h: -IFN β 1a/+HRV 25,65 \pm 7,36 % toter Zellen vs. -IFN β 1a/-HRV 12,95 \pm 4,58 % toter Zellen, p=0,012, Mittelwert \pm Standardabweichung). Auch im Vergleich zu IFN β 1a-behandelten, HRV16-infizierten Zellen war diese signifikante Erhöhung in den unbehandelten, HRV16-infizierten Zellen nachweisbar (72 h: -IFN β 1a/+HRV 25,65 \pm 7,36 % toter Zellen vs. +IFN β 1a/+HRV 11,86 \pm 3,85 % toter Zellen, p=0,005, Mittelwert \pm Standardabweichung; siehe Abbildung 4.9 b).

Die Zellviabilität der IFN β 1a-behandelten Zellen mit und ohne Virus war zu jedem Zeitpunkt ähnlich zu der der unbehandelten, uninfizierten Kontrollzellen, es konnte innerhalb dieser Bedingungen keine Zytotoxizität nachgewiesen werden.

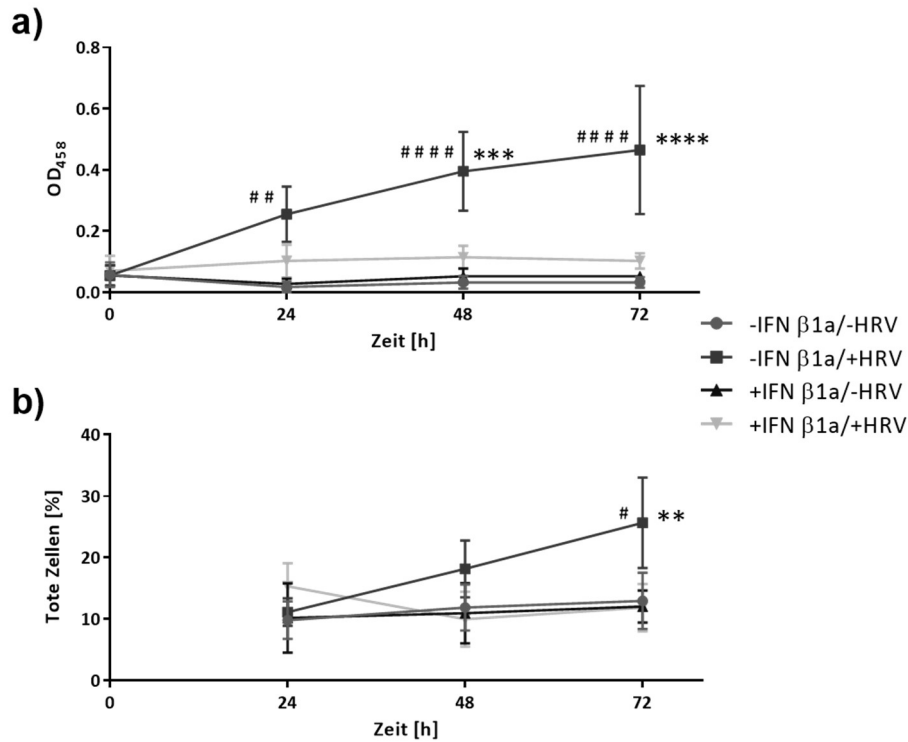


Abbildung 4.9: Zellviabilität von differenzierten pBECs in ALI-Kultur nach IFN β 1a-Stimulation und HRV16-Infektion

Differenzierte pBECs in ALI-Kultur wurden für 24 h mit 1.600 ng IFN β 1a stimuliert, anschließend für 2 h mit HRV16 infiziert, bevor erneut 1.000 ng IFN β 1a zugegeben wurde. An unterschiedlichen Zeitpunkten wurde die Zellviabilität der Zellen mit einem LDH- und einem *LIVE/DEAD*-Assay bestimmt; Mittelwert \pm Standardabweichung, (n=4). a) Ergebnisse des LDH-Assays an den Zeitpunkten 0 h vor und 24 h, 48 h, 72 h nach HRV16-Infektion. b) Ergebnisse des *LIVE/DEAD*-Assays nach 24 h, 48 h und 72 h HRV16-Infektion. Signifikanzniveau: * -IFN β 1a/+HRV vs. +IFN β 1a/+HRV, # -IFN β 1a/+HRV vs. -IFN β 1a/-HRV ; */# $p \leq 0,05$; **/## $p \leq 0,01$; ***/### $p \leq 0,001$; ****/#### $p \leq 0,0001$; *Three-Way ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test, Matching Faktor= Zeit.*

4.4.4. Zytokinbestimmung in IFN β -stimulierten und HRV-infizierten primären bronchialen Epithelzellen

Um die HRV-induzierte Entzündungsantwort in pBECs in ALI-Kultur zu untersuchen, wurden unterschiedliche Zytokine (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IP-10, TGF- β 1 und TNF- α) in den basalen Medien der ALI-Kulturen nach IFN β 1a-Stimulation und HRV16-Infektion gemessen. Die Konzentrationen von TGF- β 1, IL-1 β und IL-10 im basalen Medium lagen in allen gemessenen Proben unterhalb der Nachweis-, beziehungsweise quantitative Nachweisgrenze (LLOQ = 10 pg/mL).

Die unbehandelten, HRV16-infizierten Zellen zeigten im Vergleich mit den unbehandelten, uninfizierten Kontrollzellen einen signifikanten Anstieg der IL-8-Konzentrationen um das 2,99-fache nach 24 h, um das 2,44-fache nach 48 h und um das 1,83-fache nach 72 h (IL-8, 24 h: -IFN β 1a/+HRV 17883 ± 2342 pg/mL vs. -IFN β 1a/-HRV 4471 ± 1818 pg/mL, $p=0,0003$; 48 h: -IFN β 1a/+HRV 21947 ± 741 pg/mL vs. -IFN β 1a/-HRV 6369 ± 1500 pg/mL, $p<0,0001$; 72 h: -IFN β 1a/+HRV 22237 ± 940 pg/mL vs. -IFN β 1a/-HRV 7856 ± 2101 pg/mL, $p<0,0001$, Mittelwert \pm Standardabweichung; siehe Abbildung 4.10 a).

Nach IFN β 1a-Behandlung war eine signifikante Reduktion der IL-8-Konzentrationen um das 0,60-fache nach 24 h, um das 0,57-fache nach 48 h und um das 0,55-fache nach 72 h nachweisbar (IL-8, 24 h: -IFN β 1a/+HRV 17883 ± 2342 pg/mL vs. +IFN β 1a/+HRV 7020 ± 2782 pg/mL, $p=0,0038$; 48 h: -IFN β 1a/+HRV 21947 ± 741 pg/mL vs. +IFN β 1a/+HRV 9413 ± 3095 pg/mL, $p=0,0006$; 72 h: -IFN β 1a/+HRV 22237 ± 940 pg/mL vs. +IFN β 1a/+HRV 9819 ± 4886 pg/mL, $p=0,0007$, Mittelwert \pm Standardabweichung).

Die IL-6 Konzentration in den basalen Medien unbehandelter, HRV16-infizierter Zellen war, im Vergleich zu den unbehandelten, uninfizierten Kontrollzellen, nach 72 h signifikant um das 69,58-fache erhöht (IL-6, 72 h: -IFN β 1a/+HRV $1362,96 \pm 1761,31$ pg/mL vs. -IFN β 1a/-HRV $19,31 \pm 20,24$ pg/mL, $p=0,0154$, Mittelwert \pm Standardabweichung; siehe Abbildung 4.10 b).

Nach 72 h HRV16-Infektion wurde nach IFN β 1a-Behandlung eine um das 0,98-fache signifikant geringere IL-6-Konzentration als in den unbehandelten, HRV16-infizierten Zellen festgestellt (IL-6, 72 h: -IFN β 1a/+HRV $1362,96 \pm 1761,31$ pg/mL vs. +IFN β 1a/+HRV $22,89 \pm 30,83$ pg/mL, $p=0,0158$).

Die IP-10-Konzentrationen waren in den Medien unbehandelter, HRV16-infizierter Zellen im Vergleich zu unbehandelten, uninfizierter Kontrollzellen nach 24 h um das 135,50-fache, nach 48 h um das 69,99-fache und nach 72 h um das 43,36-fache signifikant erhöht (IP-10, 24 h: -IFN β 1a/+HRV $4258,90 \pm 1219,50$ pg/mL vs. -IFN β 1a/-HRV $31,20 \pm 8,36$ pg/mL,

$p < 0,0001$; 48 h: -IFN β 1a/+HRV $3412,79 \pm 583,56$ pg/mL vs. -IFN β 1a/-HRV $48,07 \pm 18,79$ pg/mL, $p = 0,0018$; 72 h: -IFN β 1a/+HRV $3698,35 \pm 610,90$ pg/mL vs. -IFN β 1a/-HRV $83,37 \pm 47,51$ pg/mL, $p = 0,0007$, Mittelwert \pm Standardabweichung; siehe Abbildung 4.10 c).

Die IP-10 Konzentration der unbehandelten, HRV16-infizierten Zellen waren an allen Zeitpunkten ähnlich zur IP-10-Konzentration der IFN β 1a-behandelten Zellen mit und ohne HRV16-Infektion.

Die TNF- α -Konzentrationen lagen an allen Zeitpunkten unterhalb der LLoQ. Nur eine Infektion mit HRV16 führte, im Vergleich zu den unbehandelten, uninfizierten Kontrollzellen, zu einem signifikanten Anstieg der TNF- α -Konzentration über das Quantifikationslimit nach 24 h und 48 h (TNF- α , 24 h: -IFN β 1a/+HRV $15,87 \pm 7,26$ pg/mL, $p < 0,0001$; 48 h: -IFN β 1a/+HRV $13,87 \pm 4,66$ pg/mL, $p = 0,0002$; siehe Abbildung 4.10 d).

Nach einer Behandlung mit IFN β 1a wurde nach 24 h eine um das 0,68-fache und nach 48 h eine um das 0,63-fache signifikant geringere TNF- α -Konzentration beobachtet (TNF- α , 24 h: -IFN β 1a/+HRV $15,87 \pm 7,26$ pg/mL vs. +IFN β 1a/+HRV $5,00 \pm 0,0$ pg/mL, $p < 0,0001$; 48 h: -IFN β 1a/+HRV $13,87 \pm 4,66$ pg/mL vs. +IFN β 1a/+HRV $5,00 \pm 0,0$ pg/mL, $p = 0,0002$, Mittelwert \pm Standardabweichung).

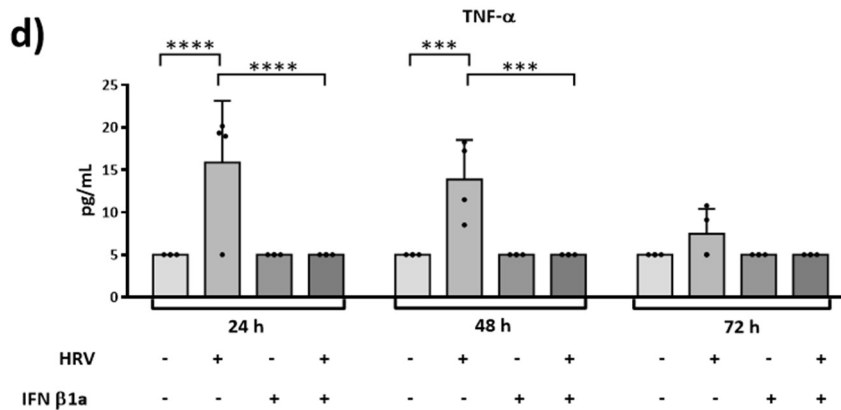
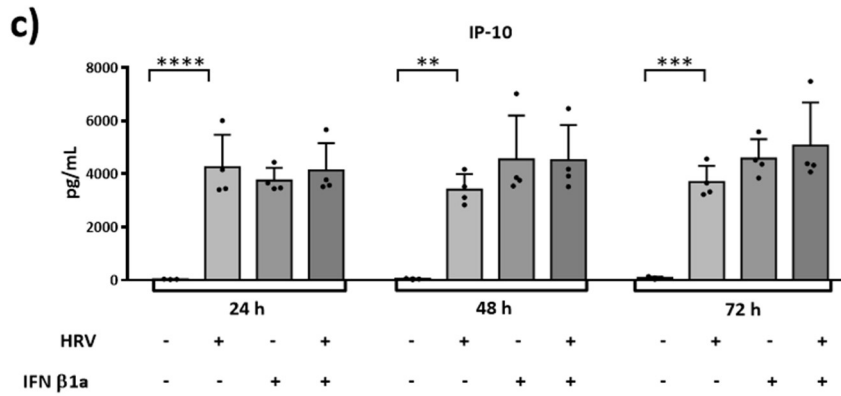
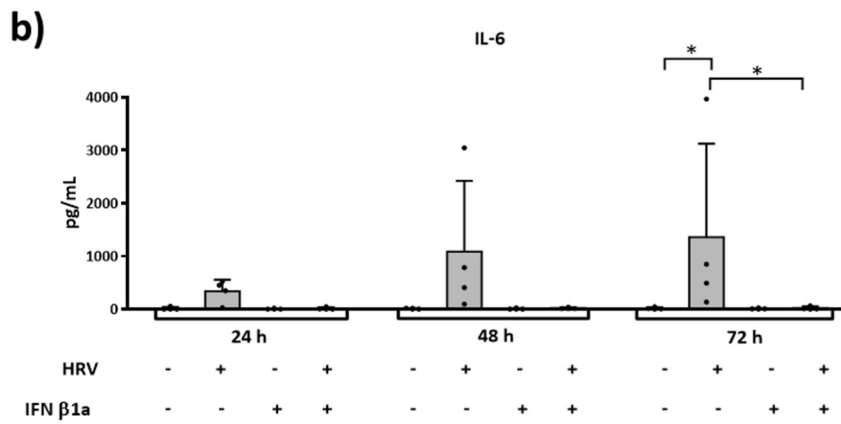
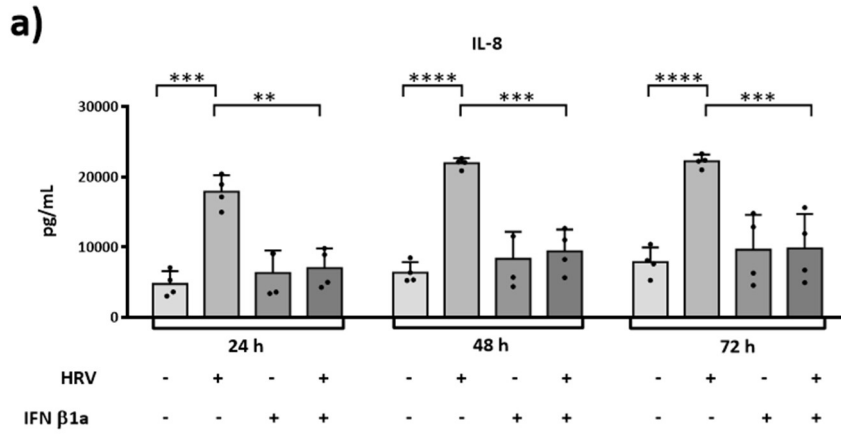


Abbildung 4.10: Zytokinkonzentrationen in basalen Medien von differenzierten pBECs in ALI-Kultur nach IFN β 1a-Stimulation und HRV16-Infektion

Abbildung auf Seite 85. Differenzierte pBECs in ALI-Kultur wurden für 24 h mit 1.600 ng IFN β 1a stimuliert, anschließend für 2 h mit HRV16 infiziert, bevor erneut 1.000 ng IFN β 1a zugegeben wurde. Nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation wurden mittels CBA die Proteinkonzentrationen der Zytokine a) IL-8, b) IL-6, c) IP-10 und d) TNF- α in den basalen Medien bestimmt; Mittelwert \pm Standardabweichung, (n=4). LLoQ = 10 pg/mL, alle Werte unterhalb der Grenze wurden mit 0,5 x 10 pg/mL ersetzt. Signifikanzniveau: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$; *Two-Way ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test.*

4.5. Effekt von IFN β auf die *Tight Junctions* und die Barrierefunktion primärer bronchialer Epithelzellen während einer HRV-Infektion

4.5.1. Effekt einer HRV-Infektion auf die *Tight Junctions* differenzierter primärer bronchialer Epithelzellen

Nach der Infektion differenzierter pBECs in ALI-Kultur mit HRV16 (MOI 1) für 48 h, wurden die Zellen gegen ZO-1, zur Analyse von *Tight Junctions*, und gegen p63, als Marker für basale Zellen, immunfluoreszenzgefärbt (beschrieben in Kapitel 3.2.8.1.). Nach dem Eindecken der Zellen mit DAPI-haltigem Eindeckmedium wurden sie mit Hilfe eines KLSM analysiert. Aus den KLSM-Aufnahmen wurden dann mit Hilfe von Fiji ImageJ sogenannte Z-Stapel generiert (siehe Kapitel 3.2.8.2.).

Durch die ZO-1-Färbung konnte die netzartige Struktur der *Tight Junctions* in uninfizierten ALI-Kulturen gezeigt werden (siehe Abbildung 4.11, links). Im Vergleich dazu war nach HRV16-Infektion die netzartige Struktur der *Tight-Junctions* der pBECs in ALI-Kultur nicht mehr vollständig und teilweise dissoziiert (siehe Abbildung 4.11, rechts).

Beim Zusammenfügen der einzelnen Bilder zu einem Z-Stapel, überstrahlte das im Eindeckmedium enthaltene DAPI, vermutlich durch eine unspezifische Färbung der TC-Insert-Membran, die Aufnahmen und es konnten keine einzelnen Zellkerne identifiziert werden (siehe Anhang, Abbildung 7.2 für ein Beispiel). Aus diesem Grund wird die DAPI-Fluoreszenz hier nicht gezeigt.

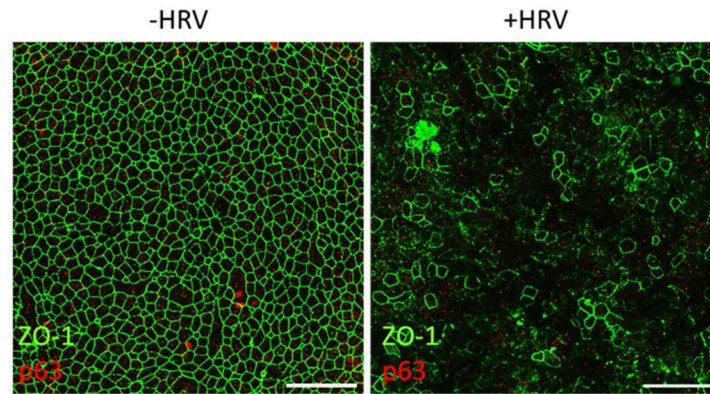


Abbildung 4.11: Dissoziierte *Tight Junctions* nach 48-stündiger HRV16-Infektion

Differenzierte pBECs in ALI-Kultur wurden für 48 h mit HRV16 infiziert. Die Zellen wurden fixiert, gegen ZO-1 und p63 immunfluoreszenzgefärbt und mittels KLSM analysiert. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen aus sechs unabhängigen Experimenten. Links: Zellen ohne HRV16-Infektion, rechts: Zellen mit HRV16-Infektion; Maßstabsbalken: 50 μm ; *Tight Junctions* (grün, ZO-1 markiert), basale Zellen (rot, p63 markiert).

4.5.2. Protektiver Effekt von IFN β auf die Barrierefunktion primärer bronchialer Epithelzellen während einer HRV-Infektion

Im nächsten Schritt wurden die Auswirkungen einer IFN β 1a-Vorbehandlung auf *Tight Junctions* und die Barrierefunktion HRV16-infizierter pBECs in ALI-Kultur analysiert.

Dazu wurden differenzierte pBECs in ALI-Kultur mit 1.600 ng IFN β 1a vorbehandelt, anschließend mit HRV16 infiziert, bevor nach der Abnahme des Virus, die erneute Gabe von 1.000 ng IFN β 1a erfolgte (siehe Abbildung 3.5 für eine Übersicht des zeitlichen Ablaufs der Experimente). 24 h, 48 h und 72 h nach HRV16-Infektion wurden mittels Immunfluoreszenz (beschrieben in Kapitel 3.2.8.1.) die *Tight Junctions* und deren Fläche (siehe Kapitel 3.2.8.4.) analysiert. Zu allen drei Zeitpunkten wurde die mRNA-Expression von *Tight* und *Adherence Junction* Proteinen und unterschiedlichen Zellmarkern bestimmt sowie Messungen zur Überprüfung der Barrierefunktion durchgeführt. Zusätzlich wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen der pBECs in ALI-Kultur angefertigt (beschrieben in Kapitel 3.2.9.).

Um zu überprüfen, ob die gezeigten Effekte auf die epitheliale Barriere auf einer viralen Infektion beruhten, wurden parallel zum oben beschriebenen Protokoll pBECs in ALI-Kultur mit UV-inaktiviertem HRV16 stimuliert. Diese Stimulation zeigte weder einen Effekt auf die ZO-1 gefärbten *Tight Junctions*, noch wurde ein Effekt auf die Zellviabilität oder die Funktion der Barriere durch eine UV-inaktivierte HRV16-Stimulation sichtbar. Somit konnte nachgewiesen werden, dass alle gezeigten Effekte durch die virale Infektion hervorgerufen wurden.

4.5.2.1. Effekt von IFN β -Stimulation und HRV-Infektion auf die *Tight Junctions* primärer bronchialer Epithelzellen

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse unbehandelter, uninfizierter Kontrollzellen sowie IFN β 1a-behandelter, uninfizierter Zellen zeigte zu allen Zeitpunkten intakte ZO-1-positive *Tight Junctions*.

In unbehandelten, HRV16-infizierten Zellen wurden nach 24 h ebenfalls intakte *Tight Junctions* nachgewiesen. Nach 48 h und 72 h wurde in diesen Zellen allerdings eine Dissoziation der netzartigen Strukturen der ZO-1 gefärbten *Tight Junctions* festgestellt.

Im Gegensatz dazu waren die netzartigen Strukturen ZO-1-positiven *Tight Junctions* in IFN β 1a-behandelten und HRV16-infizierten Zellen zu allen Zeitpunkten intakt (siehe Abbildung 4.12).

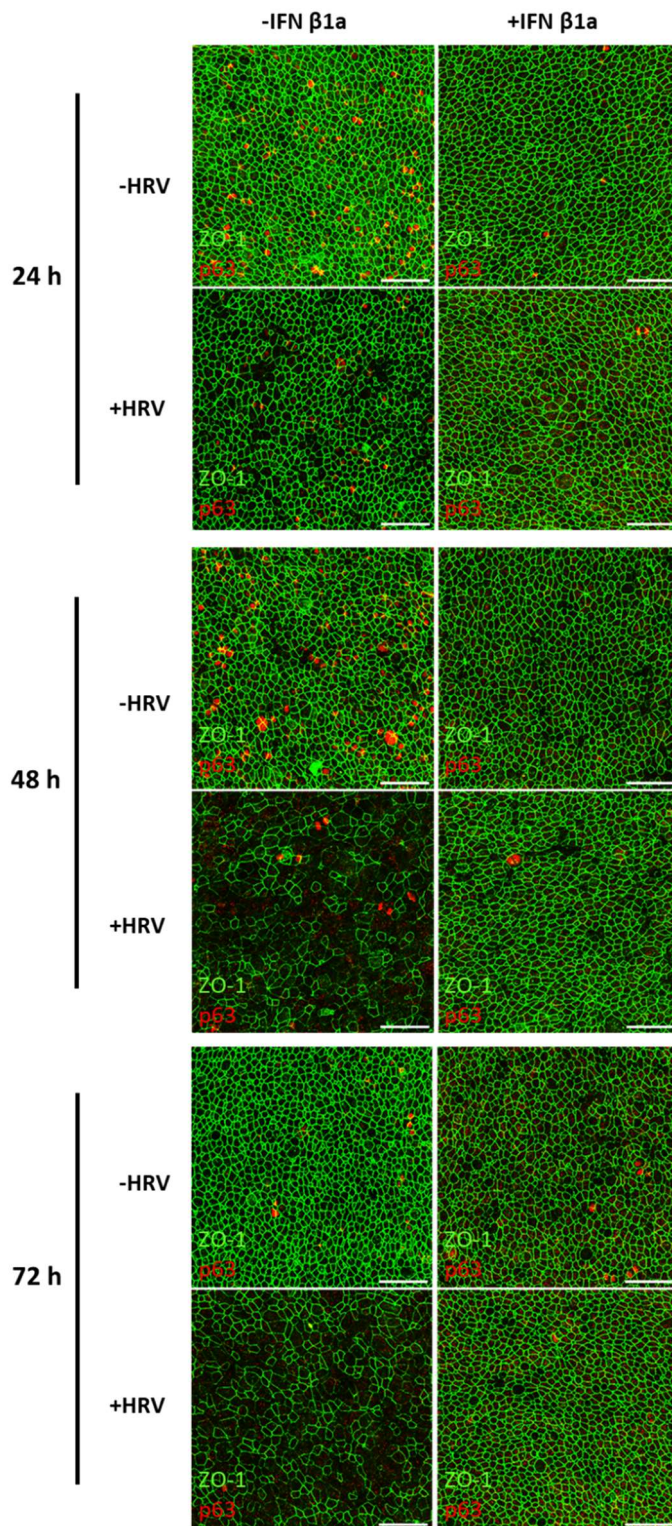


Abbildung 4.12: Effekt von IFN β 1a-Stimulation und HRV16-Infektion auf ZO-1 nach 24 - 72 h Differenzierte pBECs in ALI-Kultur wurden für 24 h mit 1.600 ng IFN β 1a stimuliert, anschließend für 2 h mit HRV16 infiziert, bevor erneut 1.000 ng IFN β 1a zugegeben wurde. Nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation wurden die Zellen fixiert, gegen ZO-1 und p63 immunfluoreszenzgefärbt und mittels KLSM analysiert. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen aus vier unabhängigen Experimenten. Linke Spalte: Zellen ohne IFN β 1a-Stimulation, rechte Spalte: Zellen mit IFN β 1a-Stimulation; Maßstabsbalken: 50 μ m; *Tight Junctions* (grün, ZO-1 markiert), basale Zellen (rot, p63 markiert).

Bestätigt wurde das Ergebnis der dissoziierten *Tight Junctions* nach 48 h und 72 h HRV16-Infektion durch die Quantifizierung der Fläche der ZO-1-gefärbten *Tight Junctions* pro Z-Stapel. Die *Tight Junction*-Flächen der IFN β 1a-behandelten pBECs in ALI-Kultur mit und ohne HRV16-Infektion waren zu jedem Zeitpunkt ähnlich zur Fläche der unbehandelten, uninfizierten Kontrollzellen. Auch war die ZO-1 gefärbte *Tight Junction*-Fläche der unbehandelten, HRV16-infizierten Zellen am 24 h-Zeitpunkt ähnlich zur Fläche der unbehandelten, uninfizierten Kontrollzellen.

Deutlich wurde aber, dass die Fläche der ZO-1-gefärbten *Tight Junctions* in den unbehandelten, HRV16-infizierten Zellen nach 48 h um 47,62 % und nach 72 h um 46,18 % signifikant geringer war, als im Vergleich zur Fläche der unbehandelten, uninfizierten Kontrollzellen (ZO-1 Fläche; 48 h: -IFN β 1a/+HRV $5129,99 \pm 1235,25 \mu\text{m}^2$ vs. -IFN β 1a/-HRV $9793,90 \pm 1964,52 \mu\text{m}^2$, $p=0,0148$; 72 h: -IFN β 1a/+HRV $4938,52 \pm 810,18 \mu\text{m}^2$ vs. -IFN β 1a/-HRV $9177,24 \pm 2074,75 \mu\text{m}^2$, $p=0,0376$, Mittelwert \pm Standardabweichung; siehe Abbildung 4.13).

Zusätzlich konnte eine tendenziell geringere ZO-1-gefärbte *Tight Junction*-Fläche in unbehandelten, HRV16-infizierten Zellen nach 72 h beobachtet werden, als in IFN β 1a-behandelten, HRV16-infizierten Zellen (ZO-1 Fläche; 72 h: -IFN β 1a/+HRV $4938,52 \pm 810,18 \mu\text{m}^2$ vs. +IFN β 1a/+HRV $8525,79 \pm 1346,61 \mu\text{m}^2$, $p=0,1348$, Mittelwert \pm Standardabweichung).

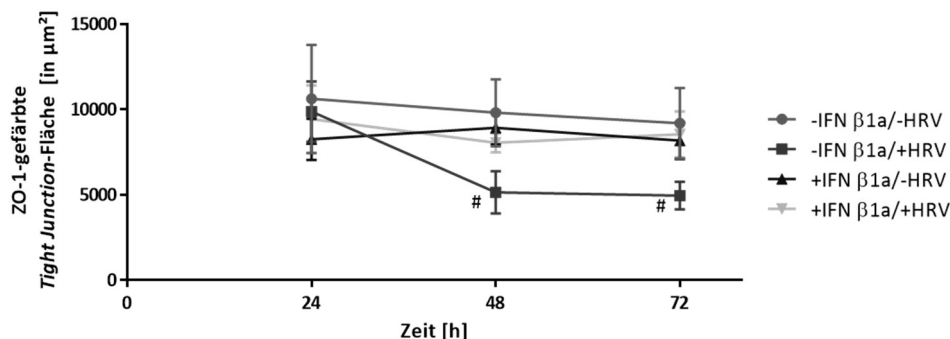


Abbildung 4.13: Quantifizierung der ZO-1-gefärbten *Tight Junction*-Fläche nach IFN β 1a-Stimulation und HRV16-Infektion

Differenzierte pBECs in ALI-Kultur wurden für 24 h mit 1.600 ng IFN β 1a stimuliert, anschließend für 2 h mit HRV16 infiziert, bevor erneut 1.000 ng IFN β 1a zugegeben wurde. Nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation wurden die Zellen immunchemisch untersucht und mit Hilfe eines KLSM analysiert. Mit Fiji ImageJ wurde die Fläche von ZO-1 aus den daraus resultierenden Bildern quantifiziert; Mittelwert \pm Standardabweichung, (n=4). Signifikanzniveau: # -IFN β 1a/+HRV vs. -IFN β 1a/-HRV; # $p \leq 0,05$; *Three-Way ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test, Matching Faktor= Zeit.*

Zusätzlich zur Quantifizierung der ZO-gefärbten *Tight Junction*-Fläche wurde die mRNA-Expression von *Tight Junction* (ZO-1 und Claudin-4) und *Adherence Junction* (E-Cadherin) Proteinen nach HRV16-Infektion mit und ohne IFN β 1a-Vorbehandlung bestimmt.

Die mRNA-Expression von Claudin-4 war nach 48 h in unbehandelten, HRV16-infizierten Zellen signifikant geringer als in IFN β 1a-behandelten, HRV16-infizierten Zellen (mRNA-Expression Claudin-4; 48 h: -IFN β 1a/+HRV $-0,07 \pm 1,16$ vs. +IFN β 1a/+HRV $1,32 \pm 0,51$, $p=0,0191$, Mittelwert \pm Standardabweichung; alle Werte in $\log_2(\text{Fold Change})$, siehe Abbildung 4.15 b).

Eine statistisch signifikante Änderung der mRNA-Expression von ZO-1 und E-Cadherin konnte nicht detektiert werden (siehe Abbildung 4.14 a und c).

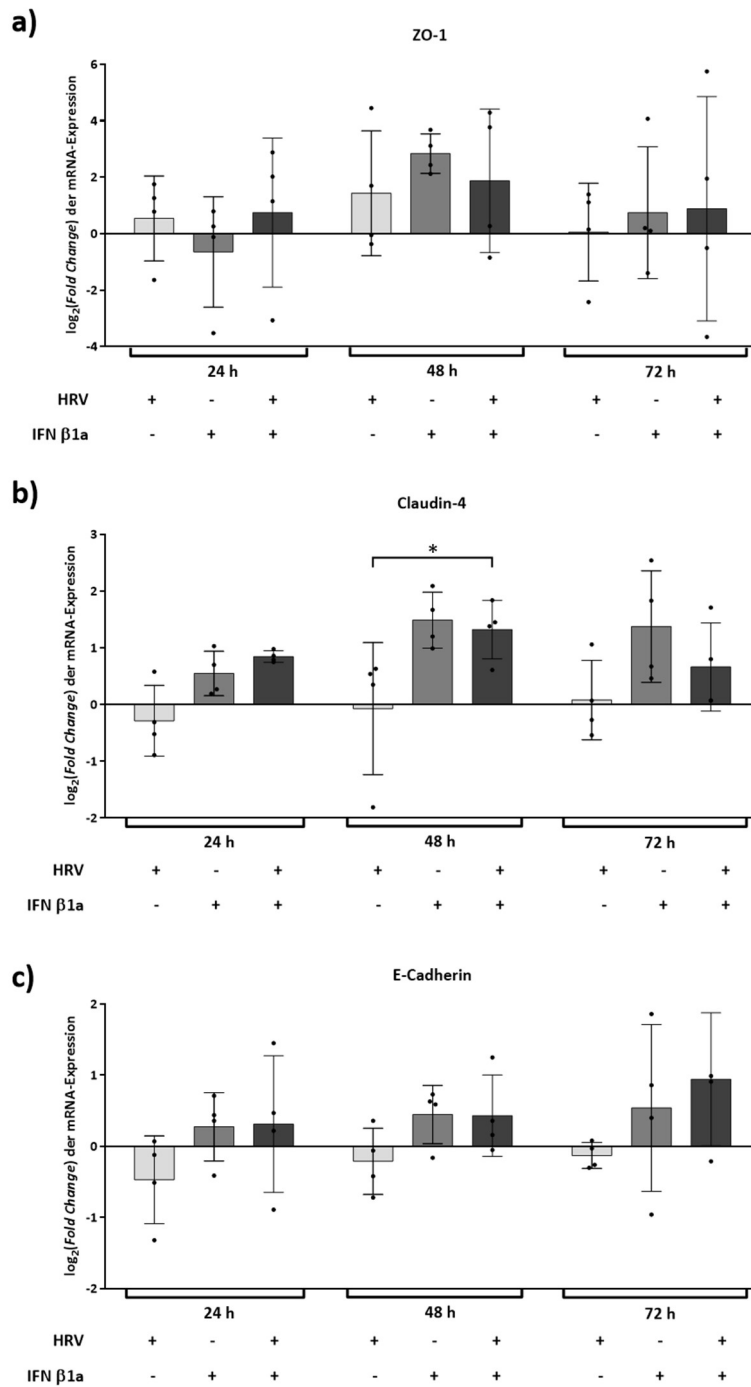


Abbildung 4.14: mRNA-Expression von *Tight* und *Adherence Junction* Proteinen nach IFN β 1a-Stimulation und HRV16-Infektion von differenzierten pBECs in ALI-Kultur

Differenzierte pBECs in ALI-Kultur wurden für 24 h mit 1.600 ng IFN β 1a stimuliert, anschließend für 2 h mit HRV16 infiziert, bevor erneut 1.000 ng IFN β 1a zugegeben wurde. Nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation erfolgte die Bestimmung der mRNA-Expression von ZO-1, Claudin-4 und E-Cadherin mittels qPCR; die relative Veränderung wurde gegenüber unbehandelten, uninfizierten Kontrollzellen berechnet und gegen GAPDH normalisiert; Mittelwert \pm Standardabweichung, (n=4). Ergebnisse der qPCR a) von ZO-1, b) von Claudin-4, c) von E-Cadherin. Signifikanzniveau: * $p < 0,05$; *Two-Way ANOVA*, *Tukey's Multiple Comparison Test*.

4.5.2.2. Effekt von IFN β -Stimulation und HRV16-Infektion auf unterschiedliche Zelltypen des Epithels

Zusätzlich zur Analyse der IFN β 1a-behandelten, HRV16-infizierten pBECs in ALI-Kultur mittels KLSM wurde in einem Versuch die epitheliale Barriere elektronenmikroskopisch untersucht (beschrieben in Kapitel 3.2.9.).

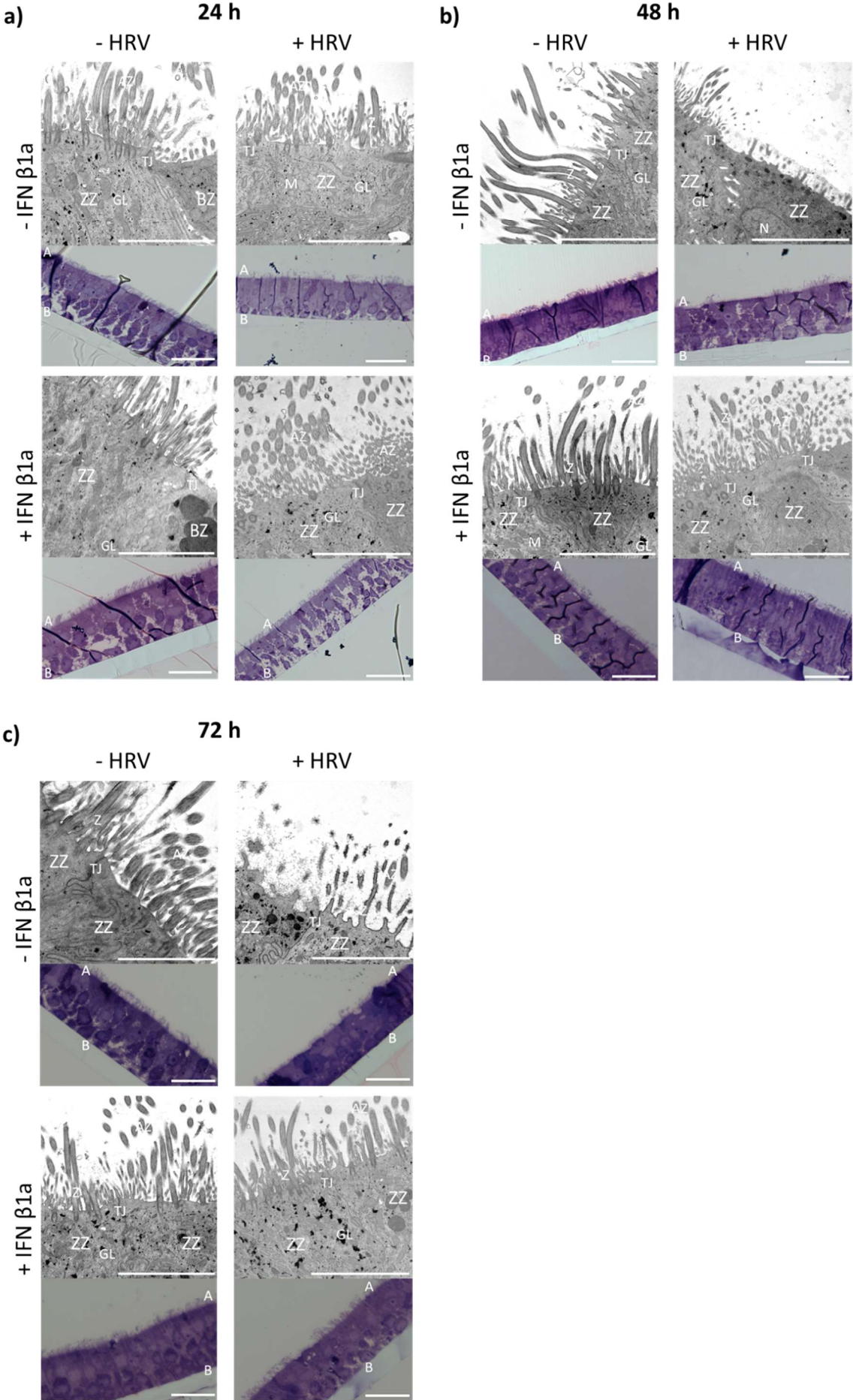
Die Zilien IFN β 1a-behandelter, uninfizierter Zellen waren zu allen Zeitpunkten (24 h – 72 h) vergleichbar mit denen unbehandelter, uninfizierter Kontrollzellen.

Die Zilien unbehandelter, HRV16-infizierter Zellen waren nach 24 h ebenfalls intakt und vergleichbar mit den Zilien der unbehandelten, uninfizierten Kontrollzellen. Nach 48 h HRV16-Infektion wurde eine Degradation der Zilien sichtbar, die auch nach 72 h HRV16-Infektion beobachtet werden konnte: Die Zilien waren an diesen Zeitpunkten verkürzt und fehlten teilweise ganz.

Im Gegensatz dazu waren die Zilien IFN β 1a-behandelter, HRV16-infizierter Zellen zu allen Zeitpunkten intakt (siehe Abbildung 4.15).

Abbildung 4.15: Effekt von IFN β 1a-Stimulation und 24 h – 72 h HRV16-Infektion auf die Zilien der differenzierten pBECs in ALI-Kultur

Abbildung auf Seite 94. Differenzierte pBECs in ALI-Kultur wurden für 24 h mit 1.600 ng IFN β 1a stimuliert, anschließend für 2 h mit HRV16 infiziert, bevor erneut 1.000 ng IFN β 1a zugegeben wurde. Nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation wurden die Zellen fixiert, eingebettet und kontrastiert. Es erfolgten Semidünnschnitte der eingebetteten Zellen, die zur Übersicht mit Methylenblau gefärbt wurden. Ultradünnschnitte derselben Proben wurden mittels Elektronenmikroskopie analysiert. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen eines einzelnen Versuchs. a) 24 h-Zeitpunkt, b) 48 h-Zeitpunkt, c) 72 h-Zeitpunkt; Bilder der Semidünnschnitte zur Übersicht: Blau, Maßstabsbalken: 0,5 μ m; Bilder Elektronenmikroskopie: grau, Maßstabsbalken: 5 μ m; Abkürzungen: A: apikale Seite, AZ: angeschnittene Zilie, B: basale Seite, BZ: Becherzelle, GL: Glykogen, M: Mitochondrium, N: Nukleus, R: Ribosomen, TJ: *Tight Junction*, Z: Zilie, ZZ: Zilien-tragende Zelle.



Da mittels elektronenmikroskopischer Untersuchung eine Schädigung der Zilien an der apikalen Zellseite unbehandelter, HRV16-infizierter Zellen beobachtet wurde, wurden im nächsten Schritt die mRNA-Expressionen verschiedener Marker Zilien-tragender Zellen (FOXJ1, SNTN) sowie die mRNA-Expression von SCGB3A1, einem Marker für Clubzellen bestimmt.

Die unbehandelten, HRV16-infizierten Zellen war zeigten nach 24 h und nach 48 h eine signifikant geringere FOXJ-1 mRNA-Expression als die IFN β 1a-behandelten, HRV16-infizierten Zellen (mRNA-Expression FOXJ-1, 24 h: -IFN β 1a/+HRV $-1,53 \pm 1,29$ vs. +IFN β 1a/+HRV $0,18 \pm 0,70$, $p=0,0015$; 48 h: -IFN β 1a/+HRV $-0,67 \pm 0,79$ vs. +IFN β 1a/+HRV $0,73 \pm 0,41$, $p=0,0125$, Mittelwert \pm Standardabweichung; alle Werte in $\log_2(\text{Fold Change})$; siehe Abbildung 4.16 a).

Auch die mRNA-Expression von SNTN unbehandelter, HRV16-infizierter Zellen war zu allen Zeitpunkten signifikant geringer als die SNTN-mRNA-Expression IFN β 1a-behandelter, HRV16-infizierter Zellen (mRNA-Expression SNTN, 24 h: -IFN β 1a/+HRV $-2,11 \pm 1,10$ vs. +IFN β 1a/+HRV $0,31 \pm 0,49$, $p<0,0001$; 48 h: -IFN β 1a/+HRV $-1,73 \pm 0,82$ vs. +IFN β 1a/+HRV $0,11 \pm 0,32$, $p=0,0004$; 72 h: -IFN β 1a/+HRV $-1,59 \pm 0,16$ vs. +IFN β 1a/+HRV $0,16 \pm 0,47$, $p=0,0008$, Mittelwert \pm Standardabweichung; alle Werte in $\log_2(\text{Fold Change})$; siehe Abbildung 4.16 b).

Es konnte keine signifikante Veränderung zwischen INF β 1a-behandelten, HRV16-infizierten Zellen und unbehandelten, HRV16-infizierten Zellen festgestellt werden (siehe Abbildung 4.16 c). Allerdings war die SCGB3A1 mRNA-Expression unbehandelter, HRV16-infizierter Zellen nach 72 h im Vergleich zu den unbehandelten, uninfizierten Kontrollzellen signifikant geringer (mRNA-Expression SCGB3A1, 72 h: -IFN β 1a/+HRV $-1,86 \pm 0,35$, $p = 0,0064$; Mittelwert \pm Standardabweichung; Werte in $\log_2(\text{Fold Change})$).

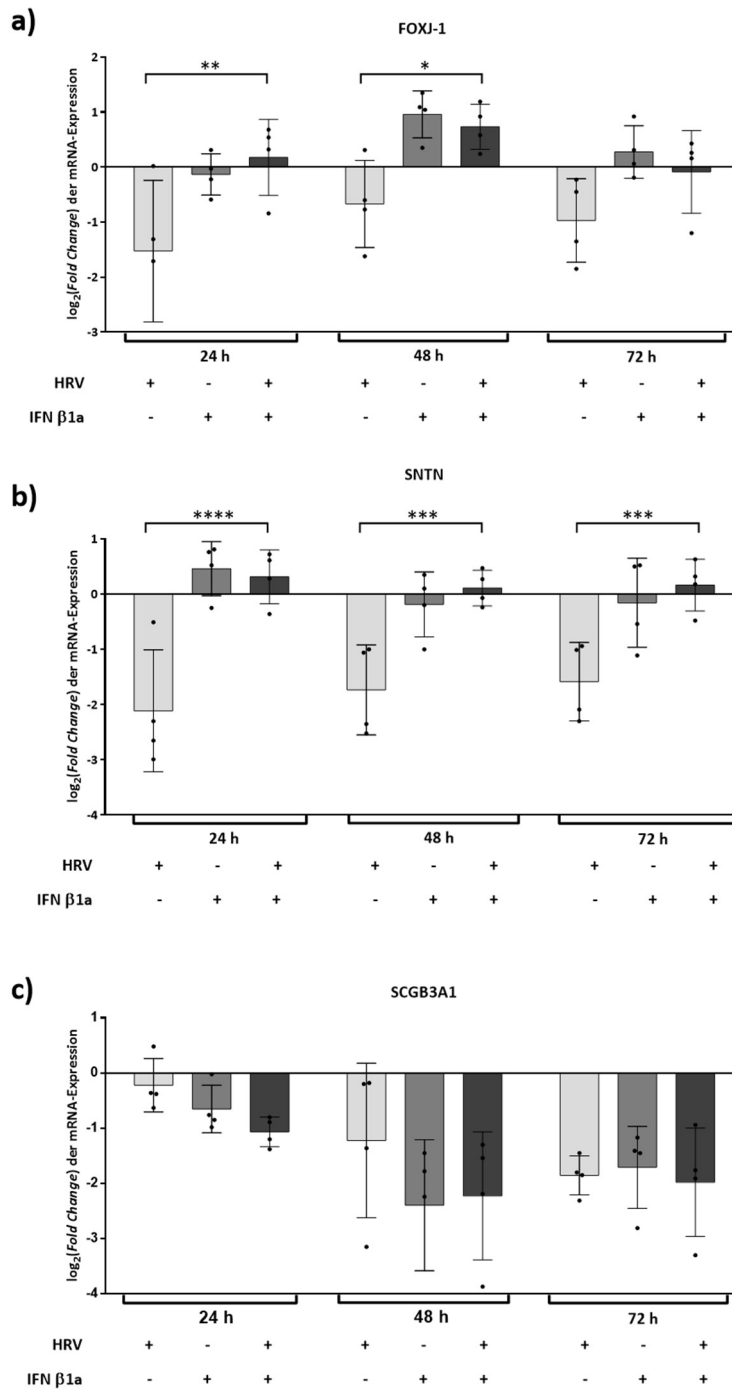


Abbildung 4.16: mRNA-Expression der Marker (FOXJ1, SNTN und SCGB3A1) für Zilien-tragende Zellen und Clubzellen in differenzierten pBECs in ALI-Kultur nach IFN β1a-Stimulation und HRV16-Infektion

Differenzierte pBECs in ALI-Kultur wurden für 24 h mit 1.600 ng IFN β1a stimuliert, anschließend für 2 h mit HRV16 infiziert, bevor erneut 1.000 ng IFN β1a zugegeben wurde. Nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation wurde die mRNA-Expression von FOXJ1, SNTN und SCGB3A1 mittels qPCR bestimmt; die relative Veränderung wurde gegenüber unbehandelten, uninfizierten Kontrollzellen berechnet und gegen GAPDH normalisiert; Mittelwert ± Standardabweichung, (n=4). Ergebnisse der qPCR a) von FOXJ-1, b) von SNTN, c) von SCGB3A1; Signifikanzniveau: * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001; *Two-Way ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test.*

4.5.2.3. Effekt von Interferon β -Stimulation und Rhinovirus-Infektion auf die Funktion der epithelialen Barriere

In vorangegangenen Versuchen wurde durchweg beobachtet, dass eine HRV16-Infektion negative Auswirkungen auf die Zellen und Zell-Zell-Kontakte der epithelialen Barriere der pBECs in ALI-Kultur hat. Dies könnte sich negativ auf die Permeabilität und damit den Schutz, welchen die epitheliale Barriere bietet, auswirken. Aus diesem Grund sollte im nächsten Schritt der Einfluss einer IFN β 1a-Vorbehandlung auf die Funktion der Barriere während einer HRV16-Infektion untersucht werden.

Hierzu wurde zunächst der TEER der ALI-Kulturen nach IFN β 1a-Stimulation und HRV16-Infektion bestimmt.

Die Messung des TEERs von unbehandelten, HRV16-infizierten pBECs in ALI-Kultur zeigte eine statistisch signifikante Abnahme um 65,55 % des transepithelialen Widerstandes nach 24 h (24 h: -IFN β 1a/+HRV $193,46 \pm 101,83 \text{ Ohm} \cdot \text{cm}^2$ vs. -IFN β 1a/-HRV $561,62 \pm 103,08 \text{ Ohm} \cdot \text{cm}^2$, $p=0,0063$ und vs. +IFN β 1a/+HRV $513,29 \pm 122,07 \text{ Ohm} \cdot \text{cm}^2$, $p=0,0362$, Mittelwert \pm Standardabweichung; siehe Abbildung 4.17).

48 h nach HRV16-Infektion stieg der epitheliale Widerstand der unbehandelten, HRV16-infizierten Zellen wieder auf ein ähnliches Level wie das der unbehandelten, uninfizierten Kontrollzellen an und blieb auch nach 72 h konstant.

Die TEER-Werte der IFN β 1a-behandelten ALI-Kulturen mit und ohne Virusinfektion waren zu allen Zeitpunkten ähnlich zu den TEER-Werten der unbehandelten, uninfizierten Kontrollzellen.

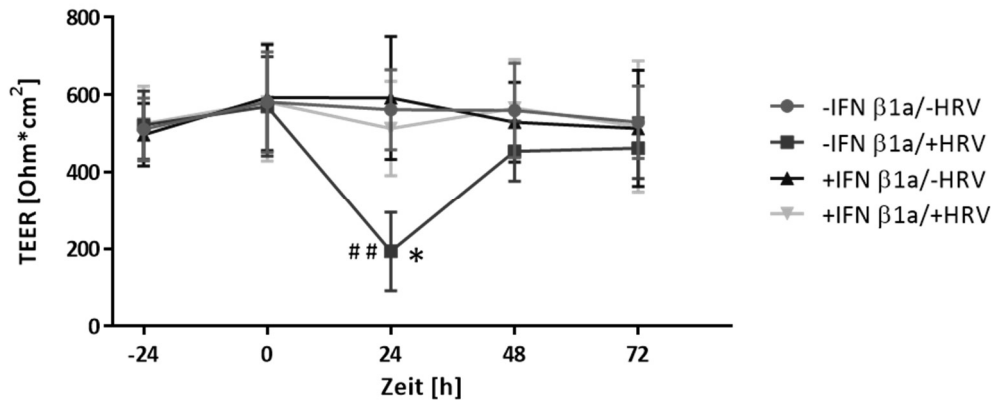


Abbildung 4.17: Messung des transepithelialen Widerstands von differenzierten pBECs in ALI-Kultur nach IFN β1a-Stimulation und HRV16-Infektion

Differenzierte pBECs in ALI-Kultur wurden für 24 h mit 1.600 ng IFN β1a stimuliert, anschließend für 2 h mit HRV16 infiziert, bevor erneut 1.000 ng IFN β1a zugegeben wurde. -24 h und 0 h vor, sowie 24 h, 48 h und 72 h nach HRV-Infektion erfolgten TEER-Messungen; Mittelwert ± Standardabweichung, (n=4). Signifikanzniveau: * -IFN β1a/+HRV vs. +IFN β1a/+HRV, # -IFN β1a/+HRV vs. -IFN β1a/-HRV; */# p≤0,05; **/## p≤0,01; *Three-Way ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test, Matching Faktor= Zeit.*

Um diese Ergebnisse zu unterstützen, wurde zusätzlich die Permeabilität der Zellschicht der ALI-Kulturen mittels eines FITC-Dextran-Assays bestimmt.

In unbehandelten, HRV16-infizierten Zellen war die Permeabilität der Zellschicht 24 h nach Infektion signifikant um das 5-fache erhöht, sank aber nach 48 h und 72 h wieder auf das Niveau der unbehandelten, uninfizierten Kontrollzellen zurück (siehe Abbildung 4.18).

Die Stimulation mit IFN β1a verhinderte den Anstieg der Permeabilität 24 h nach HRV16-Infektion (FITC-Dextran, 24 h: -IFN β1a/+HRV $1,63 \times 10^6 \pm 4,10 \times 10^5$ AU vs. -IFN β1a/-HRV $2,67 \times 10^5 \pm 1,65 \times 10^5$ AU, $p < 0,0001$ und vs. +IFN β1a/+HRV $2,89 \times 10^5 \pm 1,52 \times 10^5$ AU, $p < 0,0001$, Mittelwert ± Standardabweichung).

Die Permeabilität der Zellschicht nach IFN β1a-Behandlung war zu allen Zeitpunkten, unabhängig von der Virusinfektion, ähnlich zur Permeabilität der unbehandelten, uninfizierten Kontrollzellen.

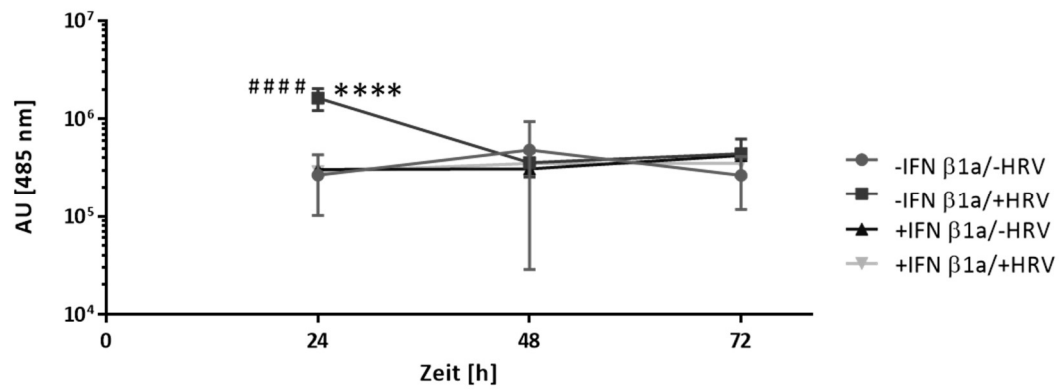


Abbildung 4.18: Messung der Permeabilität der epithelialen Barriere von differenzierten pBECs in ALI-Kultur nach IFN β1a-Stimulation und HRV16-Infektion

Differenzierte pBECs in ALI-Kultur wurden für 24 h mit 1.600 ng IFN β1a stimuliert, anschließend für 2 h mit HRV16 infiziert, bevor erneut 1.000 ng IFN β1a zugegeben wurde. 24 h, 48 h und 72 h nach Inkubation erfolgte die Bestimmung der Permeabilität der epithelialen Barriere mittels FITC-Dextran-Assay: Mittelwert ± Standardabweichung, (n=4). Signifikanzniveau: * -IFN β1a/+HRV vs. +IFN β1a/+HRV, # -IFN β1a/+HRV vs. -IFN β1a/-HRV; ****/#### p≤0,0001; *Three-Way ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test, Matching Faktor= Zeit.*

4.6. Effekt von IFN β auf die Barrierefunktion von primären bronchialen Epithelzellen während einer viral-bakteriellen Ko-Infektion

Die vorangegangenen Experimente haben gezeigt, dass eine HRV16-Infektion die epitheliale Barriere der pBECs in ALI-Kultur deutlich schwächt. Nachdem außerdem gezeigt wurde, dass HRV die Permeabilität der Barriere erhöht, sollte überprüft werden, ob eine IFN β 1a-Vorbehandlung die Zellen ebenfalls vor einer sekundären bakteriellen Infektion schützen kann.

4.6.1. *Streptococcus pneumoniae*-Infektion in primären bronchialen Epithelzellen

Für die Ko-Infektion der differenzierten pBECs in ALI-Kultur nach einer HRV16-Infektion wurde *S. pneumoniae* als bakterielles Pathogen ausgewählt. Für diese Versuche musste zuerst eine geeignete MOI für *S. pneumoniae* ermittelt werden, bei der nach 8-stündiger Infektion die Zellschicht nicht vollständig zerstört vorlag.

Dazu wurden differenzierte pBECs in ALI-Kultur für 8 h mit *S. pneumoniae* in den MOIs 10 und 100 infiziert (siehe Kapitel 3.2.3.4.). Anschließend wurden die Zellen fixiert, mit Hilfe von ZO-1- und *S. pneumoniae*- Antikörpern immunfluoreszenzgefärbt und die eingedeckten Präparate wurden dann an einem KLSM analysiert (beschrieben in Kapitel 3.2.8.1. und Kapitel 3.2.8.2.).

Schon beim Waschen und Fixieren der pBECs in ALI-Kultur wurde beobachtet, dass sich die Zellen, welche mit *S. pneumoniae* mit einer MOI von 100 infiziert wurden, teilweise von der Membran des Inserts lösten.

Diese Beobachtungen wurden mit der Analyse der ALI-Kulturen am KLSM bestätigt. Die Zellen, die mit *S. pneumoniae* in der MOI 100 infiziert wurden, zeigten in den orthogonalen Ansichten Löcher in der Zellschicht (siehe Abbildung 4.19). Zusätzlich waren die Bakterien (in der Abbildung in Rot dargestellt) teilweise bis zur Membran des Inserts vorgedrungen.

Bei einer *S. pneumoniae*-Infektion in der MOI 10 blieb die Zellschicht der Kulturen weiterhin intakt. Die Bakterien waren zwar sichtlich in die epitheliale Schicht eingedrungen, jedoch beschränkte sich dieses Eindringen auf den apikalen Teil der Zellschicht.

Für weitere Ko-Infektions Experimente wurde daher eine *S. pneumoniae*-Infektion mit einer MOI von 10 verwendet.

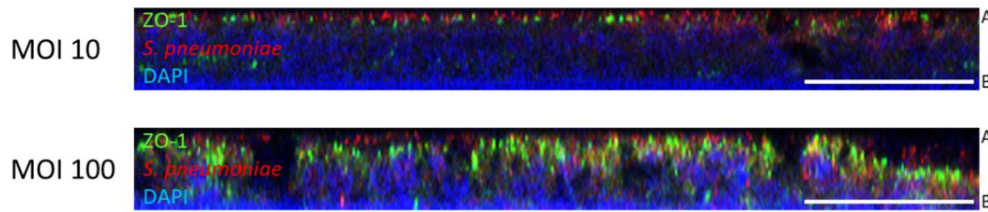


Abbildung 4.19: Orthogonale Ansicht der Zellschicht von differenzierten pBECs in ALI-Kultur nach einer 8-stündigen *S. pneumoniae*-Infektion

Differenzierte pBECs in ALI-Kultur wurden für 8 h mit *S. pneumoniae* in den MOIs 10 und 100 infiziert. Die Zellen wurden fixiert, gegen ZO-1 und *S. pneumoniae* immunfluoreszenzgefärbt und nach der Markierung der Zellkerne mit DAPI mittels KLSM analysiert. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen aus drei unabhängigen Experimenten. Oben: Zellen mit *S. pneumoniae*-Infektion in der MOI 10, unten: Zellen mit *S. pneumoniae*-Infektion in der MOI 100; Maßstabsbalken: 50 μ m, orthogonale Ansicht; A: apikale Seite, B: basale Seite; *Tight Junctions* (grün, ZO-1 markiert), *S. pneumoniae* (rot, *S. pneumoniae* markiert); Zellkerne (blau, DAPI markiert).

4.6.2. Effekt von IFN β auf die Barrierefunktion primärer bronchialer Epithelzellen während einer Ko-Infektion mit HRV und *S. pneumoniae*

Nach einer 24-stündigen Inkubation mit IFN β 1a wurden die pBECs in ALI-Kultur für 24 h - 72 h mit HRV16 infiziert. Anschließend erfolgte an jedem Zeitpunkt eine 8-stündige Infektion mit *S. pneumoniae* in einer MOI von 10, um eine viral-bakterielle Ko-Infektion zu erzeugen (siehe Abbildung 3.6 für eine Übersicht des zeitlichen Ablaufs der Experimente). Mit diesem Modellsystem wurde der Effekt von IFN auf eine viral-bakterielle Ko-Infektion untersucht. Alle hier beschriebenen Versuche erfolgten mit Zellen von jeweils vier unterschiedlichen Spendern (n=4; siehe Material Kapitel 3.1.1., Tabelle 3.2).

4.6.2.1. Bestätigung einer HRV-Infektion in primären bronchialen Epithelzellen vor einer Ko-Infektion mit *S. pneumoniae*

An allen Zeitpunkten konnte durch TCID₅₀ (siehe Kapitel 3.2.2.2.) eine HRV16-Infektion nachgewiesen werden. Basierend auf der bestätigten Virus-Infektion und der anschließenden Infektion mit *S. pneumoniae* konnte somit bei späteren Quantifizierungen sicher von einer erfolgreichen Ko-Infektion ausgegangen werden (siehe Abbildung 4.20).

Die Reduktion von Viruspartikeln durch eine Stimulation mit IFN β 1a war dabei an allen Zeitpunkten deutlich erkennbar. Signifikant war diese Reduktion um 99,9 % am 24 h Zeitpunkt (24 h: -IFN β 1a/+HRV/-SP $1,68 \times 10^5 \pm 9,54 \times 10^4$ TCID₅₀/mL vs. +IFN β 1a/+HRV/-SP $6,09 \times 10^0 \pm 9,40 \times 10^{-1}$ TCID₅₀/mL, p=0,0369, Mittelwert \pm Standardabweichung).

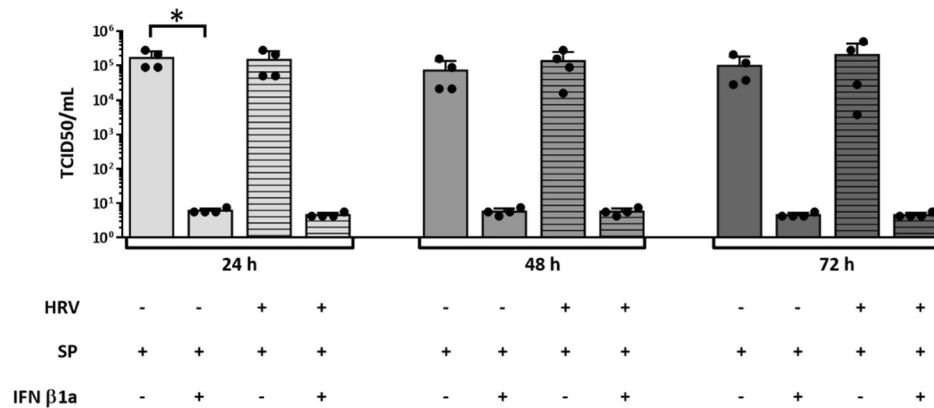


Abbildung 4.20: Viruspartikel in differenzierten pBECs in ALI-Kultur nach IFN β 1a-Stimulation und HRV16-Infektion vor der Ko-Infektion mit *S. pneumoniae*

Differenzierte pBECs in ALI-Kultur wurden für 24 h mit 1.600 ng IFN β 1a stimuliert, anschließend für 2 h mit HRV16 infiziert, bevor erneut 1.000 ng IFN β 1a zugegeben wurde. Nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation erfolgte, vor der 8-stündigen Ko-Infektion mit *S. pneumoniae* (SP), die Bestimmung der Viruspartikel mittels TCID₅₀; Mittelwert \pm Standardabweichung, (n=4). Signifikanzniveau: * $p \leq 0,05$; *One-Way ANOVA*, *Tukey's Multiple Comparison Test*.

4.6.2.2. Effekt einer IFN β -Stimulation und einer viral-bakteriellen Ko-Infektion auf die Barrierefunktion von primären bronchialen Epithelzellen

An allen Zeitpunkten der hier beschriebenen Versuche (siehe Abbildung 3.6 für eine Übersicht der Zeitpunkte) wurde ebenfalls die Funktion der epithelialen Barriere der pBECs in ALI-Kultur mittels TEER-Messung (beschrieben in Kapitel 3.2.1.2.7.) überprüft.

Der epitheliale Widerstand war, wie zuvor beschrieben (siehe Kapitel 4.5.2.3.), 24 h nach HRV16-Infektion in den unbehandelten ALI-Kulturen verglichen mit den uninfizierten, unbehandelten Kontrollen signifikant um 54,65 %, beziehungsweise im Vergleich mit den IFN β 1a-behandelten, HRV16-infizierten Zellen signifikant um 55,77 % verringert (TEER, 24 h: -IFN β 1a/+HRV/-SP $250,80 \pm 60,55 \text{ Ohm} \cdot \text{cm}^2$ vs. -IFN β 1a/-HRV/-SP $553,13 \pm 90,03 \text{ Ohm} \cdot \text{cm}^2$, $p=0,0362$ und vs. +IFN β 1a/+HRV/-SP $567,05 \pm 93,0 \text{ Ohm} \cdot \text{cm}^2$, $p=0,0260$, Mittelwert \pm Standardabweichung; siehe Abbildung 4.21).

Auch unbehandelte, ko-infizierte Zellen zeigten eine signifikante Verringerung um 70,36 % des Widerstands, verglichen mit den unbehandelten, Zellen mit alleiniger *S. pneumoniae*-Infektion (TEER; 24 h + 8 h: -IFN β 1a/+HRV/+SP $163,90 \pm 48,19 \text{ Ohm} \cdot \text{cm}^2$ vs. -IFN β 1a/-HRV/+SP $553,13 \pm 90,03 \text{ Ohm} \cdot \text{cm}^2$, $p=0,0410$, Mittelwert \pm Standardabweichung) oder den IFN β 1a-behandelten, ko-infizierten Zellen (TEER; 24 h + 8 h: -IFN β 1a/+HRV/+SP $163,90 \pm 48,19 \text{ Ohm} \cdot \text{cm}^2$ vs. +IFN β 1a/+HRV/+SP $459,25 \pm 176,63 \text{ Ohm} \cdot \text{cm}^2$, $p=0,0442$, Mittelwert \pm Standardabweichung).

Außerdem wurde beobachtet, dass der transepitheliale Widerstand der Zellen aller Bedingungen durch eine Infektion mit *S. pneumoniae* an allen drei Zeitpunkten um bis zu 54,16 % verringert wurde (zum Beispiel: TEER, 72 h + 8 h: -IFN β 1a/-HRV/-SP $644,33 \pm 140,65$ Ohm*cm² vs. -IFN β 1a/-HRV/+SP $295,35 \pm 118,63$ Ohm*cm² (p= 0,0087), +IFN β 1a/-HRV/-SP $605,00 \pm 184,83$ Ohm*cm² vs. +IFN β 1a/-HRV/+SP $280,23 \pm 82,10$ Ohm*cm², p= 0,0148, +IFN β 1a/+HRV/-SP $616,83 \pm 178,38$ Ohm*cm² vs. +IFN β 1a/+HRV/+SP $269,23 \pm 78,21$ Ohm*cm², p=0,0090, Mittelwert \pm Standardabweichung; weitere TEER-Messungen vor der Infektion mit *S. pneumoniae* siehe Anhang, Abbildung 7.3).

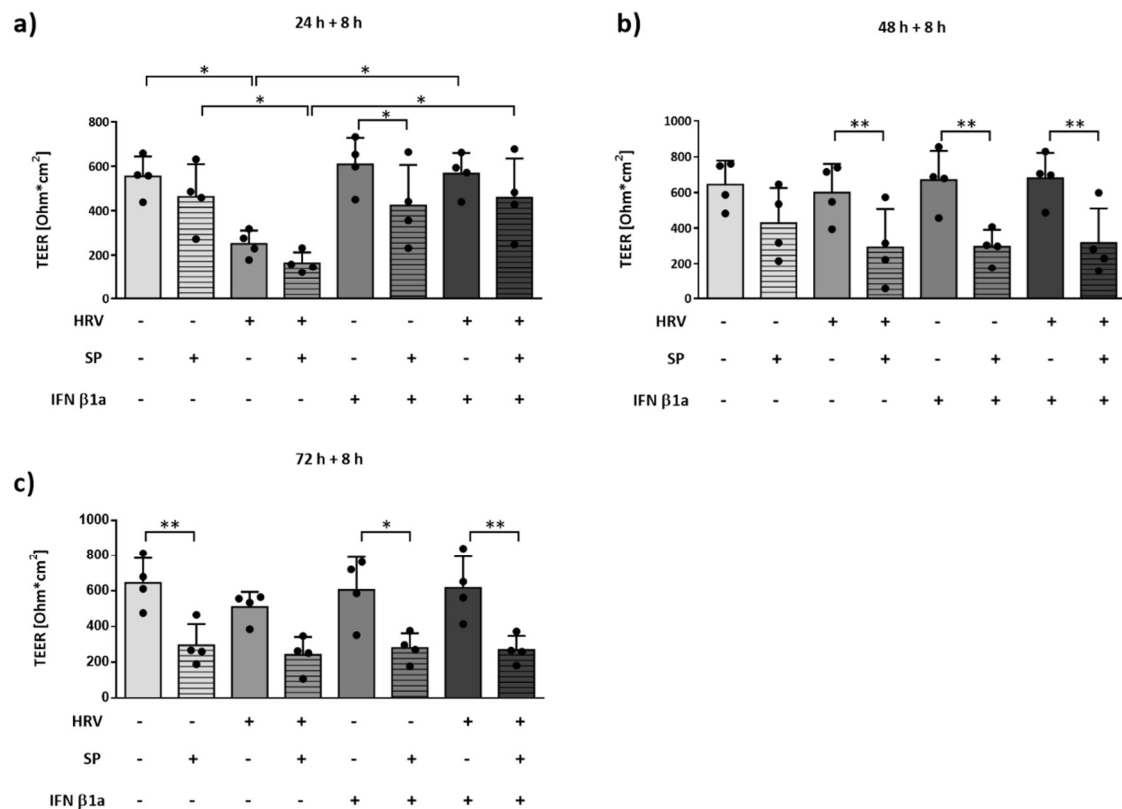


Abbildung 4.21: Messung des transepithelialen Widerstands von differenzierten pBECs in ALI-Kultur nach IFN β 1a-Stimulation und Ko-Infektion mit HRV16 und *S. pneumoniae*

Differenzierte pBECs in ALI-Kultur wurden für 24 h mit 1.600 ng IFN β 1a stimuliert, anschließend für 2 h mit HRV16 infiziert, bevor erneut 1.000 ng IFN β 1a zugegeben wurde. Nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation erfolgte eine 8-stündige Ko-Infektion mit *S. pneumoniae* (SP). Anschließend wurde der transepitheliale Widerstand der Zellen gemessen; Mittelwert \pm Standardabweichung, (n=4). a) TEER-Werte 24 h nach HRV16-Infektion + 8 h *S. pneumoniae*-Infektion, b) TEER-Werte 48 h nach HRV16-Infektion + 8 h *S. pneumoniae*-Infektion, c) TEER-Werte 72 h nach HRV16-Infektion + 8 h *S. pneumoniae*-Infektion. Signifikanzniveau: * p \leq 0,05, ** p \leq 0,01; Three-Way ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test, Matching Faktor=Bakterien.

4.6.2.3. Verminderte Einwanderung von *S. pneumoniae* durch IFN β -Vorbehandlung primärer bronchialer Epithelzellen während einer viral-bakteriell Ko-Infektion

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob eine vorangegangene virale Infektion den Bakterien das Eindringen in die Zellschicht der pBECs in ALI-Kultur erleichterte und ob IFN β 1a eine solche Einwanderung reduzieren konnte.

Eine Quantifizierung mittels Ausstreichens des basalen Mediums auf Blutagarplatten, um zu zählen, wie viele Bakterien in das basale Kompartiment des Inserts gelangt waren, war technisch nicht möglich. Aufgrund der Porengröße von 0,4 μ m des TC-Inserts war *S. pneumoniae* nicht in der Lage durch die Membran des Inserts zu gelangen.

Stattdessen wurde der zurückgelegte Bakterienweg in die Zellschicht während unterschiedlicher Bedingungen mittels Fluoreszenzfärbung gegen ZO-1, *S. pneumoniae* und DAPI und KLSM-Analyse quantifiziert (beschrieben in Kapitel 3.2.8.1. und Kapitel 3.2.8.2.). Mittels orthogonaler Ansichten der Aufnahmen wurde quantifiziert, wie weit *S. pneumoniae* in die Zellschicht der pBECs in ALI-Kultur eingewandert war. Dabei sollte überprüft werden, ob eine viral-bakterielle Ko-Infektion eine solche Einwanderung erleichtert und ob eine IFN β 1a-Stimulation die Penetration der Zellschicht durch *S. pneumoniae* vermindert.

Während einer Ko-Infektion konnte *S. pneumoniae* weiter in die Zellschicht der pBECs in ALI-Kultur einwandern als in Abwesenheit von HRV16 oder nach IFN β 1a-Stimulation und Ko-Infektion mit HRV16 (siehe Abbildung 4.22, *S. pneumoniae* dargestellt in rot).

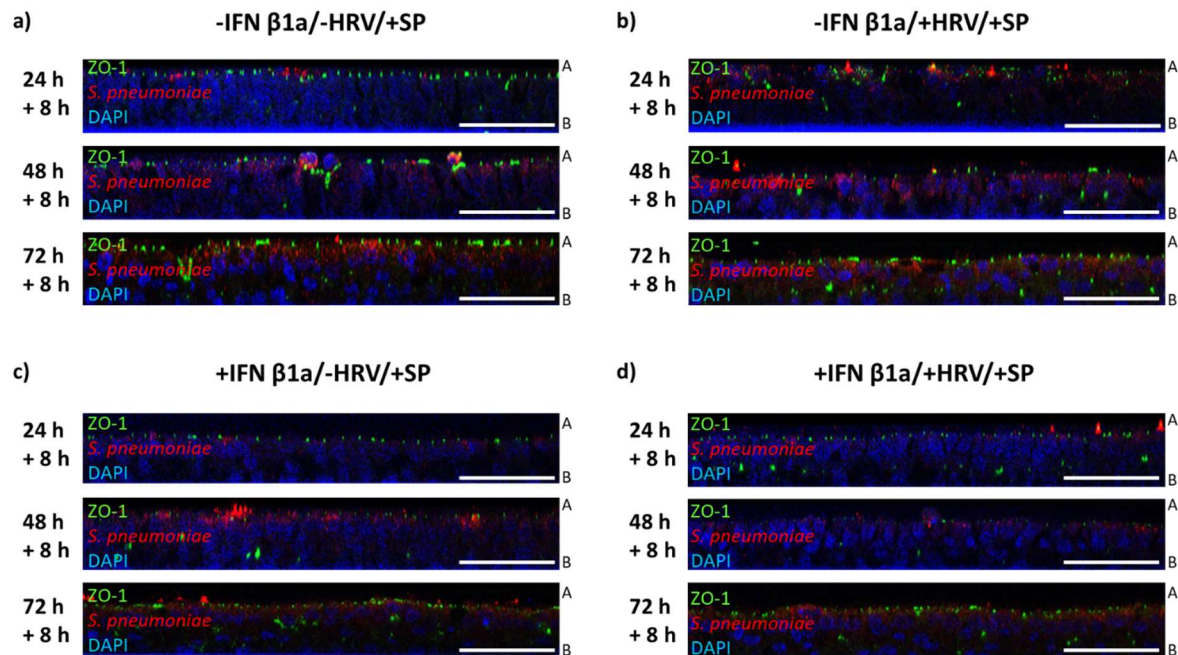


Abbildung 4.22: Orthogonale Ansicht der epithelialen Barriere der pBECs in ALI-Kultur nach IFN β 1a-Stimulation und Ko-Infektion mit *S. pneumoniae* und HRV16

Differenzierte pBECs in ALI-Kultur wurden für 24 h mit 1.600 ng IFN β 1a stimuliert, anschließend für 2 h mit HRV16 infiziert, bevor erneut 1.000 ng IFN β 1a zugegeben wurde. Nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation erfolgte eine 8-stündige Ko-Infektion mit *S. pneumoniae* (SP). Die ALI-Kulturen wurden anschließend im Insert fixiert, gegen ZO-1 und *S. pneumoniae* immunfluoreszenzgefärbt und nach Färbung mit DAPI mittels KLSM analysiert. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen aus vier unabhängigen Experimenten der Zeitpunkte 24 h + 8 h, 48 h + 8 h und 72 h + 8 h der ALI-Kulturen unter den Bedingungen: a) -IFN β 1a/-HRV/+SP, b) -IFN β 1a/+HRV/+SP, c) +IFN β 1a/-HRV/+SP, d) +IFN β 1a/+HRV/+SP; Maßstabsbalken: 50 μ m, orthogonale Ansicht; A: apikale Seite, B: basale Seite; *Tight Junctions* (grün, ZO-1 markiert), *S. pneumoniae* (rot, *S. pneumoniae* markiert); Zellkerne (blau, DAPI markiert).

Die bakterielle Translokation in die Zellschicht wurde, wie in Kapitel 3.2.8.5. beschrieben, anhand der orthogonalen Ansichten der Z-Stapel quantifiziert.

Hierbei wurde der visuelle Eindruck der KLSM-Aufnahmen bestätigt. Am 72 h + 8 h-Zeitpunkt war die eingewanderte Strecke der Bakterien durch IFN β 1a-Stimulation signifikant um 58,29 % verringert (zurückgelegte Strecke *S. pneumoniae* in die Zellschicht, 72 h: -IFN β 1a/+HRV/+SP 23,69 \pm 10,28 % vs. +IFN β 1a/+HRV/+SP 9,88 \pm 3,52 %, p=0,0058, Mittelwert \pm Standardabweichung, angegeben als Prozent der gemittelten Höhe der Zellschicht siehe Abbildung 4.23).

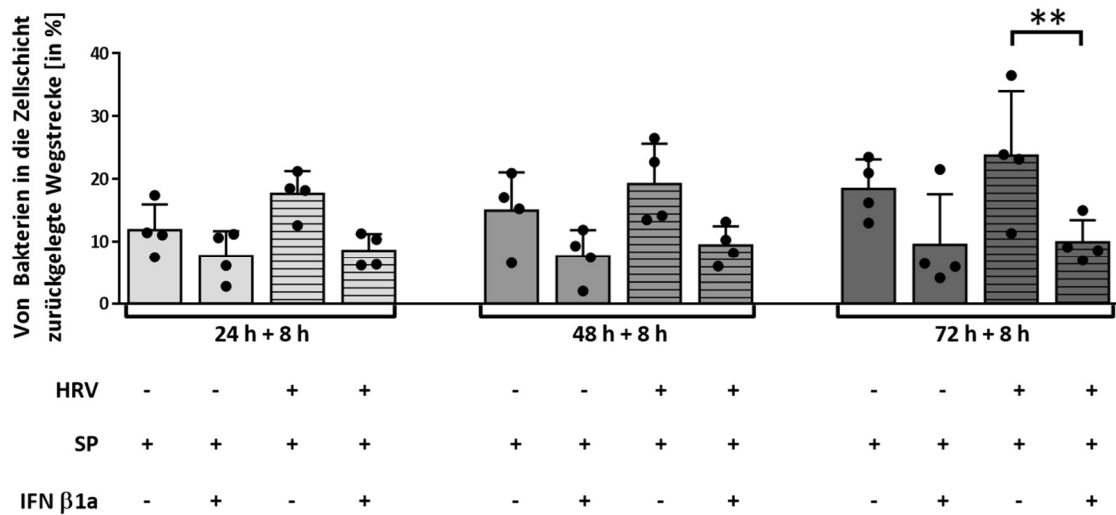


Abbildung 4.23: Quantifizierung der zurückgelegten Strecke von *S. pneumoniae* in die epitheliale Barriere der differenzierten pBECs in ALI-Kultur nach Ko-Infektion mit HRV16 und IFN β 1a-Stimulation

Differenzierte pBECs in ALI-Kultur wurden für 24 h mit 1.600 ng IFN β 1a stimuliert, anschließend für 2 h mit HRV16 infiziert, bevor erneut 1.000 ng IFN β 1a zugegeben wurde. Nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation erfolgte eine 8-stündige Ko-Infektion mit *S. pneumoniae* (SP). Nach Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung der pBECs in ALI-Kultur gegen ZO-1, *S. pneumoniae* und Fluoreszenzfärbung mit DAPI, erfolgte die Analyse der Zellen am KLSM. Anhand von orthogonalen Ansichten, generiert aus den KLSM-Aufnahmen der pBECs in ALI-Kultur, wurde die zurückgelegte Strecke der Bakterien in die Zellschicht der pBECs in ALI-Kultur quantifiziert; Mittelwert \pm Standardabweichung, (n=4). Signifikanzniveau: ** $p \leq 0,01$; Two-Way ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test.

4.7. Einblick in den Mechanismus HRV-induzierter Änderungen in der Barriere von primären bronchialen Epithelzellen

Da bis dato unbekannt ist, warum eine humane Rhinovirus Infektion einen Einfluss auf die Funktion der epithelialen Atemwegsbarriere hat, wurde der Mechanismus im Folgenden genauer untersucht.

4.7.1. Effekt von Immunstimulanz auf die Barrierefunktion von primären bronchialen Epithelzellen

Um zu untersuchen, ob die virale Replikation oder die antivirale Abwehr des Immunsystems eine Rolle in der verringerten Funktion der epithelialen Atemwegsbarriere während einer HRV-Infektion spielt, wurden die pBECs in ALI-Kultur anstatt mit HRV16 für 2 h mit dem Immunstimulanz Poly(I:C) HMW stimuliert (siehe Kapitel 3.2.2.3; parallel zu den in Kapitel 4.4. und Kapitel 4.5. beschriebenen Versuchen). Poly(I:C) ist ein synthetisches Analogon viraler dsRNA und aktiviert, wie die virale dsRNA, TLR3. Alle Versuchsbedingungen, wie Zeitpunkte und Temperaturen sowie die angewandten Methoden, blieben identisch zu den in Kapitel 4.4. und 4.5. beschriebenen Versuchen (siehe Abbildung 3.5 für eine Übersicht des zeitlichen Ablaufs der Experimente).

Im Vergleich zu den unbehandelten, uninfizierten Kontrollzellen war die Sezernierung von IL-8 in den mit Poly(I:C)-stimulierten ALI-Kulturen nach 24 h um das 2,62-fache, nach 48 h um das 1,88-fache und nach 72h um das 1,20-fache signifikant erhöht (IL-8, 24 h: -IFN β 1a/-HRV 4471 ± 1818 pg/mL vs. Poly(I:C) 16216 ± 8252 pg/mL, $p=0,0021$; 48 h: -IFN β 1a/-HRV 6369 ± 1500 pg/mL vs. Poly(I:C) 18359 ± 5141 pg/mL, $p=0,0012$; 72 h: -IFN β 1a/-HRV 7856 ± 2101 pg/mL vs. Poly(I:C) 17353 ± 6565 pg/mL, $p=0,0147$, Mittelwert \pm Standardabweichung).

So wurde gezeigt, dass die Immunantwort primärer bronchialer Epithelzellen durch eine Stimulation mit 50 μ g/mL Poly(I:C) angeregt wird (siehe Abbildung 4.24; weitere Zytokine siehe Anhang, Abbildung 7.4).

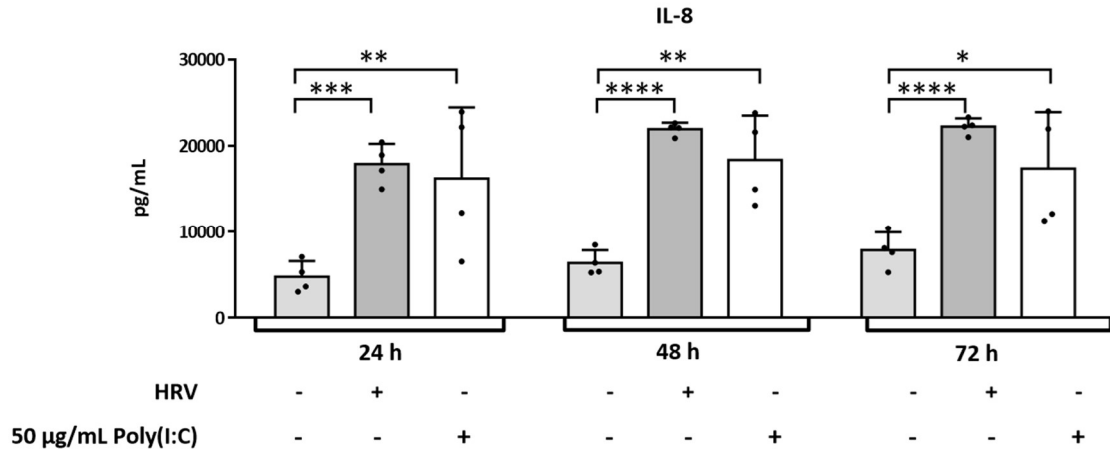


Abbildung 4.24: Poly(I:C)-Stimulation aktiviert die IL-8 Produktion von differenzierten pBECs in ALI-Kultur

Differenzierte pBECs in ALI-Kultur wurden für 2 h mit Poly(I:C) stimuliert oder mit HRV16 infiziert. Nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation wurde mittels CBA die Proteinkonzentration des Zytokins IL-8 bestimmt; Mittelwert \pm Standardabweichung, (n=4). LLoQ = 10 pg/mL; Signifikanzniveau: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; **** $p \leq 0,0001$; *Two-Way ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test*.

Anhand von KLSM-Analysen der fixierten und gegen ZO-1 und p63 immunfluoreszenzgefärbten pBECs in ALI-Kultur (beschrieben in Kapitel 3.2.8.1. und Kapitel 3.2.8.2.) konnte gezeigt werden, dass die Poly(I:C)-stimulierten Zellen ein vollständiges, nicht-dissoziiertes Netz an ZO-1-gefärbten *Tight Junctions* aufwiesen. Dieses Ergebnis wurde durch die Quantifizierung der *Tight Junction*-Fläche mittels Fiji ImageJ bestätigt. Im Gegensatz zu unbehandelten, HRV16-infizierten Zellen wiesen die Poly(I:C)-stimulierten pBECs in ALI-Kultur keine signifikante Verringerung der *Tight Junction*-Fläche auf und waren an allen Zeitpunkten vergleichbar zu der Fläche der unbehandelten, uninfizierten Kontrollzellen (ZO-1 Fläche, 72 h: -IFN β 1a/-HRV $9177,24 \pm 2074,75 \mu\text{m}^2$ vs. Poly(I:C) $9645,22 \pm 2001,499 \mu\text{m}^2$, $p=0,9463$, Mittelwert \pm Standardabweichung) siehe Abbildung 4.25 a).

Zusätzlich war weder ein Einfluss auf die Zellviabilität (siehe Abbildung 4.25 b-c), analysiert mittels LDH- und *LIVE/DEAD*-Assay, oder auf die Barrierefunktion der pBECs in ALI-Kultur (siehe Abbildung 4.25 d-e), gemessen anhand von TEER und FITC-Dextran-Assays zu erkennen. Auch die mRNA-Expression von ZO-1, Claudin-4 und E-Cadherin wurde durch Stimulation mit Poly(I:C) nicht signifikant verändert (siehe Abbildung 4.26 a-c).

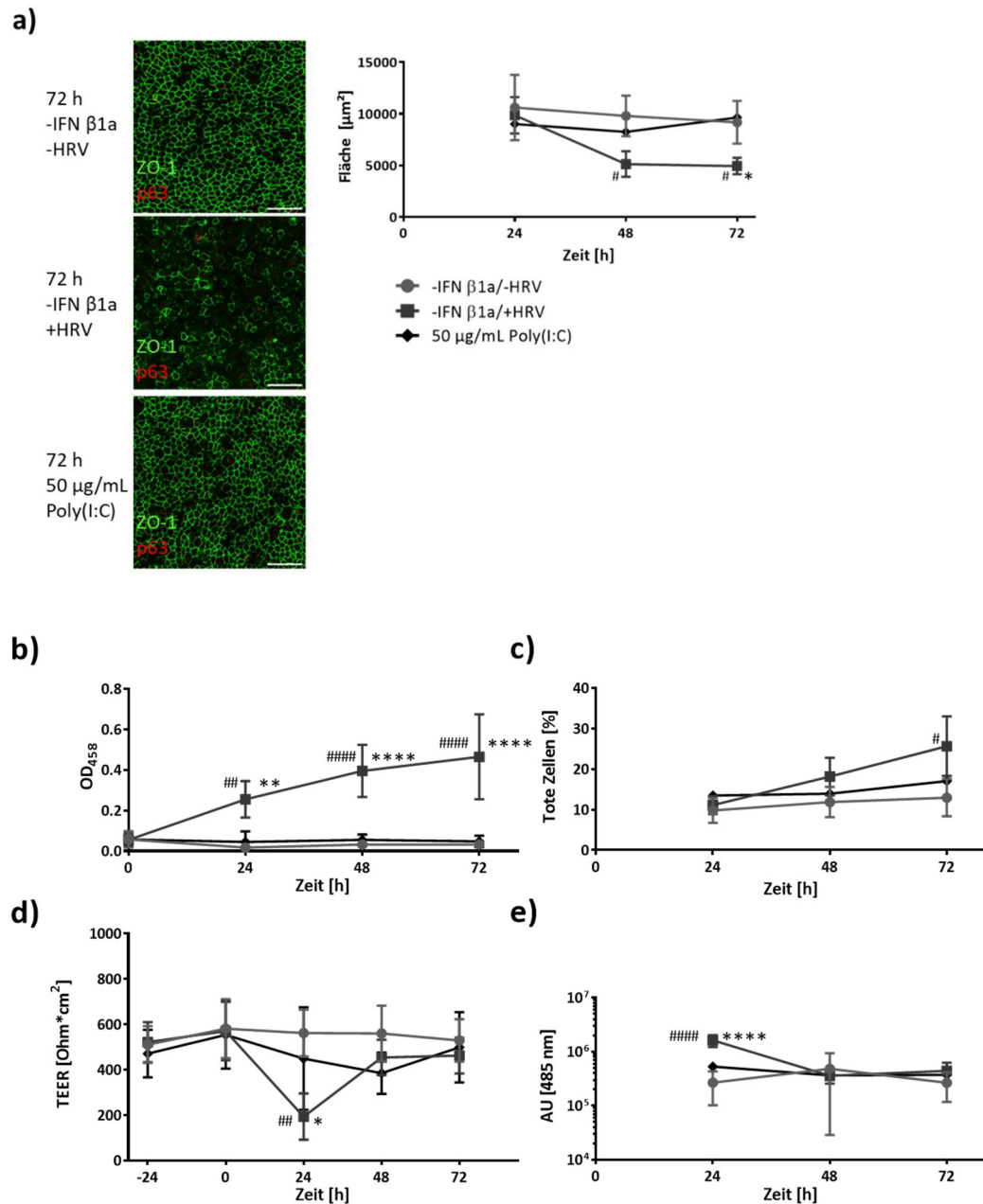


Abbildung 4.25: Poly(I:C)-Stimulation zeigt keinen Effekt auf die Barrierefunktion von differenzierten pBECs in ALI-Kultur

Differenzierte pBECs in ALI-Kultur wurden für 2 h mit Poly(I:C) stimuliert oder mit HRV16 infiziert; Mittelwert \pm Standardabweichung, (n=4). a) Fixierte und gegen ZO-1, p63 und DAPI gefärbte pBECs in ALI-Kultur (links), Maßstabsbalken: 50 μ m; Tight Junctions (grün, ZO-1 markiert), basale Zellen (rot, p63 markiert); sowie die Quantifizierung der *Tight Junction*-Fläche (rechts); b) LDH-Assay 0 h vor und 24 h - 72 h nach Stimulation mit Poly(I:C); c) *LIVE/DEAD*-Assays 24 h - 72 h nach Stimulation mit Poly(I:C); d) TEER-Messung -24 h und 0 h vor, sowie 24 h - 72 h nach Poly(I:C)-Stimulation; e) FITC-Dextran (4 kDa) Assay 24 h - 72 h nach Stimulation mit Poly(I:C); Signifikanzniveau: * -IFN β 1a/+HRV vs. Poly(I:C), # -IFN β 1a/+HRV vs. -IFN β 1a/-HRV; */# $p \leq 0,05$, **/## $p \leq 0,01$, ****/#### $p \leq 0,0001$; *Two-Way ANOVA*, *Tukey's Multiple Comparison Test*.

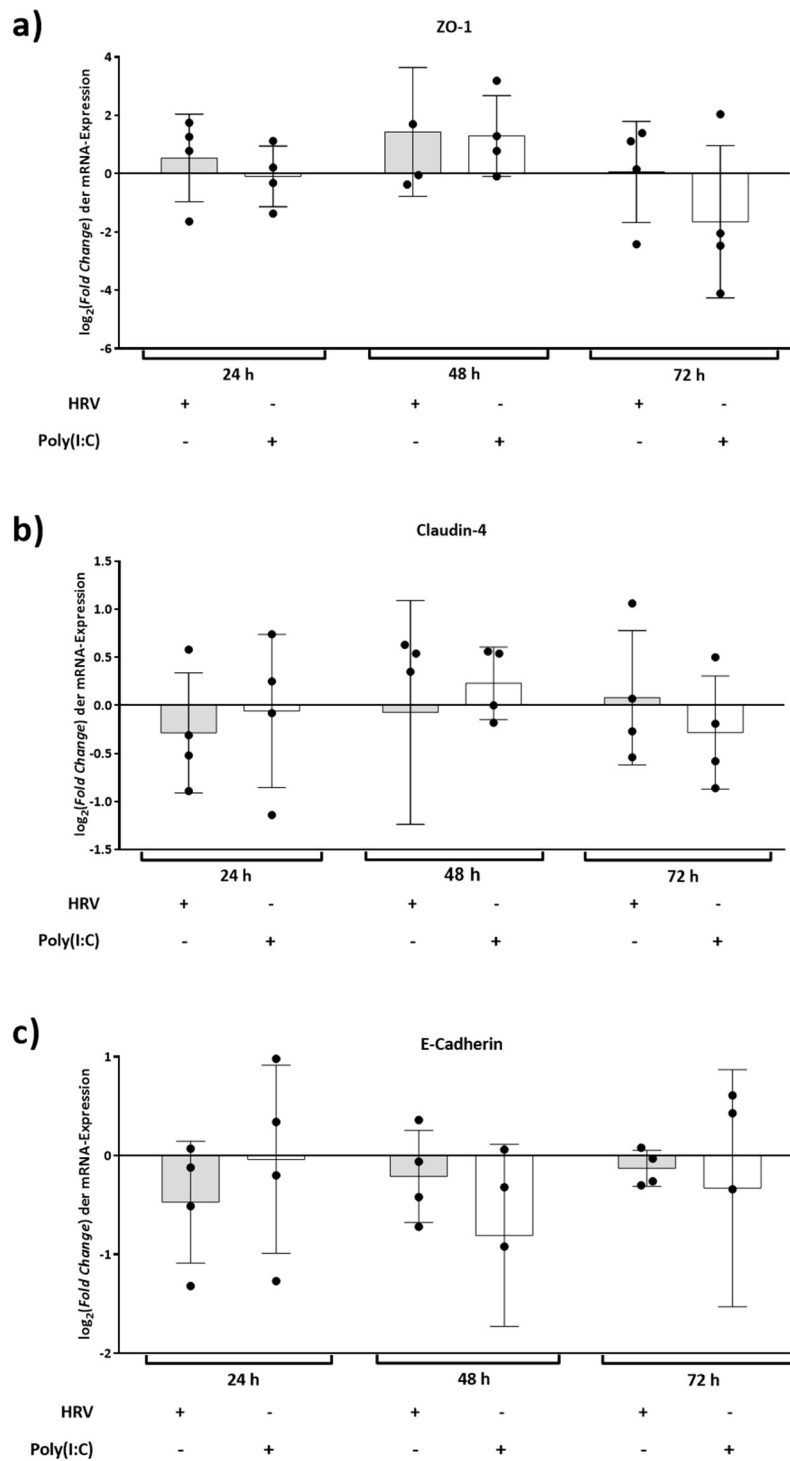


Abbildung 4.26: Poly(I:C)-Stimulation zeigt keinen Effekt auf die mRNA-Expression von *Tight* und *Adherence Junctions*-Proteinen der differenzierten pBECs in ALI-Kultur

Differenzierte pBECs in ALI-Kultur wurden für 2 h mit 50 µg/mL Poly(I:C) stimuliert oder mit HRV16 infiziert (n=4). Nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation erfolgte die Bestimmung der mRNA-Expression von a) ZO-1, b) Claudin-4 und c) E-Cadherin mittels qPCR; die relative Veränderung wurde gegenüber unbehandelten, uninfizierten Kontrollzellen berechnet und gegen GAPDH normalisiert; Mittelwert ± Standardabweichung, (n=4). Signifikanzniveau: nicht signifikant; *Two-Way ANOVA*, *Tukey's Multiple Comparison Test*.

4.7.2. Nachweis von oxidativem Stress in IFN β -stimulierten primären bronchialen Epithelzellen während einer HRV-Infektion

Es existieren teils widersprüchliche Beobachtungen zum Einfluss von oxidativem Stress auf die Barrierefunktion während einer Virusinfektion (siehe auch Kapitel 2.1.2.2.). Um den Effekt von oxidativem Stress in IFN β 1a-stimulierten und HRV16-infizierten pBECs in ALI-Kultur näher zu untersuchen, sollte der Gehalt an oxidativem Stress bestimmt werden.

Dazu wurden pBECs in ALI-Kultur mit IFN β 1a stimuliert und anschließend für 2 h - 12 h mit HRV16 infiziert (siehe Abbildung 3.7 für eine Übersicht des zeitlichen Ablaufs der Experimente). Alle hier beschriebenen Versuche erfolgten mit Zellen von jeweils vier unterschiedlichen Spendern (n=4; siehe Material, Kapitel 3.1.1., Tabelle 3.2).

4.7.2.1. Protektiver Effekt von IFN β in primären bronchialen Epithelzellen nach 2 - 12 - stündiger Infektion mit HRV

An allen Zeitpunkten wurde zunächst bestimmt, ob der protektive Effekt einer IFN β 1a-Behandlung auch schon zu einem früheren Zeitpunkt nach einer viralen Infektion messbar war. Nach der Überprüfung der infektiösen Partikel mittels TCID₅₀ in IFN β 1a-stimulierten und für 2 h - 12 h HRV16-infizierten pBECs in ALI-Kultur wurde deutlich, dass IFN β 1a auch schon 2 h nach einer viralen Infektion einen protektiven Effekt aufwies (siehe Abbildung 4.27).

Nachgewiesen wurde eine statistisch signifikant verringerte Anzahl der infektiösen Partikel in den IFN β 1a-behandelten, HRV16-infizierten Zellen um 46,17 % nach 2 h (Viruspartikel: -IFN β 1a/+HRV $1,02 \times 10^1 \pm 5,32 \times 10^0$ TCID₅₀/mL vs. +IFN β 1a/+HRV $5,49 \times 10^0 \pm 3,23 \times 10^0$ TCID₅₀/mL, p=0,0029, Mittelwert \pm Standardabweichung), um 59,31 % nach 4 h (Viruspartikel: -IFN β 1a/+HRV $9,93 \times 10^0 \pm 3,97 \times 10^0$ TCID₅₀/mL vs. +IFN β 1a/+HRV $4,04 \times 10^0 \pm 1,17 \times 10^0$ TCID₅₀/mL, p=0,0051, Mittelwert \pm Standardabweichung) und um 99,89 % nach 12 h (Viruspartikel: -IFN β 1a/+HRV $1,09 \times 10^4 \pm 1,78 \times 10^4$ TCID₅₀/mL vs. +IFN β 1a/+HRV $1,11 \times 10^1 \pm 5,56 \times 10^0$ TCID₅₀/mL, p=0,0033, Mittelwert \pm Standardabweichung). Nach 8 h zeigten sich tendenziell weniger Viruspartikel in IFN β 1a-behandelten, HRV16-infizierten Zellen, es konnte allerdings kein statistisch signifikanter Effekt nachgewiesen werden (Viruspartikel: -IFN β 1a/+HRV $4,94 \times 10^2 \pm 7,44 \times 10^2$ TCID₅₀/mL vs. +IFN β 1a/+HRV $4,39 \times 10^0 \pm 1,42 \times 10^0$ TCID₅₀/mL, p=0,0751, Mittelwert \pm Standardabweichung).

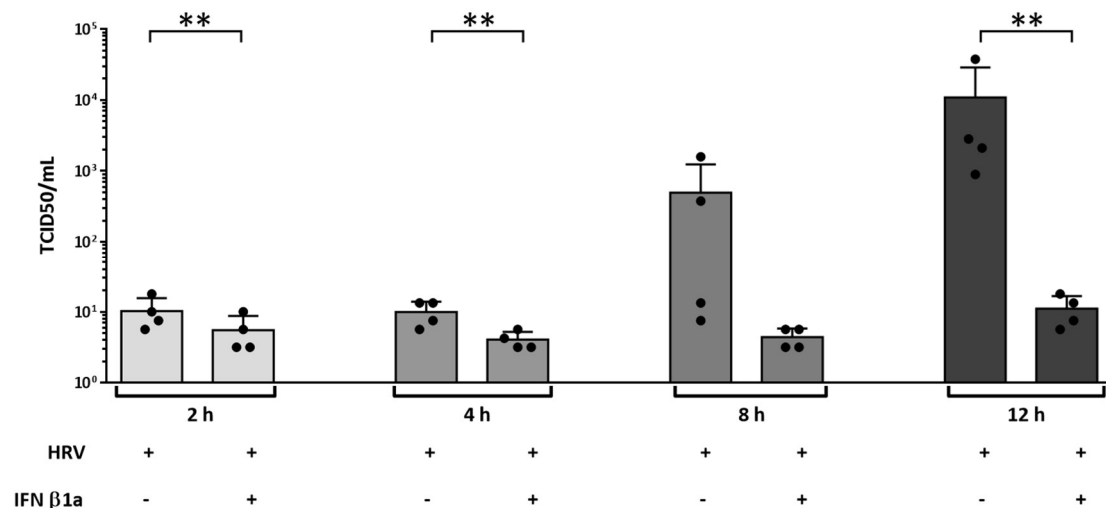


Abbildung 4.27: Viruspartikel in differenzierten pBECs in ALI-Kultur nach IFN β 1a-Stimulation und HRV16-Infektion für 2 h - 12 h

Differenzierte pBECs in ALI-Kultur wurden für 24 h mit 1.600 ng IFN β 1a stimuliert, anschließend für 2 h, 4 h, 8 h und 12 h mit HRV16 infiziert. An jedem Zeitpunkt wurde mittels TCID₅₀ die Anzahl infektiöser Partikel bestimmt; Mittelwert \pm Standardabweichung, (n=4). Signifikanzniveau: ** p \leq 0,01; Werte wurden für die statistische Auswertung Log10 transformiert, pro Zeitpunkt: gepaarter t-Test, zweiseitig.

4.7.2.2. Effekt von IFN β -Stimulation auf die Funktion der epithelialen Barriere primärer bronchialer Epithelzellen nach 2 - 12-stündiger HRV-Infektion

Bei der Messung des transepithelialen Widerstands der pBECs in ALI-Kultur wurde deutlich, dass eine Infektion mit HRV16 den Widerstand der Zellschicht schon 8 h nach der Infektion signifikant um 59,17 % verringerte (TEER, 8 h: -IFN β 1a/+HRV 177,38 \pm 124,47 Ohm*cm² vs. -IFN β 1a/-HRV 434,50 \pm 119,12 Ohm*cm², p=0,0056, siehe Abbildung 4.28). Nach 12 h viraler Infektion war die Verringerung des Widerstands durch HRV16-Infektion weiter fortgeschritten, die signifikante Reduktion belief sich an diesem Zeitpunkt auf 81,37 % (TEER, 12 h: -IFN β 1a/+HRV 86,90 \pm 47,21 Ohm*cm² vs. -IFN β 1a/-HRV 466,68 \pm 155,52 Ohm*cm², p<0,0001).

Die IFN β 1a-Vorbehandlung konnte die Verringerung des Widerstands nach 8 h und 12 h viraler Infektion verhindern (TEER; 8 h: -IFN β 1a/+HRV 177,38 \pm 124,47 Ohm*cm² vs. +IFN β 1a/+HRV 466,68 \pm 114,80 Ohm*cm², p=0,0008; 12 h: -IFN β 1a/+HRV 86,90 \pm 47,21 Ohm*cm² vs. +IFN β 1a/+HRV 434,50 \pm 112,23 Ohm*cm², p<0,0001, Mittelwert \pm Standardabweichung).

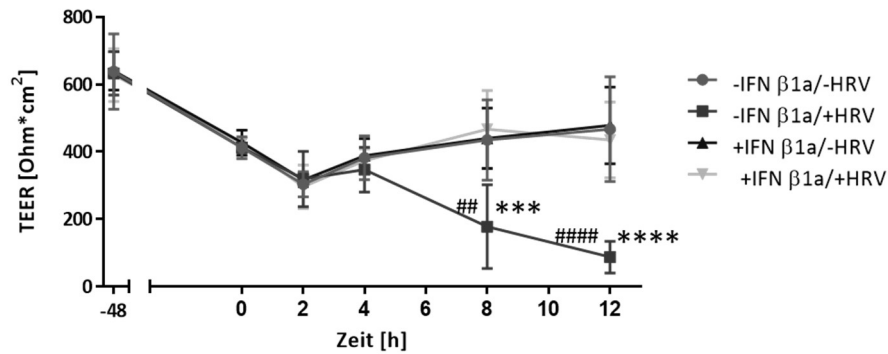


Abbildung 4.28: Messung des transepithelialen Widerstands von differenzierten pBECs in ALI-Kultur nach IFN β 1a-Stimulation und 2 h - 12 h HRV16-Infektion

Differenzierte pBECs in ALI-Kultur wurden für 24 h mit 1.600 ng IFN β 1a stimuliert, anschließend für 2 h - 12 h mit HRV16 infiziert. -48 h und 0 h vor der viralen Infektion, sowie 2 h, 4 h, 8 h und 12 h nach viraler Infektion erfolgten TEER-Messungen; Mittelwert \pm Standardabweichung, (n=4). Signifikanzniveau: * -IFN β 1a/+HRV vs. +IFN β 1a/+HRV, # -IFN β 1a/+HRV vs. -IFN β 1a/-HRV; **/## p \leq 0,01, ***/### p \leq 0,001, ****/#### p \leq 0,0001; Three-Way ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test, Matching Faktor= Zeit.

4.7.2.3. Quantifizierung der reaktiven Sauerstoffspezies in IFN β -stimulierten und HRV-infizierten primären bronchialen Epithelzellen

Um die Rolle von oxidativem Stress in IFN-stimulierten, HRV16-infizierten pBECs in ALI-Kultur zu untersuchen, wurden die Zellen mit CellROX™ gefärbt und an einem KLSM analysiert (siehe Kapitel 3.2.8.3.). Von jeder Bedingung wurden pro Versuch und pro Insert je zwei Z-Stapel generiert. Anhand dieser Z-Stapel sollte die Quantifizierung von ROS erfolgen.

Da während der Analyse der Zellen am KLSM eine inkonsistente und ungleichmäßige CellROX™-Fluoreszenz innerhalb der Inserts der unterschiedlichen Bedingungen auffiel, erfolgte eine manuelle Auswertung der Fluoreszenz in den Z-Stapeln aller Versuche. Nach der Auswertung aller Z-Stapel wurde deutlich, dass anhand der Aufnahmen der hier beschriebenen Versuche keine klare Tendenz für das Aufkommen von ROS innerhalb der einzelnen Bedingungen erkennbar war. So waren die ROS-Fluoreszenzen nicht nur innerhalb einer Bedingung eines Versuches, sondern auch im Vergleich mit den anderen Versuchen inkonsistent (siehe Abbildung 4.29 als Beispiel für einen Zeitpunkt eines Versuches der Experiment-Reihe und Anhang, Tabelle 7.1 für eine Zusammenfassung der Auswertung aller unabhängigen Experimente).

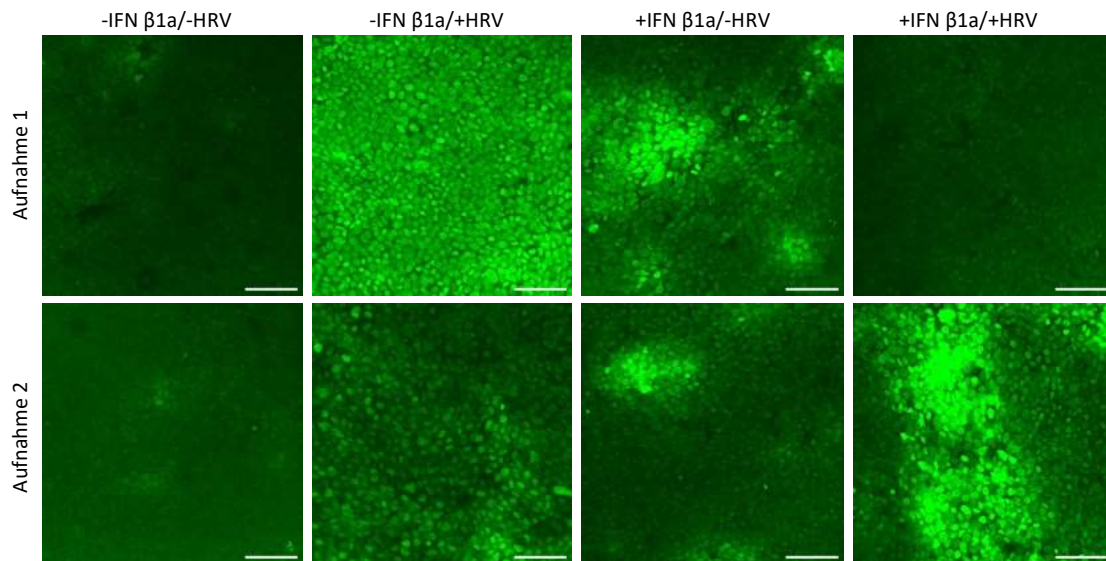


Abbildung 4.29: CellROX™-behandelte pBECs in ALI-Kultur mit IFN β1a-Stimulation und 2 h HRV16-Infektion

Differenzierte pBECs in ALI-Kultur wurden für 24 h mit 1.600 ng IFN β1a stimuliert, anschließend für 2 h, 4 h, 8 h und 12 h mit HRV16 infiziert. Die pBECs in ALI-Kultur wurden mit CellROX™ gefärbt, fixiert und mittels KLSM analysiert (n=4). Gezeigt sind je zwei Aufnahmen eines Inserts, beispielhaft gezeigt ist hier der 2 h-Zeitpunkt eines Versuches mit vier unterschiedlichen Bedingungen; Maßstabsbalken: 50 μm; reaktive Sauerstoffspezies (grün, CellROX™).

5. Diskussion

Eine Infektion mit HRV kann die Barrierefunktion des Atemwegsepithels beeinträchtigen, wodurch das Risiko einer viral-bakteriellen Ko-Infektion erhöht wird (Faris *et al.*, 2016; Sajjan *et al.*, 2008). Durch solche viral-bakteriellen Superinfektionen wird die Mortalität erheblich gesteigert (Manna *et al.*, 2020; Morens *et al.*, 2008). IFNe werden wegen ihrer breiten antiviralen Wirkung als mögliche Therapeutika für respiratorische Viren gehandelt. Um das Atemwegsepithel vor Virus-induzierten Auswirkungen zu schützen, könnte eine IFN-Vorbehandlung therapeutisch eingesetzt werden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass IFN β 1a einen protektiven, antiviralen Effekt in pBECs in ALI-Kultur hat und deren *Tight Junction*-Komplexe und Zilien-tragende Zellen vor den Effekten einer HRV-Infektion schützt. Ebenfalls wurde nachgewiesen, dass eine IFN-Vorbehandlung die bakterielle Translokation in die Zellschicht während einer viral-bakteriellen Ko-Infektion mit *S. pneumoniae* verringerte. Bis dato ist der Mechanismus, mit welchem eine HRV-Infektion die Barrierefunktion beeinträchtigt, unbekannt. Durch die hier gewonnenen Daten wurde gefolgert, dass die virale Replikation an diesen HRV-induzierten Effekten beteiligt sein könnte.

5.1. Protektiver Effekt von IFN β

Zur Untersuchung des protektiven Effekts von IFN wurde in der vorliegenden Arbeit zur Vorbehandlung der Zellen IFN β 1a verwendet. Ausgewählt wurde dieses IFN anhand eines Vergleichs unterschiedlicher IFN Typ I und Typ III-Subtypen in A549-Zellen. Zu Beginn dieser Arbeit wurden dazu unterschiedliche IFN-Subtypen anhand einer Literaturrecherche auf ihre Affinität zum Rezeptor und zusätzlich auf die Induktion von ISGs überprüft. Das Ziel war es drei IFN-Subtypen von Typ I und drei von Typ III zu vergleichen. Durch die hohen Bindungsaffinitäten zu IFNAR 2 (Bolen *et al.*, 2014; Gibbert *et al.*, 2013; Jaks *et al.*, 2007; Lavoie *et al.*, 2011) und die hohe ISG-Induktion (Moll *et al.*, 2011) wurden die Typ I IFNe α 2b, α 8 und β in die IFN-Auswahl dieser Arbeit mit eingeschlossen. Da beim zuletzt entdeckten IFN λ 4 zum Zeitpunkt der IFN-Auswahl eine geringe Datenlage für die Bindungsaffinität an die Rezeptoren vorlag und IFN λ 4 entweder nicht oder nur sehr gering in Folge einer viralen Infektion exprimiert wird (H. Zhou *et al.*, 2020), wurden die Typ III IFNe λ 1, λ 2 und λ 3 für den Vergleich der IFN-Subtypen ausgewählt.

Das IFN mit der höchsten antiviralen Aktivität sollte mit Hilfe einer stabil transfizierten Reporterzelllinie ermittelt werden, in welcher nach IFN-Stimulation die Transkription von Luciferase angeregt wurde. Durch den Einsatz der Reporterzelllinie zeigte sich, dass eine

Stimulation mit IFN α 2b oder IFN β 1b unter den getesteten Typ I IFNen die stärkste ISRE-vermittelte Genexpression induzierte, weswegen diese beiden Typ I IFNe in die engere Auswahl aufgenommen wurden.

Beide IFNe waren in den hier eingesetzten Konzentrationen in den verwendeten Zellmodellen nicht zytotoxisch (siehe Abbildung 4.3).

Durch das Erreichen eines Plateaus ab einer bestimmten Konzentration konnte allerdings nicht festgestellt werden, ob die antivirale Aktivität der IFNe Konzentrations-bedingt stagnierte oder der Assay abgesättigt war (siehe Abbildung 4.1).

Trotzdem kann die stabile Reporterzelllinie von Vorteil sein und zukünftig verwendet werden, um zum Beispiel Substanzen, die die ISRE-induzierte Genexpression anregen sollen, schnellstmöglich auf ihre antivirale Aktivität zu prüfen.

Wie bereits in einigen Studien gezeigt (Bolen *et al.*, 2014; Gaajetaan *et al.*, 2013; Moll *et al.*, 2011) war auch in der vorliegenden Arbeit die ISG mRNA-Expression durch die Stimulation mit beiden IFN α 2b und IFN β 1b gleichermaßen erhöht (siehe Abbildung 4.2).

Allerdings scheint die antivirale Aktivität einer IFN α und β -Stimulation modellabhängig zu sein. In einem Hepatitis B-Mausmodell war zum Beispiel die Induktion der ISG-Expression durch eine IFN α -Applikation stärker erhöht als durch IFN β (Y. Zhou *et al.*, 2017).

Die antivirale Aktivität von IFNen ist gut etabliert und wurde mehrfach durch Studien belegt. So wurde zum Beispiel gezeigt, dass sowohl immortalisierte Zelllinien, als auch primäre bronchiale Epithelzellen, durch eine Behandlung mit IFN β vor Infektionen mit HRV geschützt waren (Cakebread *et al.*, 2011; Essaidi-Laziosi *et al.*, 2020; Gaajetaan *et al.*, 2013; Gulraiz *et al.*, 2014). Es ist besonders hervorzuheben, dass IFNe nicht Virus-spezifisch wirken, sondern ihre antivirale Wirkung breitgefächert ist. So zeigte eine Studie in SARS-CoV-2 infizierten Vero-Zellen eine Inhibierung der viralen Infektion durch die Stimulation mit IFN α beziehungsweise IFN β (Mantlo, Bukreyeva, Maruyama, Paessler, & Huang, 2020). Auch konnte beispielsweise durch IFN α -Vorbehandlungen von Mäusen eine Reduktion in der viralen Replikation von Influenza H1N1 (Beilharz, Cummins, & Bennett, 2007) oder RSV nachgewiesen werden (Guerrero-Plata *et al.*, 2005).

Im Anschluss an die Wahl des IFN wurde in der vorliegenden Arbeit ein vergleichbarer protektiver Effekt durch eine Behandlung mit IFN β 1b und IFN β 1a in A549-Zellen während HRV16-Infektion nachgewiesen (siehe Abbildung 4.4).

Da diese Arbeit die antivirale Wirkung einer IFN β 1a-Vorbehandlung während einer HRV16-Infektion zeigte, wäre es zukünftig noch interessant, die antivirale Aktivität einer

IFN β 1a-Vorbehandlung während Infektionen mit unterschiedlichen Viren und in unterschiedlichen Zellmodellen zu überprüfen. So könnte verifiziert werden, dass der protektive Effekt einer IFN β 1a-Vorbehandlung auch in anderen Zelltypen, wie nasalen oder alveolaren Epithelzellen, wirksam ist. Die Rezeptoren für IFN β befinden sich jedoch nicht nur auf Epithelzellen, weswegen die Wirkung einer IFN β 1a-Vorbehandlung auch auf andere Zelltypen und ebenfalls auf Immunzellen untersucht werden sollte. Dabei käme das *in vitro*-Modell der pBECs in ALI-Kultur an seine Grenzen. Aus diesem Grund wäre das Testen der IFN β 1a-Vorbehandlung in weiteren Modellen, wie zum Beispiel *ex vivo* in humanen Präzisionslungenschnitten, Lungenorganoiden oder Ko-Kulturen der pBECs in ALI-Kultur mit Immunzellen denkbar. Um auch adressieren zu können, ob die Vorbehandlung Nebenwirkungen mit sich bringt, könnten *in vivo*-Modelle, wie humanisierte Mäuse mit IFN β 1a behandelt werden. Durch das verwenden dieses Modells könnte zusätzlich der systemische Kontext, sowie der Effekt einer IFN β 1a-Vorbehandlung auf das Immunsystem abgebildet werden.

Um einen zweiten Behandlungsansatz zu überprüfen, könnte in Zukunft die hier getestete prophylaktische Behandlung mit einer therapeutischen verglichen werden, bei welcher IFN β 1a erst nach Vorliegen einer viralen Infektion eingesetzt werden würde. So könnte nachvollzogen werden, ob IFN β 1a die Zellen auch während einer bereits vorliegenden Infektion schützt und zum Beispiel eine schnellere Beseitigung der Viren bewirkt. Dies wäre vor allem für eine klinische Anwendung interessant. Es könnte so kontrolliert werden, ob eine IFN β 1a-Behandlung bei einer akut bestehenden respiratorischen Infektion und ohne eine vorangegangene prophylaktische Behandlung eingesetzt werden könnte.

Auch wäre es interessant zu prüfen, inwiefern noch geringere IFN-Konzentrationen wirksam wären und einen vergleichbaren antiviralen Effekt erzielen könnten. Müsste nur eine geringe IFN β 1a-Konzentration für einen protektiven Effekt gegen virale Infektionen eingesetzt werden, könnte dies, gerade im Hinblick für einen pharmakologischen Einsatz von IFN β 1a, einen Vorteil hinsichtlich der Verträglichkeit sowie einen ökonomischen Vorteil mit sich bringen.

In den Studien von Gaajetaan *et al.* und Gulraiz *et al.* wurde die epitheliale Zelllinie nur für 18 h mit IFN inkubiert (Gaajetaan *et al.*, 2013; Gulraiz *et al.*, 2014).

Da in der vorliegenden Arbeit kein Vergleich von unterschiedlichen Behandlungszeiträumen erfolgte, wäre es interessant zu sehen, ob eine kürzere oder längere Behandlungsdauer einen Effekt auf die antivirale Aktivität aufweist und diese dadurch eventuell sogar verstärkt werden kann. Auch sollte untersucht werden, wie lange der Effekt einer IFN β 1a-Vorbehandlung anhält und ob eine wiederholte IFN β 1a-Gabe den antiviralen Effekt auf lange Sicht verstärkt oder ob ein Gewöhnungseffekt auftritt und der Effekt stagniert.

In der vorliegenden Arbeit wurde nur ein Modell der IFN-Behandlung durchgeführt. Die Infektion

mit HRV16 geschah unter der kontinuierlichen Anwesenheit von IFN β 1a. Interessanterweise wurde in den Arbeiten von Gaajetaan *et al.* und Gulraiz *et al.* auch ein zweites IFN-Behandlungsmodell auf antivirale Aktivität hin überprüft (Gaajetaan *et al.*, 2013; Gulraiz *et al.*, 2014). Dabei wurden die Epithelzellen mit IFN vorbehandelt, die HRV-Infektion erfolgte aber ohne IFN. Die Autoren zeigten so, dass die kontinuierliche Anwesenheit von IFN nicht erforderlich für einen antiviralen Effekt ist und die Zellen auch nach 72 h viraler Infektion in der Lage waren ihren antiviralen Zustand aufrechtzuerhalten (Gaajetaan *et al.*, 2013; Gulraiz *et al.*, 2014).

Entscheidend für die Wirkweise ist auch der Typ der IFNe. Die Rezeptoren der Typ III IFNe sind unter anderem auf Atemwegsepithelzellen vertreten, die gleichzeitig die Eintrittszellen für respiratorische Viren darstellen (Jewell *et al.*, 2010). Es wurde gezeigt, dass nicht nur IFN Typ I, sondern auch IFN Typ III immortalisierte Zellen und differenzierte Atemwegsepithelzellen vor viralen Infektionen, wie einer HRV-Infektion, schützen kann (Essaidi-Laziosi *et al.*, 2020; Gulraiz *et al.*, 2014). Die Expression der IFN Typ III-aktivierten ISGs beginnt zwar erst nach der Induktion der durch IFN Typ I-aktivierten ISGs (Bolen *et al.*, 2014; Lazear *et al.*, 2019), jedoch könnte genau diese zeitliche Verschiebung ein Vorteil bei der Entwicklung einer IFN-Behandlung sein. In humanen Atemwegsepithelzellen wurde ein synergistischer Effekt von IFN β und IFN λ 1 festgestellt, der zu einer verstärkten Inhibierung der Influenza-Replikation führte (Ilyushina & Donnelly, 2014). Somit wäre dieser synergistische Effekt für den Ansatz einer IFN-Therapie sehr interessant. In der vorliegenden Arbeit wurden bereits A549-Zellen vor der HRV-Infektion gleichzeitig mit denselben Konzentration IFN β und IFN λ behandelt. Diese Kombination zeigte allerdings keinen synergistischen antiviralen Effekt. In Zukunft sollten weitere Kombinationsversuche mit unterschiedlichen Konzentrationen der IFNe Typ I und Typ III durchgeführt werden, um einen potenziell synergistischen Effekt zu prüfen, welcher eventuell für einen therapeutischen IFN-Ansatz in Frage käme.

5.2. Primäre bronchiale Epithelzellen als Modell

Für die Experimente dieser Arbeit wurden differenzierte humane primäre bronchiale Epithelzellen in ALI-Kultur als *in vitro* Modell verwendet.

Nach der Isolation und der anschließenden Charakterisierung der pBECs wurde die Differenzierung mit Hilfe von unterschiedlichen Methoden überprüft (siehe Abbildung 4.6). So wurde der transepitheliale Widerstand bestimmt. Dieser stieg über die Zeit an und war ähnlich

zu den Werten anderer Arbeiten (Faris *et al.*, 2016; Leung, Wadsworth, Yang, & Dorscheid, 2020; Pezzulo *et al.*, 2011). Ausgebildete *Tight Junction*-Netze wurden in differenzierten pBECs in ALI-Kultur, analog zu publizierten Studien (Michi *et al.*, 2021; Sajjan *et al.*, 2008) mittels Immunfluoreszenzfärbung gegen ZO-1 und anschließender KLSM-Analyse verifiziert. Auch ein Anstieg der Zilien-tragenden Zellen über die Zeit wurde während der Differenzierung durch die Analyse mit dem Durchflusszytometer, ebenfalls beschrieben in der Literatur (Bonser *et al.*, 2021), und durch die regelmäßige Kontrolle mit dem Lichtmikroskop nachgewiesen. Sehr gut nachweisbar waren die Zilien der differenzierten Zellen zusätzlich in den Methylenblau-gefärbten Semi-Dünnschnitten der ALI-Kulturen.

Zum weiteren Nachweis der Differenzierung wurde außerdem der von den Zellen gebildete Mukus durch einen Muzin 5AC-*Dot-Blot* nachgewiesen. Auch dieser Nachweis einer Differenzierung ist gut etabliert (Leung *et al.*, 2020; Stewart *et al.*, 2012).

Andere Zelllinien werden in publizierten Arbeiten ebenfalls als *in vitro* Modelle der Lunge genutzt. Diese immortalisierten Linien, wie zum Beispiel A549-Zellen, BEAS-2B-Zellen, Calu-3-Zellen oder 16HBE14o-Zellen, weisen allerdings nicht alle Merkmale der differenzierten pBECs in ALI-Kultur auf. Die Ausbildung von Zilien und einem pseudostratifizierten Epithel sowie die Produktion von Mukus und das Ansteigen des transepithelialen Widerstands konnte in immortalisierten Zelllinien nicht gleichzeitig nachgewiesen werden (Grainger, Greenwell, Lockley, Martin, & Forbes, 2006; Stewart *et al.*, 2012; Walzl *et al.*, 2018; Wan *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2017). So wurden zum Beispiel bei der Zelllinie BEAS-2B in ALI-Kultur Zilien durch den Zilien-Marker β -Tubulin IV gezeigt, eine Mukusproduktion blieb jedoch aus (Stewart *et al.*, 2012). Durch ihre ausgeprägte Differenzierung spiegeln die hier verwendeten pBECs in ALI-Kultur die *in vivo* Bedingungen des humanen Atemwegsepithel deutlich besser wieder (Jiang, Schaefer, & Chu, 2018; Pezzulo *et al.*, 2011; Prytherch *et al.*, 2011). Zusätzlich besteht die Möglichkeit, Zellen lungenkranker Spender zu verwenden und damit verschiedene Krankheiten im *in vitro*-Modell abzubilden.

Trotz der Vorteile enthält das Modell der pBECs in ALI-Kultur auch Limitationen. So ist zum Beispiel die mehrwöchige Kulturhaltung dieses Zellmodells bis zur Differenzierung erheblich aufwendiger und zeitintensiver als die Kultur immortalisierter Zelllinien. Die benötigte Zeit bis zur Differenzierung der Zellen ist zwar ähnlich zu der benötigten Zeit in publizierten Arbeiten (Bonser *et al.*, 2021; Michi & Proud, 2021), die möglichen Experimente werden allerdings durch den Zeitaufwand sowie das begrenzt zur Verfügung stehende Gewebe für die Zellisolation stark eingeschränkt. Das Modell eignet sich somit nicht oder nur bedingt für beispielsweise Hochdurchsatz-Screenings.

Durch den Bezug des Gewebes zur Zellisolation aus Lungen-Explantaten stand nur Material von

Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen zur Verfügung. Bekannt ist, dass der transepitheliale Widerstand von pBECs in ALI-Kultur von Spendern mit COPD, beziehungsweise Lungenemphysem geringer ausfällt als der der Zellen von Lungengesunden (Staudt *et al.*, 2014) und Spendern mit zystischer Fibrose (CF) (Endres, 2020). Da in der vorliegenden Arbeit allerdings der transepitheliale Widerstand eine wichtige Messgröße darstellte, wurden hier Zellen von Spendern mit CF genutzt, um auch geringe Unterschiede im Widerstand besser detektieren zu können.

Um die Ergebnisse dieser Arbeit später für einen möglichen Therapieansatz in Lungengesunden zum Schutz vor respiratorischen Viren und Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen zum Schutz vor Exazerbationen und sekundären bakteriellen Infektionen nutzen zu können, sollten die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente in Zukunft mit Zellen aus explantierten Lungen von Patienten mit anderen chronischen Lungenerkrankungen, sowie mit kommerziell erworbenen pBECs in ALI-Kultur aus lungengesunden Spendern durchgeführt und die gewonnenen Ergebnisse miteinander verglichen werden.

5.3. Protektiver Effekt einer IFN β -Vorbehandlung auf primäre bronchiale Epithelzellen während einer HRV-Infektion

Der protektive Effekt einer IFN β 1a-Vorbehandlung konnte durch eine signifikante Reduktion der Viruslast in differenzierten primären bronchialen Epithelzellen 24 h - 72 h nach einer HRV16-Infektion nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.7). Dieses Ergebnis bekräftigt die Resultate mehrerer Studien mit nicht differenzierten primären bronchialen Epithelzellen (Cakebread *et al.*, 2011; Gaajetaan *et al.*, 2013; Gulraiz *et al.*, 2014). Innerhalb der vorliegenden Arbeit fiel auf, dass die Anzahl der Viruskopien der unbehandelten, HRV16-infizierten Zellen mit fortschreitender viraler Infektion scheinbar abnahm, eine statistische Signifikanz konnte allerdings nicht festgestellt werden. Begründet werden könnte dies in einem Erreichen des viralen Replikationsmaximums über die Zeit oder durch einen über die Zeit zunehmenden HRV-induzierten Zelltod, wodurch weniger Zellen virale Partikel produzieren konnten. Eine Infektion mit HRV16 reduzierte über die Zeit zunehmend die Zellviabilität (siehe Abbildung 4.9). Diese Ergebnisse bestätigten bereits publizierte Daten aus differenzierten tracheobronchialen Epithelzellen der menschlichen Atemwege, in deren Medien nach HRV-C15-Infektion erhöhte LDH-Level nachgewiesen wurden (Gagliardi *et al.*, 2022). In bronchialen Epithelzellen in ALI-Kultur waren Apoptosegene, wie Caspase 3 und 7, durch eine HRV16-Infektion hochreguliert

(Lopez-Souza *et al.*, 2009).

Auffällig war, dass In der vorliegenden Arbeit ein signifikanter Effekt auf die Viabilität der unbehandelten, HRV16-infizierten Zellen mittels *LIVE/DEAD*-Assays erst nach 72 h nachweisbar war, wohingegen der LDH-Assay einen signifikanten Effekt bereits nach 24 h zeigte. Vermutlich sind besonders tote Zellen durch das vermehrte Waschen der Zellen vor der Durchführung des *LIVE/DEAD*-Assays verloren gegangen. Um Waschschritte zu vermeiden, könnten in Zukunft die Zellen durch Zellschaber von der Membran des TC-Inserts gelöst werden. Im basalen Medium konnte mittels LDH-Assay keinerlei Zytotoxizität nachgewiesen werden, was die Studie von Gagliardi *et al.* bestätigte (Gagliardi *et al.*, 2022). Auch Sajjan *et al.* konnten keinen HRV-induzierten zytotoxischen Effekt im basalen Medium differenzierter humaner Atemwegsepithelzellen durch einen LDH-Assay nachweisen (Sajjan *et al.*, 2008). Es ist also anzunehmen, dass die LDH-Ausschüttung der Zellen nur apikal nachvollzogen werden kann.

Wurden die Zellen zusätzlich mit IFN β 1a vorbehandelt, wurde der zytotoxische Effekt durch eine HRV16-Infektion, wie in dieser Arbeit gezeigt, verhindert (siehe Abbildung 4.9). Somit schützte eine IFN β 1a-Behandlung die pBECs in ALI-Kultur signifikant vor dem Effekt einer HRV16-Infektion.

Durch die Bestimmung der mRNA-Expression des ISGs OASL konnte zusätzlich die antivirale Antwort einer IFN β 1a-Behandlung bestätigt werden. Die Expression war ähnlich zu der ISG-Expression der unbehandelten, HRV16-infizierten Zellen (siehe Abbildung 4.8). Eine antivirale Antwort der Zellen wurde, wie erwartet, sowohl durch HRV-Infektion als auch durch IFN β 1a-Behandlung induziert. In mehreren anderen Studien wurde eine gesteigerte Expression der ISGs RSAD2, ISG15 und OASL nach HRV-Infektion in unterschiedlichen Zelltypen nachgewiesen (Y. Chen *et al.*, 2006; Michi *et al.*, 2021; Proud *et al.*, 2008; Zaheer *et al.*, 2014). Die ISGs der OAS-Familie sind in der Lage, einzelsträngige RNAs viralen und zellulären Ursprungs zu degenerieren und Apoptose zu initiieren (Castelli, Wood, & Youle, 1998; Y. Chen *et al.*, 2006). Um ein besseres Verständnis über den protektiven Effekt einer IFN β 1a-Behandlung zu erlangen, könnte die Expression Apoptose-initiiender ISGs in Abhängigkeit einer HRV-Infektion mit und ohne IFN-Behandlung zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht werden. Auch könnte man zum Beispiel die Expression des TNF-verwandten Apoptose-induzierenden Liganden (TRAIL) sowie dessen Rezeptoren untersuchen. TRAIL ist IFN-induziert (S. Liu, Yu, Zhang, Wang, & Cao, 2001) und Auslöser von Apoptose in infizierter Zellen, wodurch es die Ausbreitung der Viren vermindert (Brincks, Katewa, Kucaba, Griffith, & Legge, 2008). Zusätzlich löst TRAIL aber auch in uninfizierten, benachbarten Zellen Apoptose aus, wodurch gleichzeitig das Epithel geschädigt wird (Högner *et al.*, 2013). Publiziert ist, dass die Expression der Rezeptoren für TRAIL, den sogenannten Todesrezeptoren (*Death Receptor*; DR), in Zellen mit einer viralen Infektion erhöht

ist. Dabei zeigten die Autoren aber auch, dass die Stimulation mit IFN β in undifferenzierten, murinen Atemwegsepithelzellen mit Influenza-Infektion keinen Effekt auf die Expression von DR5 zeigte (Högner *et al.*, 2013). Zukünftig könnte in unterschiedlichen *in vivo* und *ex vivo* Modellen überprüft werden, ob eine Vorbehandlung mit IFN β 1a die Virus-induzierte Expression von TRAIL und seinen Rezeptoren reduziert und dadurch die Apoptose der Zellen vermindert wird.

Bekannt ist, dass HRV in der Lage ist die *Tight Junctions* der epithelialen Barriere zu beeinträchtigen (Gagliardi *et al.*, 2022; Michi *et al.*, 2021; Sajjan *et al.*, 2008). Im Gegensatz zu Influenzaviren scheinen HRVs die Barrierefunktion nur zu beeinträchtigen und nicht umfangreich zu beschädigen (Comstock *et al.*, 2011; Sajjan *et al.*, 2008). Innerhalb der verschiedenen HRV-Stämme wurden unterschiedlich starke Beeinträchtigungen der Barriere differenzierter Epithelzellen gezeigt (J. H. Kim, Jang, & Jang, 2021; Michi *et al.*, 2021). So konnte in humanen trachealen Kulturen kein Effekt auf die Barrierefunktion durch eine HRV16-Infektion nachgewiesen werden (Lachowicz-Scroggins, Boushey, Finkbeiner, & Widdicombe, 2010). In einer anderen Studie wurde ein HRV16-induzierter Effekt in humanen bronchialen Epithelzellen in ALI-Kultur beobachtet, der jedoch geringer als die Effekte durch eine HRV1B- und HRV-C15-Infektion ausfiel (Michi *et al.*, 2021). HRV16 infiziert nur eine geringe Anzahl epithelialer Atemwegszellen, hauptsächlich Zilien-tragende Zellen (Mosser *et al.*, 2002; Warner, Wiehler, Michi, & Proud, 2019), was diesen schwächeren Effekt erklären könnte (Mosser *et al.*, 2002).

In der vorliegenden Arbeit konnte ein Effekt auf die epitheliale Barriere durch eine HRV16-Infektion in pBECs in ALI-Kultur nachgewiesen werden. So wurden 48 h und 72 h nach der viralen Infektion unvollständige und teilweise dissoziierte ZO-1-gefärbte *Tight Junction*-Netze sowie eine signifikante Reduktion der *Tight Junction*-Fläche gezeigt. Dieser Effekt war nicht sichtbar, wenn die Zellen vorab mit IFN β 1a behandelt wurden (siehe Abbildung 4.12 und 4.13). So lagen die ZO-1-gefärbten *Tight Junctions* der IFN β 1a-behandelten, HRV16-infizierten Zellen an allen Zeitpunkten vollständig vor.

Da Typ I und Typ III IFNe ein breites antivirales Wirkungsspektrum haben, sollten zukünftig auch Infektionen mit weiteren HRV-Stämmen beziehungsweise anderen respiratorischen Viren durchgeführt werden. So könnte untersucht werden, ob ebenfalls ein Effekt auf die epitheliale Barriere der ALI-Kulturen vorliegt, ob diese Effekte stärker sind als die HRV16-induzierten Effekte auf die Barriere und ob eine IFN β 1a-Behandlung auch in der Lage ist vor den Effekten anderer respiratorischer Viren zu schützen. Diese Versuche könnten sowohl in den hier verwendeten pBECs in ALI-Kultur erfolgen, als auch in *ex vivo*, beziehungsweise *in vivo*-Modellen, um

gleichzeitig die Wirkweise der IFN β 1a-Behandlung während Infektionen mit unterschiedlichen Viren auf das Immunsystem zu untersuchen.

Zusätzlich zur Analyse der *Tight Junctions* wurde auch die mRNA-Expression einzelner Markerproteine unterschiedlicher Zelltypen überprüft.

Die mRNA-Expression von SCGB3A1, einem Marker für Clubzellen, war nach 72 h Infektion mit HRV16 im Vergleich zur Expression der unbehandelten, uninfizierten Kontrollzellen signifikant reduziert. Wang *et al.* zeigten ebenfalls nach 72-stündiger HRV16-Infektion von pBECs in ALI-Kultur eine verringerte mRNA-Expression von SCGB1A1, einem weiteren Marker für Clubzellen. Aufgrund der zeitgleichen HRV-induzierten Reduktion der mRNA-Expression von FOXP-1 und der erhöhten Expression von MUC5AC (Marker für Becherzellen) mutmaßten die Autoren, dass Zilien-tragende Zellen und Clubzellen während einer HRV16-Infektion in Becherzellen transdifferenzieren könnten (Y. Wang, Ninaber, van Schadewijk, & Hiemstra, 2020). Um in Zukunft zu prüfen, ob sich die Anzahl der unterschiedlichen Zelltypen durch eine HRV16-Infektion verändert, könnte zukünftig eine Analyse der Zelltypen während einer HRV16-Infektion der ALI-Kulturen am Durchflusszytometer erfolgen. Auch könnten HRV16-infizierte bronchiale Organoiden mit Markern für unterschiedliche Zelltypen immunfluoreszenzmarkiert und mittels KLSM zu unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert werden, inwieweit sich die Zusammensetzung der unterschiedlichen Zelltypen während einer HRV16-Infektion verändert.

Aufgrund der Quantifizierung der *Tight Junctions* wurde erwartet, dass der epitheliale Widerstand der Barriere der unbehandelten, HRV16-infizierten Zellen über die Zeit abnehmen und die Permeabilität der epithelialen Barriere dieser Zellen zunehmen würde.

Gemäß den Erwartungen war der epitheliale Widerstand der Barriere der HRV16-infizierten pBECs in ALI-Kultur am 24 h-Zeitpunkt signifikant reduziert und die Permeabilität der Barriere signifikant erhöht. Auch in anderen Studien konnte in Atemwegsepithelzellen in ALI-Kultur nach einer 24-stündigen Infektion mit HRV mittels TEER oder Permeabilitäts-Assay eine Beeinträchtigung der Barrierefunktion nachgewiesen werden (Gagliardi *et al.*, 2022; Michi *et al.*, 2021; Sajjan *et al.*, 2008).

Nach 48 h und 72 h HRV16-Infektion kehrten Widerstand und Permeabilität der epithelialen Barriere allerdings wieder auf ein Level ähnlich des Widerstand und der Permeabilität der unbehandelten, uninfizierten Kontrollzellen zurück (siehe Abbildung 4.17). Auch dieses Ergebnis deckt sich mit den Beobachtungen anderer Studien, in denen nach einer 48-stündigen HRV-Infektion keinerlei Reduktion des TEERs der primären Atemwegsepithelzellen in ALI-Kultur im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrollzellen gezeigt werden konnte (Essaidi-Laziosi *et al.*, 2018; Gagliardi *et al.*, 2022; Lopez-Souza *et al.*, 2009). Dabei wurde der Widerstand in den

meisten Studien, anders als in dieser Arbeit, jedoch nur an einem Zeitpunkt gemessen. Gagliardi *et al.* zeigten ebenfalls wie hier einen zeitlichen Verlauf, bei welchem der transepitheliale Widerstand der Barriere differenzierter primärer Epithelzellen nach 24-stündiger HRV-Infektion reduziert war und am 48 h-Zeitpunkt wieder zunahm (Gagliardi *et al.*, 2022). Dem gegenüber steht eine Studie, welche einen verringerten TEER in primären nasalen Epithelzellen nach einer Infektion von 48 h mit HRV16 zeigt (N. K. Yeo & Jang, 2010). Zu beachten ist dabei, dass es sich um nasale und nicht bronchiale Epithelzellen handelt und die Effekte dadurch eventuell nur bedingt vergleichbar sind (N. K. Yeo & Jang, 2010).

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass eine IFN β 1a-Behandlung die Barriere der pBECs in ALI-Kultur signifikant vor der HRV16-induzierten Reduktion des Widerstands und der Erhöhung der Permeabilität schützt (siehe Abbildung 4.17 und 4.18). So waren die IFN β 1a-behandelten, HRV16-infizierten Zellen an allen Zeitpunkten ähnlich zu dem Widerstand und der Permeabilität der unbehandelten, uninfizierten Kontrollzellen.

Allerdings ist bis dato unklar, warum die mittels KLSM gefundenen ZO-1-immunreaktiven *Tight Junctions* 48 h nach Infektion eine HRV-induzierte Dissoziation aufwiesen, obwohl die Barrierefunktion der unbehandelten, HRV16-infizierten Zellen zu diesem Zeitpunkt wieder ähnlich zu der der unbehandelten, uninfizierten Kontrollzellen war. Gagliardi *et al.* beobachteten ein ähnliches Phänomen: Da sie keine Reduktion in ZO-1 auf Proteinebene nachweisen konnten, schlussfolgerten die Autoren, dass eine Translokation der *Tight Junction*-Proteine vorliegt (Gagliardi *et al.*, 2022). Diese Erkenntnis könnte auf das in der vorliegenden Arbeit verwendete Modellsystem übertragbar sein: Die mRNA-Expression von ZO-1 war in der vorliegenden Arbeit zu keinem Zeitpunkt signifikant durch eine HRV-Infektion vermindert, obwohl die ZO-1-immunreaktiven *Tight Junctions* nach 48 h und 72 h viraler Infektion dissoziiert waren. In humanen Lungenepithelzellen konnten Wray *et al.*, mittels siRNA *knockdown* von Claudin-4, einen verminderten transepithelialen Widerstand nachweisen (Wray *et al.*, 2009). Eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression von Claudin-4 war allerdings in der vorliegenden Arbeit nur nach 48 h in den unbehandelten, HRV16-infizierten Zellen im Vergleich zu IFN β 1a-behandelten, HRV16-infizierten Zellen nachweisbar (siehe Abbildung 4.14).

In einer publizierten Studie (Faris *et al.*, 2016) wurde eine verminderte mRNA-Expression des *Adherence Junction*-Proteins E-Cadherin durch eine HRV16-Infektion nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit konnte keine signifikante Veränderung in der mRNA-Expression von E-Cadherin durch HRV-Infektion festgestellt werden. Sollte aber eine Verringerung des *Adherence Junction*-Proteins vorliegen, könnte die Bildung der *Junction*-Komplexe an apikolateralen Verbindungsstellen verhindert sein, was zu einer beeinträchtigten Barrierefunktion nach 24 h

viraler Infektion beitragen könnte.

In einem Mausmodell mit Claudin-18-*Knockout* wurde gezeigt, dass sich *Tight Junction*-Proteine zum Teil gegenseitig kompensieren können (Li *et al.*, 2014). So könnte eine HRV-Infektion zur temporären Erhöhung der Barriere Permeabilität nach 24 h führen, indem die *Junction*-Komplexe durch eine verringerte E-Cadherin-Expression nicht gebildet werden können. Durch die Translokation von ZO-1 nach 48 h und 72 h könnte dies aber wieder ausgeglichen werden. Auch weitere *Tight Junction*-Proteine, wie unterschiedliche Claudine, könnten an dieser Translokation durch eine verstärkte Expression auf Proteinebene mitwirken. In Zukunft sollten mehrere *Tight Junction*-Proteine, sowie mehrere unterschiedliche Claudine oder Occludin, nach einer IFN β 1a-Behandlung und HRV16-Infektion auf Proteinebene untersucht werden. So kann geprüft werden, ob die mRNA-Expression der Zellen auch der tatsächlichen Protein-Expression entspricht. Zusätzlich könnten weitere Immunfluoreszenzfärbungen gegen unterschiedliche Proteine der *Tight Junctions* vorgenommen werden, um zu prüfen, ob auch bei diesen Proteinen eine Translokation möglich ist.

Eine IFN β 1a-Behandlung scheint die Zellen vor einer Virus-induzierten ZO-1-Translokation zu schützen. Gerade deswegen wäre es interessant zu untersuchen, ob eine IFN-Behandlung die Synthese der *Tight Junction*-Proteine verändert oder Auswirkungen einer Behandlung auf unterschiedliche *Tight Junction*-Proteine mittels Immunfluoreszenzfärbung detektiert werden können.

Gegen die Translokations-Hypothese, beziehungsweise die hochregulierten mRNA-Expressionen von *Tight Junction*-Proteinen nach einer HRV-Infektion, sprechen Studien, bei welchen reduzierte mRNA-Expressionen von *Tight Junction*-Proteinen nach einer HRV-Infektion gefunden wurden (Looi *et al.*, 2018; N. K. Yeo & Jang, 2010). Es ist jedoch zu beachten, dass Yeo *et al.* humane nasale und nicht bronchiale Epithelzellen verwendete (N. K. Yeo & Jang, 2010). Eine andere Studie zeigte in HRV1B-infizierten Atemwegsepithelzellen in ALI-Kultur von Spendern mit und ohne Asthma eine verringerte mRNA-Expression von *Tight Junction*-Proteinen, wie ZO-1 oder Claudin-1 (Looi *et al.*, 2018). In dieser Studie wurde jedoch ein anderer Virusstamm verwendet, was die mRNA-Expression der *Tight Junction*-Proteine beeinflussen könnte. Es wäre also sinnvoll, zukünftig zu vergleichen, ob sich durch verschiedene HRV-Stämme unterschiedliche Ergebnisse der mRNA-Expression von *Tight Junction*-Proteinen ergeben.

Trotz allem kann mit den hier generierten Ergebnissen nicht sicher ausgeschlossen werden, dass der protektive Effekt einer IFN-Vorbehandlung auf einer Reduktion der Viruslast beruht und dementsprechend die Barriere somit nur indirekt geschützt wird. Auch ist weiterhin ungewiss, ob die steigende HRV16-induzierte Zytotoxizität der Auslöser für die Beeinträchtigung der *Tight*

Junction-Netze nach 48 h und 72 h ist. Einige Studien sprechen allerdings gegen diese Erklärung, so zeigten Faris *et al.* und Sajjan *et al.* zum Beispiel trotz HRV-induzierter beeinträchtigter Barrierefunktion keinen Anstieg in der Zytotoxizität (Faris *et al.*, 2016; Sajjan *et al.*, 2008).

Dass der HRV-induzierte zytotoxische Effekt über die Zeit steigt, die Reduktion der Barrierefunktion allerdings vorübergehend ist und sich nach einiger Zeit wiederherstellt, ist der Hypothese, dass ein zytotoxischer Effekt für die Beeinträchtigung der Barrierefunktion verantwortlich ist, entgegenzusetzen. Trotzdem sollten in Zukunft weitere Untersuchungen in diese Richtung unternommen werden. So könnten pBECs in ALI-Kultur oder humane Lungenorganoide mit fluoreszenzmarkiertem HRV16 infiziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten fixiert und immunchemisch mit Apoptose- und *Tight Junction*-Markern untersucht werden, um das *Tight Junction*-Netz sichtbar zu machen. Mittels KLSM-Analyse könnte dann eingrenzt werden, ob an den Stellen, an denen HRV16 an die Zellen bindet Apoptose und gleichzeitig eine Dissoziation der *Tight Junctions* auftritt. Auch wäre es interessant zu untersuchen, ob eine Regeneration der Barriere durch die erhöhte Teilung von basalen Zellen und deren Differenzierung zu Zilien-tragenden und sekretorische Zellen unterstützt wird (Rock *et al.*, 2009; Wansleben, Barkauskas, Rock, & Hogan, 2013). Erste Versuche zur Quantifizierung dieser Zellen mittels Immunfluoreszenzuntersuchungen gaben in der vorliegenden Arbeit dazu allerdings keinen Aufschluss. Zukünftig könnten aber die oben genannten Modelle mit HRV16 infiziert, an unterschiedlichen Zeitpunkten fixiert und mit Markern für unterschiedliche Zelltypen, sowie Apoptose fluoreszenzgefärbt werden, um mittels KLSM nachvollziehen zu können welche Zelltypen durch die HRV-induzierte Apoptose betroffen und welche an der Regenerierung der Barriere beteiligt sind.

Neben einem direkten zytopathischen Effekt der Virusinfektion, könnte ein weiterer Grund für den zunehmenden Effekt einer HRV16-Infektion auf die Zellviabilität die stimulierte antivirale Antwort der Zellen sein. Hierdurch wird zum Beispiel die Expression von Apoptose-initiiierenden ISGs induziert. Eine Aktivierung der antiviralen Antwort nach HRV-Infektion und IFN-Stimulation wurde in dieser Arbeit durch eine erhöhte ISG mRNA-Expression nachgewiesen (siehe Abbildung 4.8). Michi *et al.* schlossen jedoch aus, dass eine erhöhte antivirale Antwort für den HRV-induzierten Effekt auf die Funktion des Atemwegsepithels verantwortlich ist (Michi *et al.*, 2021). Die Autoren konnten zeigen, dass die Barrierefunktion der HRV-infizierten ALI-Kulturen bereits nach 6-8-stündiger HRV-Infektion abnahm, während die ISG mRNA-Expression erst 20 h nach der Infektion signifikant erhöht war (Michi *et al.*, 2021). Durch die aktivierte antivirale Antwort werden allerdings Zytokine ausgeschüttet. In der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls die Konzentrationen einiger pro- und anti- inflammatorischen Zytokine im basalen Medium

bestimmt. Die Zytokine TGF- β 1, IL-1 β und IL-10 konnten in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden, da die Proteinkonzentration dieser Zytokine bei allen Bedingungen unterhalb der Nachweisgrenze lag.

Wie auch von anderen Gruppen publiziert (Essaidi-Laziosi *et al.*, 2018; Lopez-Souza *et al.*, 2009), kam es auch in der vorliegenden Arbeit bei den Zytokinen IL-8, IL-6, IP-10 und TNF- α zu einem HRV-vermittelten Anstieg der Zytokinkonzentration im Medium der ALI-Kulturen. Teilweise konnte eine IFN β 1a-Behandlung die Ausscheidung der Zytokine IL-8, IL-6 und TNF- α signifikant reduzieren (siehe Abbildung 4.10). Einzig bei IP-10 konnte eine Erhöhung sowohl durch eine HRV16-Infektion als auch durch eine IFN β 1a-Behandlung nachgewiesen werden. Die Konzentration von IP-10 der unbehandelten, HRV16-infizierten Zellen und der IFN β 1a-behandelten, HRV16-infizierten Zellen unterschied sich dabei jedoch nicht signifikant. Cakebread *et al.* sahen zwar ebenfalls eine erhöhte IP-10 Konzentration durch eine HRV16-Infektion und die Gabe von IFN β allein, jedoch wurde die IP-10 Konzentration in den HRV-infizierten, undifferenzierten pBECs durch eine IFN-Behandlung reduziert (Cakebread *et al.*, 2011).

Sajjan *et al.* nutzten neutralisierende Antikörper gegen die Zytokine IL-1 β und TNF- α und konnten trotzdem einen HRV-induzierten Effekt auf die Barriere von Calu-3-Zellen im Insert nachweisen. Somit konnten die Autoren ausschließen, dass erhöhte Level der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α einen Einfluss auf die Barrierefunktion haben und eher die virale Replikation für einen solchen Effekt verantwortlich ist (Sajjan *et al.*, 2008). Zukünftig könnten HRV16-Infektionen in Anwesenheit von mehreren Zytokin-neutralisierenden Antikörpern in den hier verwendeten ALI-Kulturen durchgeführt werden. So könnte untersucht werden, ob die Aktivierung der antiviralen Antwort einen Effekt auf die Barrierefunktion des Epithels während einer HRV-Infektion hat. Sollten die Zytokin-neutralisierenden Antikörper auch den HRV-induzierten Effekt auf die Zellviabilität reduzieren, könnte zusätzlich, bei gleichbleibendem Effekt auf die Barriere, ein Einfluss der Zytotoxizität ausgeschlossen werden. Zusätzlich könnten rekombinante pro-inflammatorische Zytokine zu den uninfizierten Zellen gegeben werden. Sollte dadurch die Barrierefunktion nicht beeinträchtigt werden, würde dies die Hypothese der viralen Replikation als Auslöser für die Beeinträchtigungen der Barriere bekräftigen.

Die Reduktion der Zytokinkonzentrationen durch eine IFN β 1a-Behandlung während einer HRV16-Infektion könnte unterschiedliche Ursachen haben. Zum einen wäre es denkbar, dass durch die IFN-Behandlung die HRV-induzierte Entzündungsantwort reduziert ist, wie es zum Beispiel durch eine IFN α -Behandlung von Mäusen mit akutem Atemnotsyndrom (Kudo *et al.*,

2013) oder in Patienten mit chronischer Hepatitis B (Carotenuto *et al.*, 2005) gezeigt wurde. Zum anderen könnte aber die geringe Konzentration an pro-inflammatorischen Zytokinen nach einer IFN β 1a-Behandlung durch die antivirale Wirkung von IFN begründet sein. Durch die Behandlung mit IFN β 1a verringerte sich die Anzahl der Viruskopien, was zu einer geringeren Entzündungsantwort führen könnte.

Die Zahl Viruskopien war an allen Zeitpunkten durch eine IFN β 1a-Behandlung geringer. Auch bei den 2 h - 12 h infizierten pBECs in ALI-Kultur konnten an allen getesteten Zeitpunkten in den mit IFN β 1a-behandelten Zellen signifikant weniger infektiöse Partikel nachgewiesen werden als in den unbehandelten Zellen (siehe Abbildung 4.27). Dieses Ergebnis spricht für den protektiven Effekt einer IFN β 1a-Behandlung während der frühen Phase der HRV16-Infektion.

Die Anzahl der viralen Partikel war 2 h nach HRV16-Infektion wie erwartet geringer als an allen anderen gemessenen Zeitpunkten. Die Dauer bis zu einer messbaren Produktion von neuen, infektiösen Partikeln nach einer HRV16-Infektion beträgt zum Beispiel 8 h (Hao *et al.*, 2012; Warner *et al.*, 2019) und nach einer SARS-CoV-2-Infektion 15 h (Lebourgeois *et al.*, 2021).

Auffällig war allerdings, dass bereits 2 h nach HRV16-Infektion die Anzahl der Viruskopien durch IFN β 1a-Behandlung reduziert war. An diesem Zeitpunkt wurde die vorher zugegebene HRV16-Solution apikal von den Zellen abgenommen. Erwartet wurde dementsprechend, dass zu diesem Zeitpunkt dieselbe Anzahl viraler Partikel in beiden Bedingungen nachgewiesen werden kann.

Dass in den IFN β 1a-behandelten Zellen weniger virale Partikel festgestellt wurden, könnte für eine abgeschwächte initiale Bindung des Virus an die Zellen sprechen. So konnte zum Beispiel eine verringerte Expression des viralen Eintrittsrezeptors ICAM-1 in Herzfibroblasten von Ratten gezeigt werden, die mit IFN β vorbehandelt wurden (Bolívar *et al.*, 2018). Auch in humanen primären Epithelzellen, die mit IFN γ vorbehandelt und anschließend mit HRV14 infiziert wurden, konnte eine reduzierte Expression des membranständigen ICAM-1 und damit verbunden ein reduzierter viraler Titer gezeigt werden (Whiteman & Spiteri, 2008). Zukünftig sollte die ICAM-1-Expression der pBECs in ALI-Kultur zu frühen Zeitpunkten nach der IFN β 1a-Behandlung und HRV-Infektion geprüft werden. Zusätzlich könnte ICAM-1 auch in pBECs in ALI-Kultur oder humanen Lungenorganoiden nach HRV16-Infektion fluoreszenzmarkiert und mittels KLSM quantifiziert werden. Sollte ICAM-1 bereits vor der HRV16-Infektion oder kurz nach der Infektion reduziert sein, würde das die geringere Anzahl viraler Partikel 2 h nach der HRV-Infektion in IFN β 1a-behandelten ALI-Kulturen erklären. Durch die verringerte Expression der viralen Rezeptoren, könnten effektiv weniger virale Partikel an die Zellen binden.

Ein anderer Grund für die geringere Anzahl viraler Partikel könnte auch eine frühe Aktivierung der antiviralen Antwort durch eine IFN-Vorbehandlung und der damit verbundenen Produktion von ISGs sein. ISGs haben unterschiedliche antivirale Aufgaben und kommen bei der

Bekämpfung von Viren an unterschiedlichen Stadien der viralen Replikation zum Einsatz. Einige ISGs, wie etwa das *Interferon-Induced Transmembrane Protein* (IFITM) oder *Human Nuclear Receptor Coactivator 7* (NCOA7), sind unter anderem in das Verhindern des Eintritts von Viren in die Zielzelle involviert (Doyle *et al.*, 2018; Spence *et al.*, 2019). In Zukunft könnte also die mRNA-Expression für weitere ISGs engmaschig vor und nach der viralen Infektion überprüft werden, um zu zeigen, ob es eine frühe hochregulierte mRNA-Expression von ISGs gibt, die die Bindung des Virus an den Rezeptor oder das Eintreten des Virus in die Wirtszelle verhindern. Zusätzlich könnte auch der Viruseintritt in Zellen mit und ohne IFN β 1a-Behandlung mittels *Live-Cell* Mikroskopie überprüft und quantifiziert werden. Dazu könnten humane Lungenorganoide verwendet werden, die die funktionellen und morphologischen Eigenschaften der Atemwege abbilden. Diese Organoide könnten mit fluoreszenzmarkiertem Virus infiziert werden, um zu überprüfen, ob dieselbe Anzahl viraler Partikel in IFN β 1a vorbehandelte Zellen gelangt wie in unbehandelte Zellen.

5.4. Auswirkung von IFN β auf die Barrierefunktion von primären bronchialen Epithelzellen während einer viral-bakteriellen Ko-Infektion

In Vorversuchen zu den viral-bakteriellen Ko-Infektionen dieser Arbeit wurde für die *S. pneumoniae* 19F-Infektion der pBECs in ALI-Kultur eine einzusetzende MOI von 10 bestimmt. Nach der 8-stündigen Infektion mit dieser MOI lösten sich die Zellen nicht von der Membran des TC-Inserts und die Zellschicht war weiterhin so gut erhalten, dass die bakterielle Translokation anschließend mittels Immunfluoreszenzfärbung und KLSM ermittelt werden konnte.

In anderen Studien wurden primäre Epithelzellen in ALI-Kultur für 1 h und 3 h mit *S. pneumoniae* in einer MOI von 100 (A. J. Yeo *et al.*, 2019) oder für 6 h - 30 h mit MOIs von 15 oder 30 infiziert (Kahlert *et al.*, 2021). Da ein Ziel dieser Arbeit die Quantifizierung der bakteriellen Translokation war, wurde eine geringere MOI gewählt, bei der nach einem längeren Inkubationszeitraum die Bakterien zwar weiter in die Zellschicht einwandern, aber das TC-Insert nicht überwuchern konnten.

Mittels TCID₅₀ wurde die Viruslast der ALI-Kulturen nach einer HRV16-Infektion gemessen und sichergestellt, dass vor einer Infektion mit *S. pneumoniae* eine virale Infektion vorlag (siehe Abbildung 4.20).

Auch konnte anhand dieser Experimente gezeigt werden, dass der Barriere-Widerstand der Zellen durch eine HRV16-Infektion und auch durch eine Ko-Infektion nach 24 h + 8 h im Vergleich

zu den uninfizierten Kontrollzellen und IFN β 1a-behandelten Zellen signifikant verringert war. Dieser Effekt war, wie bereits vorher bei den HRV16-infizierten pBECs in ALI-Kultur gezeigt, nach längeren Inkubationszeiten (48 h + 8 h und 72 h + 8 h) nicht mehr sichtbar (siehe Abbildung 4.21).

Zu allen drei Zeitpunkten wurde allerdings, unter verschiedenen Bedingungen, eine signifikante Verringerung des Widerstands allein durch eine *S. pneumoniae*-Infektion festgestellt. Diese Verringerungen lassen darauf schließen, dass die Integrität der Zellschicht trotz der geringen MOI bereits beeinträchtigt war.

Auch in anderen Studien wurde die Abnahme des TEERs nach einer Infektion mit verschiedenen *S. pneumoniae*-Stämmen in Atemwegsepithelzellen in ALI-Kultur nachgewiesen. So war im Vergleich zu den uninfizierten Kontrollzellen eine Abnahme des Widerstands nach Inkubation mit *S. pneumoniae* des Serotyps TIGR4 sichtbar, die sich vergrößerte, je länger die Zellen mit den Bakterien inkubiert wurden (Kahlert *et al.*, 2021). Auch Yeo *et al.* wiesen einen reduzierten TEER nach der Infektion mit *S. pneumoniae* des Serotyps D39 in Zellen von Spendern mit Ataxia teleangiectatica und in Zellen von Lungengesunden nach. Diese Reduktion nahm ebenfalls über die Dauer der Infektion zu (A. J. Yeo *et al.*, 2019).

Konträr dazu wurden in unterschiedlichen Epithelzelllinien, die als Monolayer vorlagen, nach einer Inkubation der *S. pneumoniae* Serotypen 6B, 23F und TIGR4 keine Veränderung im TEER gefunden (Weight *et al.*, 2019). Der Grund für die fehlende Reduktion des TEERs in den immortalisierten Zelllinien könnte zum einen durch die fehlende Differenzierung der immortalisierten Zelllinien begründet sein. Da allerdings in den nasalen Atemwegsepithelzellen in ALI-Kultur durch den Serotyp D39 auch keine Reduktion des Widerstands gefunden wurde (A. J. Yeo *et al.*, 2019), könnte ebenfalls die Verwendung unterschiedlicher Serotypen von *S. pneumoniae* eine Erklärung für diese zum Teil widersprüchlichen Daten sein.

S. pneumoniae besitzen unterschiedliche Virulenzfaktoren, wie Pneumolysin oder Pneumokokken-Oberflächenproteine (Brooks & Mias, 2018). Ein weiterer Faktor ist eine Polysaccharidkapsel, die alle bisher genannten Serotypen besitzen (Melin, Trzciński, Meri, Käyhty, & Väkeväinen, 2010; Wen, Liu, Qu, & Zhang, 2016) und die das Bakterium vor einer Immunantwort der Wirtszelle schützt. Dabei unterscheiden sich die *S. pneumoniae*-Serotypen durch die Zusammensetzung ihrer Kapselpolysaccharide und dadurch auch in ihrer Fähigkeit der Immunabwehr zu widerstehen (Geno *et al.*, 2015). So zeigten Melin *et al.* zum Beispiel, dass *S. pneumoniae* 19F und TIGR4 wesentlich resistenter gegen das Komplementsystem, einen Teil der humoralen Immunantwort sowie die Opsonierung, die Markierung des Pathogens mit Faktoren des Komplementsystems für die spätere Phagozytose durch Immunzellen, waren als

S. pneumoniae 6B und 23F (Melin *et al.*, 2009; Melin, Trzciński, Antonio, *et al.*, 2010; Melin, Trzciński, Meri, *et al.*, 2010).

Um in Zukunft zu überprüfen, ob unterschiedliche *S. pneumoniae*-Serotypen einen Einfluss auf den Epithelwiderstand der hier verwendeten pBECs in ALI-Kultur haben, sollten die Zellen mit verschiedenen Serotypen infiziert werden. Da in der vorliegenden Arbeit die Zellen direkt nach der 8-stündigen Infektion mit *S. pneumoniae* fixiert wurden und eine TEER-Messung nur zu diesem Zeitpunkt erfolgte, wäre es zukünftig interessant, die mit Viren und Bakterien infizierten Zellen länger zu kultivieren und den Widerstand an unterschiedlichen Zeitpunkten zu ermitteln. So könnte abgebildet werden, wie sich der Widerstand langfristig im Verlauf einer solchen Infektion verhält.

Durch die Quantifizierung der zurückgelegten Strecke von *S. pneumoniae* in die Zellschicht der ALI-Kulturen wurde gezeigt, dass eine vorangegangene virale Infektion die Einwanderung von *S. pneumoniae* in die Zellschicht über die Zeit erleichterte. Dabei nahm diese Einwanderung über die Zeit zu und nach 72 h + 8 h wurde die höchste bakterielle Translokation beobachtet (siehe Abbildung 4.23). Es ist also davon auszugehen, dass sich die bakterielle Einwanderung in die Zellschicht proportional zur Zeit der viralen Infektion vergrößert.

In den vorherigen Versuchen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sich die Permeabilität der Barriere 24 h nach einer viralen Infektion erhöhte und anschließend wieder reduzierte (siehe Abbildung 4.18). Aus diesem Grund wurde erwartet, dass die Bakterien nach 24 h + 8 h die größte Strecke in die Zellschicht zurücklegen und nach 48 h + 8 h und 72 h + 8 h wieder weniger. Die erhöhte bakterielle Translokation am Zeitpunkt 24 h + 8 h konnte in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht beobachtet werden. Eine Erklärung dafür könnte die Größe von *S. pneumoniae* von 0,5 – 2 µm sein. Das genutzte FITC-Dextran zur Ermittlung der Permeabilität der Barriere der ALI-Kulturen war circa 1,1 nm groß und damit deutlich kleiner als *S. pneumoniae*. Es wäre also möglich, dass die Barriere nach 24 h zwar eine erhöhte Permeabilität aufwies, allerdings nicht für größere Pathogene durchlässig war. Der ebenfalls in dieser Arbeit gezeigte negative Einfluss einer HRV16-Infektion auf die Zilien, der über die Infektionsdauer hinweg größer wurde, könnte eine andere Begründung für diese Ergebnisse sein.

Die differenzierten pBECs wurden in der vorliegenden Arbeit auch mittels Elektronenmikroskopie analysiert. Erste Aufnahmen zeigten, dass eine HRV16-Infektion die Zilien beeinträchtigte und diese nach einer Infektion verkürzt und in ihrer Anzahl reduziert vorlagen (siehe Abbildung 4.15). Zwischen den noch vorhandenen Zilien an der apikalen Seite der HRV16-infizierten ALI-Kulturen waren zusätzlich große Lücken sichtbar. Auch Jakiela *et al.* machten diese Beobachtung, sie zeigten eine verminderte Zahl an Zilien-tragenden Zellen in

humanen bronchialen Atemwegsepithelzellen in ALI-Kultur nach HRV16-Infektion (Jakiela *et al.*, 2014). In Zukunft müssen noch weitere Elektronenmikroskopie-Analysen erfolgen, um zu überprüfen, ob die Zilien tatsächlich signifikant durch eine HRV16-Infektion verkürzt und in ihrer Anzahl reduziert sind. In der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikante HRV-induzierte Reduktion der mRNA-Expression der Markerproteine FOXJ1 und SNTN für die Ziliogenese gezeigt werden (siehe Abbildung 4.16), deren mRNA-Expression auch in anderen Studien durch eine HRV-Infektion reduziert wurde (Q. Chen *et al.*, 2020; Y. Wang *et al.*, 2020). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Neubildung der Zilien vermindert war. Die Beeinträchtigung der Zilienbildung und Schädigung vorhandener Zilien könnte eine gestörte mukoziliäre *Clearance* zur Folge haben, wodurch die mechanische Abwehr von Pathogenen reduziert sein könnte. Gagliardi *et al.* zeigten in differenzierten tracheobronchialen Epithelzellen der menschlichen Atemwege nach 24-stündiger HRV-C15-Infektion eine Beeinträchtigung der mukoziliären *Clearance* durch beeinträchtigte Zilienstruktur (Gagliardi *et al.*, 2022). Auch andere Studien zeigten eine reduzierte mukoziliäre *Clearance* durch eine HRV-Infektion in humanen Atemwegsepithelzellen in ALI-Kultur sowie durch eine 21-tägige Poly(I:C)-Stimulation in humanen nasalen Epithelzellen (Q. Chen *et al.*, 2020; Essaidi-Laziosi *et al.*, 2018). Eine verlangsamte Frequenz der Zilienbewegung (Essaidi-Laziosi *et al.*, 2018) sowie verkürzte Zilien konnten ebenfalls nachgewiesen werden (Q. Chen *et al.*, 2020). Auch in einer *in vivo* Studie führte die beeinträchtigte Zilienbewegung, ausgelöst durch die *Primary Ciliary Dyskinesia*-Erkrankung des Mausmodells, zu einer gestörten mukoziliären *Clearance* (McKenzie *et al.*, 2013). Die nasale mukoziliäre *Clearance* war, in mit HRV infizierten Freiwilligen, ebenfalls signifikant reduziert (Sasaki *et al.*, 1973).

Aber nicht nur HRV scheint einen Einfluss auf die Frequenz des Zilienschlags oder die mukoziliäre *Clearance* zu haben. Eine *S. pneumoniae*-Infektion in in Agar-eingebettetem Nasenmuschel-Gewebe verlangsamte die Zilienschlagfrequenz nach 24 h um 24 %. Laut den Autoren könnte zum Beispiel der Virulenzfaktor Pneumolysin, der in hohen Konzentrationen zytotoxisch wirkt, für diese Verlangsamung der Zilien verantwortlich sein (Feldman *et al.*, 1992).

Zieht man zusätzlich in Betracht, dass durch eine HRV-Infektion die Expression von PAF-Rezeptoren erhöht ist, wodurch die Adhäsion von *S. pneumoniae* an die Zellen gesteigert werden kann (Ishizuka *et al.*, 2003), könnte damit der Effekt der gesteigerten bakteriellen Translokation nach 72 h + 8 h erklärt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass die Permeabilität der epithelialen Barriere nach 24 h viraler Infektion am höchsten ist, die Schädigung der Zilien nach 24 h + 8 h aber geringer ausfällt als im Vergleich zu den späteren Zeitpunkten. Zu diesem Zeitpunkt könnte, wenn auch eventuell bereits verlangsamt, die mukoziliäre *Clearance* für eine Entfernung der Pathogene, beziehungsweise im *in vitro*-Modell für ein stetiges Bewegen der

Bakterien im Insert und somit für eine verringerte Einwanderung von *S. pneumoniae* in die Zellschicht sorgen. Mit zunehmender Schädigung der Zilien im Verlauf der Infektion könnte, durch die erleichterte Adhäsion, zusätzlich eine höhere Anzahl Bakterien an die Zellen binden, die die Zilien weiter negativ beeinflussen und für eine stärker verringerte mukoziliäre Clearance sowie für eine vermehrte bakterielle Einwanderung über die Zeit sorgen.

Eine IFN β 1a-Behandlung schützte die Zilien-tragenden Zellen vor dem Effekt einer HRV16-Infektion. So waren in IFN β 1a-behandelten, HRV16-infizierten Zellen weder eine Verkürzung der Zilien, noch eine geringere mRNA-Expression der Marker für die Ziliogenese nachweisbar. Es wurde auch deutlich, dass durch eine IFN β 1a-Vorbehandlung die Strecke der eingewanderten Bakterien mit vorheriger 72-stündiger viraler Infektion reduziert wurde (siehe Abbildung 4.15 und 4.16).

In einer Studie von LeMessurier *et al.* führte die IFN β Behandlung von 16HBE-Zellen *in vitro* ebenfalls zu einer signifikant geringeren Anzahl von *S. pneumoniae*, die die Epithelzellschicht passierten (LeMessurier, Häcker, Chi, Tuomanen, & Redecke, 2013). Die Autoren erklärten dieses Ergebnis mit zwei Mechanismen. Zum einen konnten sie nachweisen, dass sich durch eine IFN β -Behandlung der Widerstand und die Integrität der Lungenbarriere in einem Mausmodell, durch die erhöhte mRNA-Expression von E-Cadherin, ZO-1, Claudin-4, -5 und -18, verbesserte. Zum anderen wurde in A549-Zellen gezeigt, dass sich durch IFN β die PAF-Rezeptor-Expression reduzierte. Diese Reduktion korrelierte mit einer verringerten bakteriellen Aufnahme und Transmigration (LeMessurier *et al.*, 2013). Zusammengefasst sprechen diese Ergebnisse für einen protektiven Effekt von IFN β 1a, der zusätzlich zum Schutz der Barrierefunktion, die bakterielle Translokation verringert, was eventuell auch das Eindringen von *S. pneumoniae* in den Blutkreislauf verringern könnte.

Konträr dazu existieren aber auch Studien, die zeigen, dass während einer bakteriellen Infektion Typ I IFN nicht nur zu einer schützenden Immunantwort beitragen (Koppe *et al.*, 2012; Mancuso *et al.*, 2007), sondern diese auch beeinträchtigen können (Shahangian *et al.*, 2009). So wurde in einem Mausmodell mit einer *Mycobacterium tuberculosis*-Infektion und einer anschließenden *Lymphocytic Choriomeningitis Virus*-Ko-Infektion, durch das produzierte Typ I IFN der Einstrom von *M. tuberculosis*-spezifischen Th-1 Zellen behindert, wodurch sich die Immunpathogenese der Tuberkulose verschlimmerte (Kang *et al.*, 2022).

M. tuberculosis ist ein fakultativ intrazelluläres Bakterium. Die widersprüchlichen Einflüsse von IFN könnten also abhängig von der Art des zu untersuchenden Pathogens und des Modellsystems sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde nur die Translokation von *S. pneumoniae*, einem

extrazellulären Bakterium, analysiert. Dadurch kann nicht sichergestellt werden, dass eine Vorbehandlung mit IFN β 1a vor allen Bakterienarten schützt. Zukünftig sollten die Translokation von obligat oder fakultativ intrazellulären und anderen extrazellulären Bakterien in die Zellschicht der pBECs in ALI-Kultur überprüft werden. Zusätzlich könnten auch Messungen zur mukoziliären Clearance sowie der Zilienschlagfrequenz nach IFN β 1a-Behandlung und Ko-Infektion durchgeführt werden. Diese Experimente könnten zukünftig im hier verwendeten *in vitro*-Modell, den pBECs in ALI-Kultur, durchgeführt, auf Lungenorganoide und anschließend auf *in vivo*-Modelle ausgeweitet werden. So könnte nachvollzogen werden, ob eine IFN β 1a-Vorbehandlung ebenfalls im lebenden Organismus protektive Effekte während einer bakteriellen Infektion zeigt.

5.5. Einblick in den Mechanismus Rhinovirus-induzierter Änderungen der Atemwegsepithelfunktion

5.5.1. Auswirkungen von Immunstimulation auf die Funktion des Atemwegsepithels

Der Mechanismus hinter dem HRV16-induzierten Effekt auf die Barrierefunktion ist bis dato unbekannt. Um einen Einblick in eben diesen Mechanismus zu generieren, wurde durch die zweistündige Stimulation mit einem synthetischen dsRNA-Polymer Poly(I:C), das von TLR3 erkannt wird, eine Infektion ohne virale Replikation nachgeahmt. Dafür wurden die pBECs in ALI-Kultur in Vorversuchen mit unterschiedlichen Konzentrationen Poly(I:C) stimuliert. In einer Studie zeigte eine Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Poly(I:C) in A549-Zellen bereits einen Einfluss auf die Zellviabilität (Laura *et al.*, 2021). In den ALI-Kulturen dieser Arbeit war dies nicht der Fall, so dass für die folgenden Versuche die Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gewählt wurde.

Nach der Stimulation der pBECs in ALI-Kultur mit 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Poly(I:C) konnte durch eine Zytokin-Messung im basalen Medium eine aktivierte Immunantwort der pBECs in ALI-Kultur nachgewiesen werden. Nach einer Stimulation mit Poly(I:C) war die Konzentrationen von IL-8 an allen Zeitpunkten signifikant erhöht (siehe Abbildung 4.24). Dies konnte auch bei A549-Zellen und primären bronchialen Epithelzellen gezeigt werden, bei denen ebenfalls IL-8 nach einer Stimulation mit 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Poly(I:C) für bis zu 24 h erhöht war (Laura *et al.*, 2021). Allerdings wurde in der Studie von Laura *et al.* auch eine erhöhte Konzentration von IL-6 nach Poly(I:C)-Stimulation nachgewiesen (Laura *et al.*, 2021), was in der vorliegenden Arbeit nicht der Fall war (siehe Abbildung 7.4). Dieser Unterschied könnte an der fehlenden Differenzierung der Zellen,

die in der Studie von Laura *et al.* verwendet wurden, liegen oder an der kurzen Inkubationsdauer mit Poly(I:C) im hier gezeigten Versuchsaufbau.

Im Gegensatz zu den HRV16-infizierten Zellen, wurden in der vorliegenden Arbeit nach einer Poly(I:C)-Stimulation keinerlei Auswirkungen auf die Zellviabilität, die *Tight Junctions* oder auf die Barrierefunktion der Zellen gefunden (siehe Abbildung 4.25).

In immortalisierten humanen nasalen Epithelzellen, die mit Poly(I:C) stimuliert wurden, wurde ebenfalls ein unveränderter Widerstand beobachtet (Ohkuni *et al.*, 2011). Auch in differenzierten primären bronchialen Epithelzellen in ALI-Kultur wurde nach Stimulation mit Poly(I:C) keine Veränderung in der Permeabilität des Epithels mittels FITC-Dextran Assay sowie vollständige *Tight Junctions* gezeigt (Michi *et al.*, 2021).

Konträr dazu wurden in immortalisierten 16HBE14o- und in differenzierten primären Atemwegsepithelzellen nach Stimulation mit Poly(I:C) ein reduzierter Widerstand sowie gestörte *Adherence* und *Tight Junctions* festgestellt (Rezaee *et al.*, 2011). In polarisierten 16HBE14o-Zellen in Inserts wurde eine Reduktion im TEER und gestörte *Tight Junctions* nach Poly(I:C)-Stimulation nachgewiesen (Comstock *et al.*, 2011).

In allen erwähnten Studien wurden die Zellen für 6 h bis 24 h mit Poly(I:C) inkubiert (Comstock *et al.*, 2011; Michi *et al.*, 2021; Ohkuni *et al.*, 2011; Rezaee *et al.*, 2011). Im Gegensatz dazu wurde bei Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit das zugegebene Poly(I:C) nach 2 h wieder von den Zellen abgenommen, um möglichst nah an der durchgeführten HRV16-Infektion der vorliegenden Arbeit zu bleiben. Zwar wurde ein Effekt von Poly(I:C) auf die Zellen durch die Expression von IL-8 nachgewiesen, jedoch ist nicht ausgeschlossen, dass die Inkubationszeit zu gering war, um einen Effekt auf die Barrierefunktion zu bewirken. Zukünftig sollte überprüft werden, ob eine längere Poly(I:C)-Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen einen Effekt auf die Barrierefunktion und die Ausschüttung von Zytokinen der pBECs in ALI-Kultur zeigt.

Die hier gezeigte unveränderte mRNA-Expression der *Adherence* und *Tight Junction* Proteine durch Poly(I:C)-Stimulation bestätigte die Daten anderer Studien (Ohkuni *et al.*, 2011; Rezaee *et al.*, 2011).

Während ihrer Zeitverlaufs-Studie zeigten Michi *et al.* in differenzierten humanen bronchialen Epithelzellen mit einer HRV-C15-Infektion, dass noch vor der PRR-induzierten ISG-Ausschüttung eine Auswirkung auf die Permeabilität der Barriere nachweisbar war (Michi *et al.*, 2021). Sollte dies zukünftig auch hier nachweisbar sein, würde zusätzlich bestätigt werden, dass die molekulare Abwehr des Immunsystems, zum Beispiel die Expression von ISGs, nicht direkt in die Beeinträchtigung der Barriere involviert ist. Auch Sajjan *et al.* schließen eine Beteiligung der antiviralen Aktivität aus und machen die HRV-Replikation für den Effekt auf die Barriere

verantwortlich (Sajjan *et al.*, 2008).

Diese Daten und die in der vorliegenden Arbeit generierten Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Veränderungen der Barrierefunktion abhängig von der viralen Replikation des dsRNA Virus sind und nicht durch die Aktivierung von TLR3 und damit des Immunsystems bedingt werden.

Um sicherzugehen, dass die Aktivierung des Immunsystems nicht an der Beeinträchtigung der Barriere des Atemwegsepithels beteiligt ist, könnten *Knockout*-Zelllinien erstellt werden, in welchen einzelne Komponenten der Immunantwort, wie etwa PRRs, ausgeschaltet wurden. Sollten auch in diesen Zellen dieselben HRV16-induzierten Effekte beobachtet werden, wäre dies eine weitere Bestätigung für die virale Replikation als Grund für die Beeinträchtigung der Barrierefunktion.

Weiterhin wurde in anderen Studien gezeigt, dass während einer HRV-Infektion sowohl TLR3 als auch MDA-5 als Rezeptoren zur maximalen Induktion der IFN Typ I und Typ III-Antwort benötigt werden (Q. Wang *et al.*, 2009). Aufbauend darauf zeigten Comstock *et al.* durch einen siRNA TLR3 *Knockdown*, dass zur Reduktion des TEERs in polarisierten Atemwegsepithelzellen durch eine HRV-Infektion oder Poly(I:C)-Stimulation, zusätzlich zu TLR3, weitere PRRs benötigt werden (Comstock *et al.*, 2011). Aus diesem Grund wäre die Aktivierung anderer Rezeptoren als TLR3, welche ebenfalls die Antwort des Immunsystems stimulieren, von Interesse.

Es existieren verschiedene Varianten von Poly(I:C), die sich in ihrer Spezifität für PRRs unterscheiden. Poly(I:C) *Low Molecular Weight* (LMW) / LyoVec™ ist ein Komplex von Poly(I:C) LMW der durch LyoVec™ transfiziert wird. Dadurch kann der Komplex die zytosolischen PRRs RIG-I/MDA-5 aktivieren, während konventionelles Poly(I:C) durch TLR3 erkannt wird. Während der Vorversuche zu dieser Arbeit konnte durch eine Stimulation mit unterschiedlichen LyoVec-Konzentrationen keine Aktivität des pro-inflammatorischen Signalwegs mittels IL-8 ELISA in den hier verwendeten pBECs in ALI-Kultur nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde Poly(I:C) für die Experimente dieser Arbeit verwendet. Gulraiz *et al.* zeigten allerdings, dass undifferenzierte pBECs durch Inkubation mit Poly(I:C) LMW / LyoVec eine Aktivierung der Immunantwort aufwiesen (Gulraiz *et al.*, 2014). Eine Erklärung für diesen Unterschied könnte die fehlende Differenzierung der in der Studie genutzten Zellen sein (Gulraiz *et al.*, 2014). Auch ist es nicht auszuschließen, dass die kurze Inkubationszeit von 2 h oder die Vorerkrankung der Zellspender in dieser Arbeit eine verminderte Reaktion auf die Poly(I:C) LMW / LyoVec-Stimulation hervorriefen. In Zukunft könnten also zusätzlich noch längere Stimulationszeiten mit unterschiedlichen Poly(I:C) LMW / LyoVec-Konzentrationen in den ALI-Kulturen getestet werden. Dadurch könnte die Barrierefunktion ebenfalls nach einer Aktivierung des Immunsystems durch die Rezeptoren RIG-I und MDA-5 untersucht werden. Zusätzlich könnten

auch hier die Versuche mit differenzierten Zellen von Lungengesunden-Spendern durchgeführt werden, um einen Effekt durch die Vorerkrankung der Zellspender auszuschließen.

5.5.2. Oxidativer Stress in HRV-infizierten primären bronchialen Epithelzellen unter Einfluss von IFN β

Eine HRV-Infektion kann, Studien zufolge, die Generation von ROS stimulieren (Biagioli, Kaul, Singh, & Turner, 1999; Kaul, Biagioli, Singh, & Turner, 2000). Wie sich eine erhöhte ROS-Ausschüttung auf die epitheliale Barriere auswirkt ist jedoch nicht eindeutig geklärt. Zum einen ist publiziert, dass HRV-induziertes ROS die *Tight Junctions* sowie die Barrierefunktion von polarisierten 16HBE14o-Zellen in Inserts oder humanen nasalen Epithelzellen beeinträchtigt (Comstock *et al.*, 2011; K. A. Kim, Jung, Kang, Choi, & Kim, 2018). Zum anderen wurde in humanen bronchialen Epithelzellen in ALI-Kultur gezeigt, dass die epitheliale Barriere während einer HRV-C15-Infektion durch die Ausschüttung von ROS profitiert und geschützt wird. So zeigten die Autoren, dass die Barriere der ALI-Kulturen durch eine Oligomycin A-Behandlung vor den Effekten einer HRV-C15-Infektion geschützt vorlagen und die ROS-Ausschüttung durch diese Behandlung erhöht war (Michi *et al.*, 2021).

Aufgrund dieser widersprüchlichen Daten sollte in der vorliegenden Arbeit mittels CellROX™-Färbung von IFN β 1a-behandelten, HRV16-infizierten pBECs in ALI-Kultur der Gehalt an ROS quantifiziert werden. Aufgrund der inkonsistenten Ergebnisse der Färbung war eine Quantifizierung von ROS mit dieser Methode jedoch nicht möglich. Da aufgrund technischer Voraussetzungen des KLSMs nicht die Möglichkeit bestand, die Zellen eines Inserts im Gesamten aufzunehmen und so die Fluoreszenz eventuell besser quantifizieren zu können, konnte keine Quantifizierung der reaktiven Sauerstoffspezies anhand der aufgenommenen Z-Stapel erfolgen. Aus diesem Grund konnte in der vorliegenden Arbeit mittels CellROX™-Färbung keinerlei Aussage über eine positive oder negative Rolle von oxidativem Stress auf die Funktion der epithelialen Barriere getroffen werden. Es ist unklar, warum die Fluoreszenz ungleichmäßig in den TC-Inserts auftrat. Ein Grund könnte die Zugabe des Farbstoffs sein, der in das apikale PBS jedes Inserts einzeln pipettiert wurde. Dies verhinderte zwar eine erneute apikale Waschung der Zellen nach der TEER-Messung, könnte jedoch dazu beigetragen haben, dass sich der Farbstoff teilweise nicht im gesamten Insert ausbreitete. Auch eine Fixierung nach der Färbung der Zellen könnte die Methode limitieren. Zukünftig könnte die Analyse durch *Live-Cell* Mikroskopie oder Durchflusszytometrie erfolgen, wodurch das Fixieren wegfallen würde und gleichzeitig mehr Zeitpunkte analysiert werden könnten.

Mit einem besseren Verständnis der ROS-Produktion in den IFN β 1a-behandelten und HRV16-

infizierten pBECs in ALI-Kultur könnte zukünftig die Rolle des Zellmetabolismus in der Beeinträchtigung der epithelialen Barriere während einer HRV-Infektion untersucht werden. So könnten in Zukunft, zusammen mit IFN β 1a und HRV16, Antioxidantien zu den Zellen gegeben werden, welche oxidativen Stress inhibieren. Dadurch könnte überprüft werden, ob diese Inhibierung die Effekte einer IFN β 1a-Behandlung revidiert, beziehungsweise welche Rolle oxidativer Stress bei der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion durch IFN β 1a spielt.

Bisher zeigten allerdings nur Michi *et al.* eine protektive Rolle von ROS auf die Barrierefunktion der differenzierten Epithelzellen während einer HRV-Infektion (Michi *et al.*, 2021). Die Mehrheit der veröffentlichten Studien zeigte einen negativen Einfluss von ROS auf die epitheliale Barriere von Atemwegsepithelzellen nach der Infektion mit Viren, Bakterien oder der Gabe von exogenem H₂O₂ (Boardman, Aryal, Miller, & Waters, 2004; Comstock *et al.*, 2011; Kratzer *et al.*, 2012; J. Liu *et al.*, 2019). In diesen Studien wurden allerdings nur immortalisierte oder nicht differenzierte Epithelzellen verwendet, weswegen die Beurteilung der Rolle des Metabolismus für die Barrierefunktion in den hier verwendeten differenzierten Epithelzellen sehr interessant wäre.

Neben der Möglichkeit ROS durch CellROX™ zu messen, besteht auch die Möglichkeit den oxidativen Stress der Zellen mittels eines Glutathion- oder eines 2',7'-Dichlorfluorescein-Diacetat (DCF)-Assays zu quantifizieren. Erste Versuche mit diesen Assays zeigten jedoch ebenfalls technische Schwierigkeiten. So war zum Beispiel die Konzentration von messbarem Glutathion eines TC-Inserts für die Messung mittels Glutathion-Assay zu gering und die Zellen zeigten nur ein sehr geringes, kaum messbares DCF-Signal im Durchflusszytometer. In Zukunft sollte die Quantifizierung von oxidativem Stress durch die Beseitigungen der technischen Limitationen der CellROX™-Färbung und die Etablierung des Glutathion- und des DCF-Assays ermöglicht werden.

Interessanterweise wurde ein erhöhtes basales ROS-Level in einer CF Epithelzelllinie festgestellt, was mit einer verringerten IFN-Produktion nach einer viral-bakteriellen-Infektion korrelierte (Chattoraj *et al.*, 2011). Im Anschluss an die ROS-Messungen der differenzierten pBECs aus CF-Lungen könnte zukünftig ein Vergleich der ROS-Werte von pBECs in ALI-Kultur aus lungengesunden Spendern erfolgen, um zu prüfen, ob ROS in differenzierten Epithelzellen mit und ohne Vorerkrankung einen Einfluss auf die antivirale Antwort besitzt und ob eine IFN-Behandlung diesen Effekt revidieren kann.

Obwohl die Quantifizierung von ROS in differenzierten pBECs in der vorliegenden Arbeit nicht erfolgen konnte, konnte durch das Modell einer 24-stündigen IFN β 1a-Behandlung und der HRV16-Infektion der ALI-Kulturen für 2 h - 12 h interessante Ergebnisse generiert werden. So

konnte bereits zu frühen Zeitpunkten nach der viralen Infektion der Schutz einer IFN β 1a-Behandlung auf die Barrierefunktion der pBECs in ALI-Kultur während einer Infektion mit HRV16 gezeigt werden. Am 8 h-Zeitpunkt war eine signifikante Reduktion des transepithelialen Widerstands durch eine HRV16-Infektion sichtbar, die nicht in den IFN β 1a-behandelten, HRV16-infizierten Zellen oder in den unbehandelten Kontrollzellen gemessen werden konnte.

Dieser früh einsetzende Effekt von HRV auf die Barrierefunktion wurde ebenfalls in der Studie von Michi *et al.* nachgewiesen. Dort wurde nach einer 6 - 8-stündigen Infektion mit HRV-C15 mittels FITC-Dextran-Assay ein signifikanter Effekt auf die Permeabilität von humanen bronchialen Epithelzellen in ALI-Kultur gezeigt. Der TEER-Wert der dort verwendeten Zellen war allerdings zu diesem Zeitpunkt noch unverändert (Michi *et al.*, 2021).

Durch die limitierte Anzahl der ALI-Kulturen konnte hier parallel zur Färbung mit CellROX™ keine Permeabilitäts-Messung mittels FITC-Dextran Assay durchgeführt werden. Zukünftig sollten, zum Bestätigen der TEER-Ergebnisse, ebenfalls FITC-Dextran Assays durchgeführt werden, um die Permeabilität der Barriere zu überprüfen.

5.6. Fazit und Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine Vorbehandlung mit IFN β 1a in der Lage ist, die Zellen und die Barrierefunktion der epithelialen Barriere während einer HRV16-Infektion zu schützen. Bereits bekannt ist, dass eine HRV-Infektion einen Einfluss auf die Barriere der Atemwegsepithelzellen hat. Dies wurde auch in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen. So konnte ein Verlust der Barrierefunktion der pBECs in ALI-Kultur ohne IFN-Vorbehandlung nach 24 h viraler Infektion festgestellt werden. Zwar regenerierte sich die Barrierefunktion über die Zeit, jedoch wurde mit andauernder Infektion eine Beeinträchtigung der Zilien beobachtet. Diese lagen nach andauernder viraler Infektion an den Zeitpunkten 48 h und 72 h verkürzt vor, beziehungsweise fehlten ganz. Bisher war nicht bekannt, welchen Effekt eine Behandlung mit IFN β 1a auf die Barrierefunktion von differenzierten Epithelzellen während einer HRV-Infektion zeigte. Dies wurde erstmalig durch diese Arbeit nachgewiesen. Durch eine IFN β 1a-Vorbehandlung wurde zum einen die Viruslast der HRV16-infizierten pBECs reduziert, gleichzeitig konnte der HRV-induzierte Effekt auf die Zellviabilität der Zellen signifikant verringert werden. Des Weiteren wirkte IFN β 1a protektiv auf die ZO-1-immunreaktiven *Tight Junctions*, die Barrierefunktion und die Zilien-tragenden Zellen der ALI-Kulturen (siehe Abbildung 5.1 für eine graphische Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Arbeit). Zusätzlich konnte in der

vorliegenden Arbeit beobachtet werden, dass die Vorbehandlung mit IFN β 1a die Translokation von *S. pneumoniae* in die Zellschicht während einer viral-bakteriellen Ko-Infektion reduzierte. So legten die Bakterien in der Zellschicht der IFN β 1a-behandelten, ko-infizierten Zellen nach 72 h + 8 h eine signifikant geringere Strecke zurück. Der Mechanismus hinter dem HRV16-induzierten Effekt auf die Barrierefunktion des Atemwegsepithels ist bis dato unbekannt. Die Ergebnisse, welche in dieser Arbeit mittels Poly(I:C)-Stimulation der pBECs in ALI-Kultur gewonnen wurden, deuten darauf hin, dass nicht das Immunsystem einen Einfluss auf die Barriere nimmt, sondern die Beeinträchtigung der Barriere durch virale Replikation selbst verursacht wird.

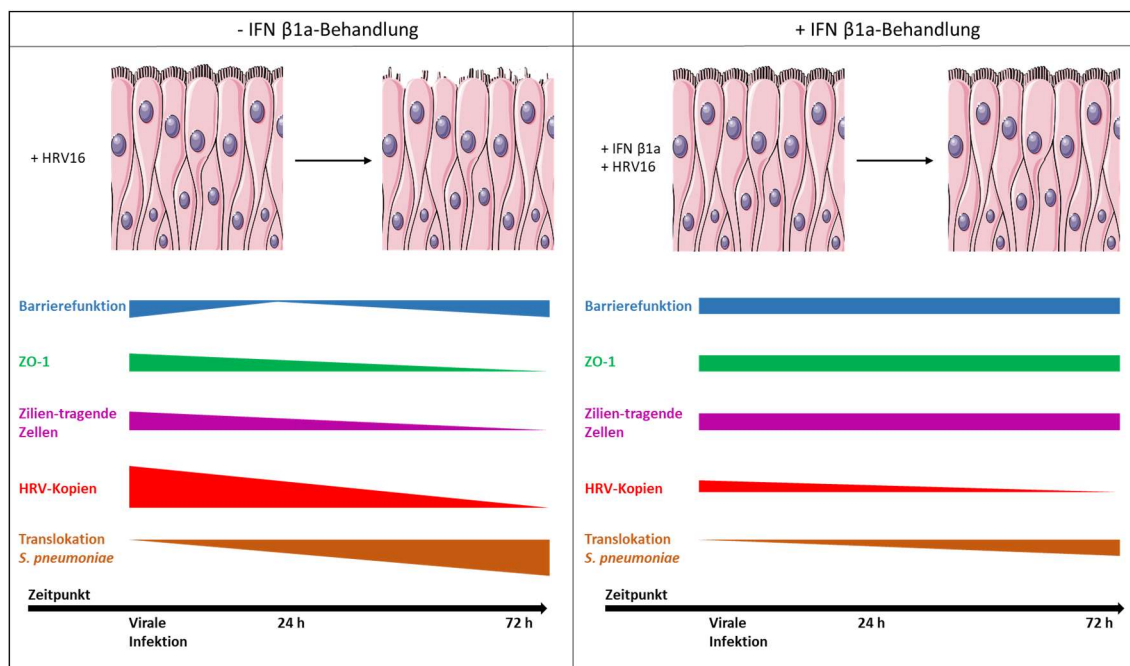


Abbildung 5.1: Graphische Zusammenfassung des Effekts einer IFN β 1a-Vorbehandlung von pBECs in ALI-Kultur während einer HRV16-Infektion

Durch eine HRV16-Infektion nimmt nach 24 h die Barrierefunktion der pBECs in ALI-Kultur ab. Die Permeabilität der Barriere erhöht sich und regeneriert sich nach 48 h und 72 h wieder. Über die Zeit beeinträchtigt eine HRV16-Infektion die Zilien-tragenden Zellen und steigert die Translokation von *S. pneumoniae*. Eine Vorbehandlung mit IFN β 1a schützt die differenzierten Zellen vor diesen Effekten und reduziert die Translokation von *S. pneumoniae*. Über die Zeit nimmt auch die Anzahl der viralen Kopien innerhalb der infizierten Zellen ab. Durch eine Behandlung mit IFN β 1a werden direkt nach der Infektion weniger virale Kopien repliziert.

Schaubild teilweise erstellt mit Smart Servier Medical Art, bereitgestellt von Servier, lizenziert unter einer *Creative Commons Attribution 3.0 Unported License* (smart.Servier.com).

Die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion während einer viralen Infektion ist von großer Bedeutung um eine sekundäre bakterielle Ko-Infektion zu reduzieren oder gar gänzlich zu vermeiden. Eine IFN- β -Behandlungsoption wäre allerdings nicht nur für Personen mit chronischen Atemwegserkrankungen hilfreich. Durch das breit gefächerte, nicht Virus-spezifische Wirkungsspektrum von IFN β könnte eine solche Behandlung ebenfalls zum Eindämmen einer Endemie oder Pandemie, ausgelöst durch einen viralen Erreger, beitragen. Auch ist es möglich, dass eine IFN β -Behandlung vor neuen respiratorischen Erregern schützt. So könnte IFN β auch in Lungengesunden für die Therapie oder den Schutz vor einer Infektion mit unterschiedlichen Atemwegsviren sorgen.

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse könnten dementsprechend hilfreich sein, um eine IFN β -Behandlungsmöglichkeit zum Schutz vor viralen Infektionen oder für die direkte antivirale Behandlung zu entwickeln. Um zukünftig eine solche Behandlung entwickeln zu können, sollten die Experimente dieser Arbeit mit pBECs von Lungengesunden und Spendern mit chronischen Lungenerkrankungen, wie Asthma oder COPD, verglichen werden. So könnten, durch den Vergleich der Ergebnisse dieser Experimente, etwaige Unterschiede zwischen den Zellen aus Spendern mit und ohne Vorerkrankungen aufgezeigt werden. Anschließend könnten Langzeitstudien erfolgen, bei welchen mehrfache IFN β 1a-Stimulationen der pBECs in ALI-Kultur durchgeführt werden. Diese Stimulationen könnten dabei mit vernebeltem IFN erfolgen. Sollte die gewählte Konzentration an IFN weiterhin gut verträglich sein, also keine Zytotoxizität aufweisen und innerhalb der Langzeitstudien antiviral wirken sowie die Barriere der Zellen schützen, sollte die Wirksamkeit und die Verteilung des IFNs in der Lunge getestet werden. Um nach dem 3R-Prinzip (*Replace, Reduce, Refine*) Tierversuche zu reduzieren, könnten *ex vivo*-Modelle angewendet werden. So könnten erste Versuche zur Untersuchung der Wirksamkeit, Aufnahme und Verteilung in humanen Präzisionslungenschnitten (Viana, O'Kane, & Schroeder, 2022) und isolierten perfundierten Rattenlungen (Eriksson, Sjögren, Lennernäs, & Thörn, 2020) oder auch in Lungenorganoiden erfolgen. Mit dem erfolgreichen Abschluss dieser Experimente könnte die Behandlung mit IFN β 1a dann *in vivo* in Tiermodellen, wie zum Beispiel in humanisierten Mäusen, getestet werden, um zu überprüfen welchen Effekt eine IFN β 1a-Behandlung auf einen lebenden Organismus und dessen Immunsystem hat. Wurden auch diese Experimente mit einer guten Wirksamkeit und Verträglichkeit der Behandlung beendet, könnte eine klinische Phase I Studie begonnen werden, in welcher die Wirksamkeit und Verträglichkeit einer IFN β 1a-Behandlung im Menschen getestet wird.

Es existieren bereits unterschiedliche Ansätze von IFN β -Therapien zur Bekämpfung respiratorischer viraler Infektionen, die allerdings bis dato nicht zur Anwendung zugelassen wurden. So gibt es zum Beispiel die Option der intranasalen Gabe von IFN α zum Schutz vor

respiratorisch viralen Infektionen. Diesen Ansatz griffen mehrere Studien auf, die jedoch scheiterten, da IFN α nicht zuverlässig die Infektion von unterschiedlichen Viren verhinderte und eine stark dosisabhängige Wirkung gezeigt wurde. Zusätzlich kam es durch die intranasale Gabe zu Nebenwirkungen, wie blutig-tingiertem Mukus (Monto, Albrecht, & Schwartz, 1988; Monto, Shope, Schwartz, & Albrecht, 1986). Weiterhin wurde ebenfalls versucht die durch respiratorische Viren ausgelösten Symptome in Asthmatikern mittels inhalativer Verabreichung von IFN β zu lindern. Die respiratorischen Infektionen der Patienten waren allerdings nicht stark genug, um die Asthmasymptome klinisch signifikant zu verschlechtern und eine Veränderung im *Six-item Juniper Asthma Control Questionnaire* zu bewirken. Obwohl eine IFN β -Behandlung die Konditionen der Patienten teilweise verbesserte, konnte der primäre Endpunkt, ein positiver Effekt auf die *Six-item Juniper Asthma Control Questionnaire*, nicht erreicht werden (Djukanović *et al.*, 2014).

Der inhalative IFN β 1a-Therapieansatz SNG001 zur Behandlung hospitalisierter COVID-19-Patienten zeigte in Phase 2 der klinischen Studie vielversprechende Ergebnisse (Monk *et al.*, 2021). Die primären Ziele der Studie, wie eine frühere Entlassung der Patienten aus dem Krankenhaus oder eine verringerte Einschränkung in der Aktivität, konnten allerdings in Phase 3 nicht erreicht werden. Trotzdem konnte ein Trend zur Reduktion schwerer COVID-19-Verläufe nach erfolgter IFN β 1a-Gabe beobachtet werden (Synairgen plc, 21. Februar 2022).

Da die IFN Typ I-Therapieansätze, wie das inhalative IFN β 1a, allgemein von Patienten gut vertragen wurden (Djukanović *et al.*, 2014; Monk *et al.*, 2021), könnten Optimierungen, wie zum Beispiel Konjugationen von IFNs mit Polyethylenglycol, vielversprechend sein. So zeigten die neusten Ergebnisse einer Phase 3 Studie, dass eine subkutane Injektion mit pegyliertem IFN λ in SARS-CoV-2-Patienten zu einer geringeren Viruslast und weniger Krankenhausaufenthalt als bei der Placebo-Gruppe führte (Reis *et al.*, 2023). Auch ein möglich synergistischer Effekt der IFNe Typ I und Typ III könnte für einen verbesserten Behandlungserfolg und damit zur Weiterentwicklung der Behandlungsoptionen genutzt werden. Ebenfalls könnte das Verpacken der IFNe in Partikel und deren anschließende Inhalation eine Optimierung darstellen. So könnte IFN mittels Depotwirkung langsam und stetig an das Lungengewebe abgegeben werden, um einen langfristigen protektiven Effekt auf das Atemwegsepithel zu erreichen und den Effekt viraler und viral-bakterieller Ko-Infektionen zu reduzieren oder sie gar zu verhindern.

6. Literaturverzeichnis

- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), 783-801.
- Alspach, E., Lussier, D. M., & Schreiber, R. D. (2019). Interferon γ and Its Important Roles in Promoting and Inhibiting Spontaneous and Therapeutic Cancer Immunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 11(3).
- Andl, C. D., & Rustgi, A. K. (2005). No one-way street: cross-talk between e-cadherin and receptor tyrosine kinase (RTK) signaling: a mechanism to regulate RTK activity. *Cancer Biol Ther*, 4(1), 28-31.
- Ardain, A., Marakalala, M. J., & Leslie, A. (2020). Tissue-resident innate immunity in the lung. *Immunology*, 159(3), 245-256.
- Bakker, J. M., Broug-Holub, E., Kroes, H., van Rees, E. P., Kraal, G., & van Iwaarden, J. F. (1998). Functional immaturity of rat alveolar macrophages during postnatal development. *Immunology*, 94(3), 304-309.
- Bals, R., & Hiemstra, P. S. (2004). Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J*, 23(2), 327-333.
- Bauer, H., Zweimueller-Mayer, J., Steinbacher, P., Lametschwandtner, A., & Bauer, H. C. (2010). The dual role of zonula occludens (ZO) proteins. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 402593.
- Baum, B., & Georgiou, M. (2011). Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. *J Cell Biol*, 192(6), 907-917.
- Beilharz, M. W., Cummins, J. M., & Bennett, A. L. (2007). Protection from lethal influenza virus challenge by oral type 1 interferon. *Biochem Biophys Res Commun*, 355(3), 740-744.
- Biagioli, M. C., Kaul, P., Singh, I., & Turner, R. B. (1999). The role of oxidative stress in rhinovirus induced elaboration of IL-8 by respiratory epithelial cells. *Free Radic Biol Med*, 26(3-4), 454-462.
- Boardman, K. C., Aryal, A. M., Miller, W. M., & Waters, C. M. (2004). Actin re-distribution in response to hydrogen peroxide in airway epithelial cells. *J Cell Physiol*, 199(1), 57-66.
- Bochkov, Y. A., & Gern, J. E. (2016). Rhinoviruses and Their Receptors: Implications for Allergic Disease. *Curr Allergy Asthma Rep*, 16(4), 30.
- Bochkov, Y. A., Watters, K., Ashraf, S., Griggs, T. F., Devries, M. K., Jackson, D. J., et al. (2015). Cadherin-related family member 3, a childhood asthma susceptibility gene product, mediates rhinovirus C binding and replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(17), 5485-5490.
- Boers, J. E., Ambergen, A. W., & Thunnissen, F. B. (1998). Number and proliferation of basal and parabasal cells in normal human airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med*, 157(6 Pt 1), 2000-2006.
- Bolen, C. R., Ding, S., Robek, M. D., & Kleinstein, S. H. (2014). Dynamic expression profiling of type I and type III interferon-stimulated hepatocytes reveals a stable hierarchy of gene expression. *Hepatology*, 59(4), 1262-1272.
- Bolívar, S., Anfossi, R., Humeres, C., Vivar, R., Boza, P., Muñoz, C., et al. (2018). IFN- β Plays Both Pro- and Anti-inflammatory Roles in the Rat Cardiac Fibroblast Through Differential STAT Protein Activation. *Front Pharmacol*, 9, 1368.
- Bonser, L. R., Koh, K. D., Johansson, K., Choksi, S. P., Cheng, D., Liu, L., et al. (2021). Flow-Cytometric Analysis and Purification of Airway Epithelial-Cell Subsets. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 64(3), 308-317.
- Brincks, E. L., Katewa, A., Kucaba, T. A., Griffith, T. S., & Legge, K. L. (2008). CD8 T cells utilize TRAIL to control influenza virus infection. *J Immunol*, 181(7), 4918-4925.
- Brooks, L. R. K., & Mias, G. I. (2018). Virulence and Host Immunity: Aging, Diagnostics, and Prevention. *Front Immunol*, 9, 1366.

- Bustamante-Marin, X. M., & Ostrowski, L. E. (2017). Cilia and Mucociliary Clearance. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 9(4).
- Button, B., Cai, L. H., Ehre, C., Kesimer, M., Hill, D. B., Sheehan, J. K., et al. (2012). A periciliary brush promotes the lung health by separating the mucus layer from airway epithelia. *Science*, 337(6097), 937-941.
- Cai, C., Tang, Y. D., Xu, G., & Zheng, C. (2021). The crosstalk between viral RNA- and DNA-sensing mechanisms. *Cell Mol Life Sci*, 78(23), 7427-7434.
- Cakebread, J. A., Xu, Y., Grainge, C., Kehagia, V., Howarth, P. H., Holgate, S. T., et al. (2011). Exogenous IFN- β has antiviral and anti-inflammatory properties in primary bronchial epithelial cells from asthmatic subjects exposed to rhinovirus. *J Allergy Clin Immunol*, 127(5), 1148-1154.e1149.
- Cao, X., Surma, M. A., & Simons, K. (2012). Polarized sorting and trafficking in epithelial cells. *Cell Res*, 22(5), 793-805.
- Carotenuto, P., van Riel, D., Artsen, A., Bruijns, S., Uytdehaag, F. G., Laman, J. D., et al. (2005). Antiviral treatment with alpha interferon up-regulates CD14 on liver macrophages and its soluble form in patients with chronic hepatitis B. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(2), 590-599.
- Castelli, J., Wood, K. A., & Youle, R. J. (1998). The 2-5A system in viral infection and apoptosis. *Biomed Pharmacother*, 52(9), 386-390.
- Chattoraj, S. S., Ganesan, S., Faris, A., Comstock, A., Lee, W. M., & Sajjan, U. S. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* suppresses interferon response to rhinovirus infection in cystic fibrosis but not in normal bronchial epithelial cells. *Infect Immun*, 79(10), 4131-4145.
- Chen, Q., Tan, K. S., Liu, J., Ong, H. H., Zhou, S., Huang, H., et al. (2020). Host Antiviral Response Suppresses Ciliogenesis and Motile Ciliary Functions in the Nasal Epithelium. *Front Cell Dev Biol*, 8, 581340.
- Chen, Y., Hamati, E., Lee, P. K., Lee, W. M., Wachi, S., Schnurr, D., et al. (2006). Rhinovirus induces airway epithelial gene expression through double-stranded RNA and IFN-dependent pathways. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 34(2), 192-203.
- Comstock, A. T., Ganesan, S., Chattoraj, A., Faris, A. N., Margolis, B. L., Hershenson, M. B., et al. (2011). Rhinovirus-induced barrier dysfunction in polarized airway epithelial cells is mediated by NADPH oxidase 1. *J Virol*, 85(13), 6795-6808.
- Condon, T. V., Sawyer, R. T., Fenton, M. J., & Riches, D. W. (2011). Lung dendritic cells at the innate-adaptive immune interface. *J Leukoc Biol*, 90(5), 883-895.
- Contoli, M., Message, S. D., Laza-Stanca, V., Edwards, M. R., Wark, P. A., Bartlett, N. W., et al. (2006). Role of deficient type III interferon-lambda production in asthma exacerbations. *Nat Med*, 12(9), 1023-1026.
- Cooney, R. N. (2002). Suppressors of cytokine signaling (SOCS): inhibitors of the JAK/STAT pathway. *Shock*, 17(2), 83-90.
- Cording, J., Berg, J., Käding, N., Bellmann, C., Tscheik, C., Westphal, J. K., et al. (2013). In tight junctions, claudins regulate the interactions between occludin, tricellulin and marvelD3, which, inversely, modulate claudin oligomerization. *J Cell Sci*, 126(Pt 2), 554-564.
- Corne, J. M., Marshall, C., Smith, S., Schreiber, J., Sanderson, G., Holgate, S. T., et al. (2002). Frequency, severity, and duration of rhinovirus infections in asthmatic and non-asthmatic individuals: a longitudinal cohort study. *Lancet*, 359(9309), 831-834.
- Coyne, C. B., Gambling, T. M., Boucher, R. C., Carson, J. L., & Johnson, L. G. (2003). Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 285(5), L1166-1178.
- Crapo, J. D. (2003). Redox active agents in inflammatory lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*, 168(9), 1027-1028.

- Cuneo, A. A., & Autieri, M. V. (2009). Expression and function of anti-inflammatory interleukins: the other side of the vascular response to injury. *Curr Vasc Pharmacol*, 7(3), 267-276.
- Danthi, P. (2016). Viruses and the Diversity of Cell Death. *Annu Rev Virol*, 3(1), 533-553.
- Das, S., & Thakur, B. K. (2015). Mucosal immune system of the respiratory tract: regulation of tolerance and immune response. *The Pulmo-Face XV*, 2.
- Demissie, B. W., Amele, E. A., Yitayew, Y. A., & Yalew, Z. M. (2021). Acute lower respiratory tract infections and associated factors among under-five children visiting Wolaita Sodo University Teaching and Referral Hospital, Wolaita Sodo, Ethiopia. *BMC Pediatr*, 21(1), 413.
- Derynck, R., & Budi, E. H. (2019). Specificity, versatility, and control of TGF- β family signaling. *Sci Signal*, 12(570).
- Djukanović, R., Harrison, T., Johnston, S. L., Gabbay, F., Wark, P., Thomson, N. C., et al. (2014). The effect of inhaled IFN- β on worsening of asthma symptoms caused by viral infections. A randomized trial. *Am J Respir Crit Care Med*, 190(2), 145-154.
- Donaldson, G. C., & Wedzicha, J. A. (2006). COPD exacerbations .1: Epidemiology. *Thorax*, 61(2), 164-168.
- Doyle, T., Moncorgé, O., Bonaventure, B., Pollpeter, D., Lussignol, M., Tauziet, M., et al. (2018). The interferon-inducible isoform of NCOA7 inhibits endosome-mediated viral entry. *Nat Microbiol*, 3(12), 1369-1376.
- Elliott, A. D. (2020). Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. *Curr Protoc Cytom*, 92(1), e68.
- Endres, A. (2020). *Pseudomonas aeruginosa moduliert die inflammatorische Antwort des Atemwegsepithels auf Rhinovirus-Infektionen*. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main.
- Eriksson, J., Sjögren, E., Lennernäs, H., & Thörn, H. (2020). Drug Absorption Parameters Obtained Using the Isolated Perfused Rat Lung Model Are Predictive of Rat In Vivo Lung Absorption. *AAPS J*, 22(3), 71.
- Essaidi-Laziosi, M., Brito, F., Benaoudia, S., Royston, L., Cagno, V., Fernandes-Rocha, M., et al. (2018). Propagation of respiratory viruses in human airway epithelia reveals persistent virus-specific signatures. *J Allergy Clin Immunol*, 141(6), 2074-2084.
- Essaidi-Laziosi, M., Geiser, J., Huang, S., Constant, S., Kaiser, L., & Tapparel, C. (2020). Interferon-Dependent and Respiratory Virus-Specific Interference in Dual Infections of Airway Epithelia. *Sci Rep*, 10(1), 10246.
- Fanning, A. S., Jameson, B. J., Jesaitis, L. A., & Anderson, J. M. (1998). The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*, 273(45), 29745-29753.
- Fanning, A. S., Little, B. P., Rahner, C., Utepbergenov, D., Walther, Z., & Anderson, J. M. (2007). The unique-5 and -6 motifs of ZO-1 regulate tight junction strand localization and scaffolding properties. *Mol Biol Cell*, 18(3), 721-731.
- Faris, A. N., Ganesan, S., Chatteraj, A., Chatteraj, S. S., Comstock, A. T., Unger, B. L., et al. (2016). Rhinovirus Delays Cell Repolarization in a Model of Injured/Regenerating Human Airway Epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 55(4), 487-499.
- Feghali, C. A., & Wright, T. M. (1997). Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci*, 2, d12-26.
- Feldman, C., Read, R., Rutman, A., Jeffery, P. K., Brain, A., Lund, V., et al. (1992). The interaction of Streptococcus pneumoniae with intact human respiratory mucosa in vitro. *Eur Respir J*, 5(5), 576-583.
- Fitzgerald, K. A., McWhirter, S. M., Faia, K. L., Rowe, D. C., Latz, E., Golenbock, D. T., et al. (2003). IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol*, 4(5), 491-496.

- Gaajetaan, G. R., Geelen, T. H., Vernooy, J. H., Dentener, M. A., Reynaert, N. L., Rohde, G. G., et al. (2013). Interferon- β induces a long-lasting antiviral state in human respiratory epithelial cells. *J Infect*, *66*(2), 163-169.
- Gagliardi, T. B., Goldstein, M. E., Song, D., Gray, K. M., Jung, J. W., Ignacio, M. A., et al. (2022). Rhinovirus C replication is associated with the endoplasmic reticulum and triggers cytopathic effects in an in vitro model of human airway epithelium. *PLoS Pathog*, *18*(1), e1010159.
- Galeas-Pena, M., McLaughlin, N., & Pociask, D. (2019). The role of the innate immune system on pulmonary infections. *Biol Chem*, *400*(4), 443-456.
- Ganjan, H., Rajput, C., Elzoheiry, M., & Sajjan, U. (2020). Rhinovirus and Innate Immune Function of Airway Epithelium. *Front Cell Infect Microbiol*, *10*, 277.
- GBD 2015 Chronic Respiratory Disease Collaborators. (2017). Global, regional, and national deaths, prevalence, disability-adjusted life years, and years lived with disability for chronic obstructive pulmonary disease and asthma, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Respir Med*, *5*(9), 691-706.
- GBD Chronic Respiratory Disease Collaborators. (2020). Prevalence and attributable health burden of chronic respiratory diseases, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Respir Med*, *8*(6), 585-596.
- Geno, K. A., Gilbert, G. L., Song, J. Y., Skovsted, I. C., Klugman, K. P., Jones, C., et al. (2015). Pneumococcal Capsules and Their Types: Past, Present, and Future. *Clin Microbiol Rev*, *28*(3), 871-899.
- Georas, S. N., & Rezaee, F. (2014). Epithelial barrier function: at the front line of asthma immunology and allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, *134*(3), 509-520.
- Gibbert, K., Schlaak, J. F., Yang, D., & Dittmer, U. (2013). IFN- α subtypes: distinct biological activities in anti-viral therapy. *Br J Pharmacol*, *168*(5), 1048-1058.
- González-Mariscal, L., Betanzos, A., & Avila-Flores, A. (2000). MAGUK proteins: structure and role in the tight junction. *Semin Cell Dev Biol*, *11*(4), 315-324.
- González-Mariscal, L., Quirós, M., & Díaz-Coránguez, M. (2011). ZO proteins and redox-dependent processes. *Antioxid Redox Signal*, *15*(5), 1235-1253.
- Grainger, C. I., Greenwell, L. L., Lockley, D. J., Martin, G. P., & Forbes, B. (2006). Culture of Calu-3 cells at the air interface provides a representative model of the airway epithelial barrier. *Pharm Res*, *23*(7), 1482-1490.
- Griggs, T. F., Bochkov, Y. A., Basnet, S., Pasic, T. R., Brockman-Schneider, R. A., Palmenberg, A. C., et al. (2017). Rhinovirus C targets ciliated airway epithelial cells. *Respir Res*, *18*(1), 84.
- Guerrero-Plata, A., Baron, S., Poast, J. S., Adegboyega, P. A., Casola, A., & Garofalo, R. P. (2005). Activity and regulation of alpha interferon in respiratory syncytial virus and human metapneumovirus experimental infections. *J Virol*, *79*(16), 10190-10199.
- Gulraiz, F., Bellinghausen, C., Dentener, M. A., Reynaert, N. L., Gaajetaan, G. R., Beuken, E. V., et al. (2014). Efficacy of IFN- λ 1 to protect human airway epithelial cells against human rhinovirus 1B infection. *PLoS One*, *9*(4), e95134.
- Gusareva, E. S., Acerbi, E., Lau, K. J. X., Luhung, I., Premkrishnan, B. N. V., Kolundžija, S., et al. (2019). Microbial communities in the tropical air ecosystem follow a precise diel cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *116*(46), 23299-23308.
- Guttman, J. A., & Finlay, B. B. (2009). Tight junctions as targets of infectious agents. *Biochim Biophys Acta*, *1788*(4), 832-841.
- Günzel, D., & Yu, A. S. (2013). Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev*, *93*(2), 525-569.
- Hanada, S., Pirzadeh, M., Carver, K. Y., & Deng, J. C. (2018). Respiratory Viral Infection-Induced Microbiome Alterations and Secondary Bacterial Pneumonia. *Front Immunol*, *9*, 2640.

- Hao, W., Bernard, K., Patel, N., Ulbrandt, N., Feng, H., Svabek, C., et al. (2012). Infection and propagation of human rhinovirus C in human airway epithelial cells. *J Virol*, *86*(24), 13524-13532.
- Hardaker, E. L., Bacon, A. M., Carlson, K., Roshak, A. K., Foley, J. J., Schmidt, D. B., et al. (2004). Regulation of TNF-alpha- and IFN-gamma-induced CXCL10 expression: participation of the airway smooth muscle in the pulmonary inflammatory response in chronic obstructive pulmonary disease. *FASEB J*, *18*(1), 191-193.
- Hartsock, A., & Nelson, W. J. (2008). Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta*, *1778*(3), 660-669.
- Hauptmeier, B. M., Borg, I., Rohde, G., Anders, A., Kronsbein, J., Gattermann, S., et al. (2010). Viral colonization in intubated patients: initial pathogen pattern and follow-up. *Clin Respir J*, *4*(3), 139-146.
- Henriques-Normark, B., & Tuomanen, E. I. (2013). The pneumococcus: epidemiology, microbiology, and pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*, *3*(7).
- Hewitt, R., Farne, H., Ritchie, A., Luke, E., Johnston, S. L., & Mallia, P. (2016). The role of viral infections in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Thorax*, *71*(2), 158-174.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., & Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*, *11*(9), 1026-1030.
- Hillyer, P., Shepard, R., Uehling, M., Krenz, M., Sheikh, F., Thayer, K. R., et al. (2018). Differential Responses by Human Respiratory Epithelial Cell Lines to Respiratory Syncytial Virus Reflect Distinct Patterns of Infection Control. *J Virol*, *92*(15).
- Hinz, M., & Scheidereit, C. (2014). The I κ B kinase complex in NF- κ B regulation and beyond. *EMBO Rep*, *15*(1), 46-61.
- Hippenstiel, S., Opitz, B., Schmeck, B., & Suttrop, N. (2006). Lung epithelium as a sentinel and effector system in pneumonia--molecular mechanisms of pathogen recognition and signal transduction. *Respir Res*, *7*, 97.
- Honda, K., Takaoka, A., & Taniguchi, T. (2006). Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity*, *25*(3), 349-360.
- Howarth, A. G., Hughes, M. R., & Stevenson, B. R. (1992). Detection of the tight junction-associated protein ZO-1 in astrocytes and other nonepithelial cell types. *Am J Physiol*, *262*(2 Pt 1), C461-469.
- Högner, K., Wolff, T., Pleschka, S., Plog, S., Gruber, A. D., Kalinke, U., et al. (2013). Macrophage-expressed IFN- β contributes to apoptotic alveolar epithelial cell injury in severe influenza virus pneumonia. *PLoS Pathog*, *9*(2), e1003188.
- Ikenouchi, J., Umeda, K., Tsukita, S., & Furuse, M. (2007). Requirement of ZO-1 for the formation of belt-like adherens junctions during epithelial cell polarization. *J Cell Biol*, *176*(6), 779-786.
- Ilyushina, N. A., & Donnelly, R. P. (2014). In vitro anti-influenza A activity of interferon (IFN)- λ 1 combined with IFN- β or oseltamivir carboxylate. *Antiviral Res*, *111*, 112-120.
- Imre, G. (2020). Cell death signalling in virus infection. *Cell Signal*, *76*, 109772.
- Irie, K., Shimizu, K., Sakisaka, T., Ikeda, W., & Takai, Y. (2004). Roles and modes of action of nectins in cell-cell adhesion. *Semin Cell Dev Biol*, *15*(6), 643-656.
- Isaacs, A., & Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, *147*(927), 258-267.
- Ishii, K. J., Koyama, S., Nakagawa, A., Coban, C., & Akira, S. (2008). Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections. *Cell Host Microbe*, *3*(6), 352-363.
- Ishizuka, S., Yamaya, M., Suzuki, T., Takahashi, H., Ida, S., Sasaki, T., et al. (2003). Effects of rhinovirus infection on the adherence of *Streptococcus pneumoniae* to cultured human airway epithelial cells. *J Infect Dis*, *188*(12), 1928-1939.

- Itoh, M., Sasaki, H., Furuse, M., Ozaki, H., Kita, T., & Tsukita, S. (2001). Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions. *J Cell Biol*, *154*(3), 491-497.
- Jacobs, S. E., Lamson, D. M., St George, K., & Walsh, T. J. (2013). Human rhinoviruses. *Clin Microbiol Rev*, *26*(1), 135-162.
- Jacquot, J., Hayem, A., & Galabert, C. (1992). Functions of proteins and lipids in airway secretions. *Eur Respir J*, *5*(3), 343-358.
- Jakiela, B., Gielicz, A., Plutecka, H., Hubalewska-Mazgaj, M., Mastalerz, L., Bochenek, G., et al. (2014). Th2-type cytokine-induced mucus metaplasia decreases susceptibility of human bronchial epithelium to rhinovirus infection. *Am J Respir Cell Mol Biol*, *51*(2), 229-241.
- Jaks, E., Gavutis, M., Uzé, G., Martal, J., & Piehler, J. (2007). Differential receptor subunit affinities of type I interferons govern differential signal activation. *J Mol Biol*, *366*(2), 525-539.
- Jewell, N. A., Cline, T., Mertz, S. E., Smirnov, S. V., Flaño, E., Schindler, C., et al. (2010). Lambda interferon is the predominant interferon induced by influenza A virus infection in vivo. *J Virol*, *84*(21), 11515-11522.
- Jiang, D., Schaefer, N., & Chu, H. W. (2018). Air-Liquid Interface Culture of Human and Mouse Airway Epithelial Cells. *Methods Mol Biol*, *1809*, 91-109.
- Johnston, N. W., & Sears, M. R. (2006). Asthma exacerbations . 1: epidemiology. *Thorax*, *61*(8), 722-728.
- Kaarteenaho-Wiik, R., & Soini, Y. (2009). Claudin-1, -2, -3, -4, -5, and -7 in usual interstitial pneumonia and sarcoidosis. *J Histochem Cytochem*, *57*(3), 187-195.
- Kahlert, C. R., Nigg, S., Onder, L., Dijkman, R., Diener, L., Rodriguez, R., et al. (2021). The quorum sensing com system regulates pneumococcal colonisation and invasive disease in a pseudostratified airway tissue model. *medRxiv*, 2021.2012.2016.21267943.
- Kang, T. G., Kwon, K. W., Kim, K., Lee, I., Kim, M. J., Ha, S. J., et al. (2022). Viral coinfection promotes tuberculosis immunopathogenesis by type I IFN signaling-dependent impediment of Th1 cell pulmonary influx. *Nat Commun*, *13*(1), 3155.
- Katsuno, T., Umeda, K., Matsui, T., Hata, M., Tamura, A., Itoh, M., et al. (2008). Deficiency of zonula occludens-1 causes embryonic lethal phenotype associated with defected yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells. *Mol Biol Cell*, *19*(6), 2465-2475.
- Kaul, P., Biagioli, M. C., Singh, I., & Turner, R. B. (2000). Rhinovirus-induced oxidative stress and interleukin-8 elaboration involves p47-phox but is independent of attachment to intercellular adhesion molecule-1 and viral replication. *J Infect Dis*, *181*(6), 1885-1890.
- Kausalya, P. J., Reichert, M., & Hunziker, W. (2001). Connexin45 directly binds to ZO-1 and localizes to the tight junction region in epithelial MDCK cells. *FEBS Lett*, *505*(1), 92-96.
- Keller, L. E., Robinson, D. A., & McDaniel, L. S. (2016). Nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae*: Emergence and Pathogenesis. *mBio*, *7*(2), e01792.
- Kelly, A., Houston, S. A., Sherwood, E., Casulli, J., & Travis, M. A. (2017). Regulation of Innate and Adaptive Immunity by TGF β . *Adv Immunol*, *134*, 137-233.
- Kerr, S. L., Mathew, C., & Ghildyal, R. (2021). Rhinovirus and Cell Death. *Viruses*, *13*(4).
- Kesimer, M., Ehre, C., Burns, K. A., Davis, C. W., Sheehan, J. K., & Pickles, R. J. (2013). Molecular organization of the mucins and glycocalyx underlying mucus transport over mucosal surfaces of the airways. *Mucosal Immunol*, *6*(2), 379-392.
- Kim, J. H., Jang, J. Y., & Jang, Y. J. (2021). Human rhinovirus serotypes induces different immune responses. *Virol J*, *18*(1), 232.
- Kim, K. A., Jung, J. H., Kang, I. G., Choi, Y. S., & Kim, S. T. (2018). ROS Is Involved in Disruption of Tight Junctions of Human Nasal Epithelial Cells Induced by HRV16. *Laryngoscope*, *128*(12), E393-E401.
- Knight, D. A., & Holgate, S. T. (2003). The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease. *Respirology*, *8*(4), 432-446.

- Knowles, M. R., & Boucher, R. C. (2002). Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest*, *109*(5), 571-577.
- Kopitar-Jerala, N. (2017). The Role of Interferons in Inflammation and Inflammasome Activation. *Front Immunol*, *8*, 873.
- Koppe, U., Högner, K., Doehn, J. M., Müller, H. C., Witzenrath, M., Gutbier, B., et al. (2012). Streptococcus pneumoniae stimulates a STING- and IFN regulatory factor 3-dependent type I IFN production in macrophages, which regulates RANTES production in macrophages, cocultured alveolar epithelial cells, and mouse lungs. *J Immunol*, *188*(2), 811-817.
- Koval, M. (2013a). Claudin heterogeneity and control of lung tight junctions. *Annu Rev Physiol*, *75*, 551-567.
- Koval, M. (2013b). Differential pathways of claudin oligomerization and integration into tight junctions. *Tissue Barriers*, *1*(3), e24518.
- Kratzer, E., Tian, Y., Sarich, N., Wu, T., Meliton, A., Leff, A., et al. (2012). Oxidative stress contributes to lung injury and barrier dysfunction via microtubule destabilization. *Am J Respir Cell Mol Biol*, *47*(5), 688-697.
- Krause, G., Protze, J., & Piontek, J. (2015). Assembly and function of claudins: Structure-function relationships based on homology models and crystal structures. *Semin Cell Dev Biol*, *42*, 3-12.
- Krause, G., Winkler, L., Mueller, S. L., Haseloff, R. F., Piontek, J., & Blasig, I. E. (2008). Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta*, *1778*(3), 631-645.
- Kubo, A., Yuba-Kubo, A., Tsukita, S., & Amagai, M. (2008). Sentan: a novel specific component of the apical structure of vertebrate motile cilia. *Mol Biol Cell*, *19*(12), 5338-5346.
- Kudo, D., Uno, K., Aoyagi, T., Akahori, Y., Ishii, K., Kanno, E., et al. (2013). Low-dose interferon- α treatment improves survival and inflammatory responses in a mouse model of fulminant acute respiratory distress syndrome. *Inflammation*, *36*(4), 812-820.
- Kwak, B. R., Pepper, M. S., Gros, D. B., & Meda, P. (2001). Inhibition of endothelial wound repair by dominant negative connexin inhibitors. *Mol Biol Cell*, *12*(4), 831-845.
- Lachowicz-Scroggins, M. E., Boushey, H. A., Finkbeiner, W. E., & Widdicombe, J. H. (2010). Interleukin-13-induced mucous metaplasia increases susceptibility of human airway epithelium to rhinovirus infection. *Am J Respir Cell Mol Biol*, *43*(6), 652-661.
- LaFemina, M. J., Sutherland, K. M., Bentley, T., Gonzales, L. W., Allen, L., Chapin, C. J., et al. (2014). Claudin-18 deficiency results in alveolar barrier dysfunction and impaired alveologenesis in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*, *51*(4), 550-558.
- Langereis, J. D., & de Jonge, M. I. (2017). Non-encapsulated Streptococcus pneumoniae, vaccination as a measure to interfere with horizontal gene transfer. *Virulence*, *8*(6), 637-639.
- Laura, G., Liu, Y., Fernandes, K., Willis-Owen, S. A. G., Ito, K., Cookson, W. O., et al. (2021). ORMDL3 regulates poly I:C induced inflammatory responses in airway epithelial cells. *BMC Pulm Med*, *21*(1), 167.
- Lavoie, T. B., Kalie, E., Crisafulli-Cabatu, S., Abramovich, R., DiGioia, G., Moolchan, K., et al. (2011). Binding and activity of all human alpha interferon subtypes. *Cytokine*, *56*(2), 282-289.
- Lazear, H. M., Schoggins, J. W., & Diamond, M. S. (2019). Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. *Immunity*, *50*(4), 907-923.
- Lebourgeois, S., Chenane, H. R., Houhou-Fidouh, N., Menidjel, R., Ferré, V. M., Collin, G., et al. (2021). Earlier *In Vitro* Viral Production With SARS-CoV-2 Alpha Than With Beta, Gamma, B, or A.27 Variants. *Front Cell Infect Microbiol*, *11*, 792202.
- Lee, E. Y., Lee, Z. H., & Song, Y. W. (2009). CXCL10 and autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*, *8*(5), 379-383.

- Lee, W. M., Lemanske, R. F., Evans, M. D., Vang, F., Pappas, T., Gangnon, R., et al. (2012). Human rhinovirus species and season of infection determine illness severity. *Am J Respir Crit Care Med*, *186*(9), 886-891.
- Lee, W. M., & Wang, W. (2003). Human rhinovirus type 16: mutant V1210A requires capsid-binding drug for assembly of pentamers to form virions during morphogenesis. *J Virol*, *77*(11), 6235-6244.
- LeMessurier, K. S., Häcker, H., Chi, L., Tuomanen, E., & Redecke, V. (2013). Type I interferon protects against pneumococcal invasive disease by inhibiting bacterial transmigration across the lung. *PLoS Pathog*, *9*(11), e1003727.
- Leopold, P. L., O'Mahony, M. J., Lian, X. J., Tilley, A. E., Harvey, B. G., & Crystal, R. G. (2009). Smoking is associated with shortened airway cilia. *PLoS One*, *4*(12), e8157.
- Lester, S. N., & Li, K. (2014). Toll-like receptors in antiviral innate immunity. *J Mol Biol*, *426*(6), 1246-1264.
- Leung, C., Wadsworth, S. J., Yang, S. J., & Dorscheid, D. R. (2020). Structural and functional variations in human bronchial epithelial cells cultured in air-liquid interface using different growth media. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, *318*(5), L1063-L1073.
- Li, G., Flodby, P., Luo, J., Kage, H., Sipos, A., Gao, D., et al. (2014). Knockout mice reveal key roles for claudin 18 in alveolar barrier properties and fluid homeostasis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, *51*(2), 210-222.
- Lillehoj, E. P., Kato, K., Lu, W., & Kim, K. C. (2013). Cellular and molecular biology of airway mucins. *Int Rev Cell Mol Biol*, *303*, 139-202.
- Linfield, D. T., Raduka, A., Aghapour, M., & Rezaee, F. (2021). Airway tight junctions as targets of viral infections. *Tissue Barriers*, *9*(2), 1883965.
- Lingaraju, A., Long, T. M., Wang, Y., Austin, J. R., & Turner, J. R. (2015). Conceptual barriers to understanding physical barriers. *Semin Cell Dev Biol*, *42*, 13-21.
- Liu, J., Chen, X., Dou, M., He, H., Ju, M., Ji, S., et al. (2019). Particulate matter disrupts airway epithelial barrier via oxidative stress to promote. *J Thorac Dis*, *11*(6), 2617-2627.
- Liu, M., Guo, S., Hibbert, J. M., Jain, V., Singh, N., Wilson, N. O., et al. (2011). CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. *Cytokine Growth Factor Rev*, *22*(3), 121-130.
- Liu, S., Yu, Y., Zhang, M., Wang, W., & Cao, X. (2001). The involvement of TNF-alpha-related apoptosis-inducing ligand in the enhanced cytotoxicity of IFN-beta-stimulated human dendritic cells to tumor cells. *J Immunol*, *166*(9), 5407-5415.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods*, *25*(4), 402-408.
- Looi, K., Buckley, A. G., Rigby, P. J., Garratt, L. W., Iosifidis, T., Zosky, G. R., et al. (2018). Effects of human rhinovirus on epithelial barrier integrity and function in children with asthma. *Clin Exp Allergy*, *48*(5), 513-524.
- Looi, K., Troy, N. M., Garratt, L. W., Iosifidis, T., Bosco, A., Buckley, A. G., et al. (2016). Effect of human rhinovirus infection on airway epithelium tight junction protein disassembly and transepithelial permeability. *Exp Lung Res*, *42*(7), 380-395.
- Lopez-Souza, N., Favoreto, S., Wong, H., Ward, T., Yagi, S., Schnurr, D., et al. (2009). In vitro susceptibility to rhinovirus infection is greater for bronchial than for nasal airway epithelial cells in human subjects. *J Allergy Clin Immunol*, *123*(6), 1384-1390.e1382.
- Loxham, M., & Davies, D. E. (2017). Phenotypic and genetic aspects of epithelial barrier function in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol*, *139*(6), 1736-1751.
- Maginnis, M. S. (2018). Virus-Receptor Interactions: The Key to Cellular Invasion. *J Mol Biol*, *430*(17), 2590-2611.
- Mallia, P., Message, S. D., Gielen, V., Contoli, M., Gray, K., Kebabdz, T., et al. (2011). Experimental rhinovirus infection as a human model of chronic obstructive pulmonary disease exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med*, *183*(6), 734-742.

- Mancuso, G., Midiri, A., Biondo, C., Beninati, C., Zummo, S., Galbo, R., et al. (2007). Type I IFN signaling is crucial for host resistance against different species of pathogenic bacteria. *J Immunol*, *178*(5), 3126-3133.
- Manna, S., Baidara, P., & Mandal, S. M. (2020). Molecular pathogenesis of secondary bacterial infection associated to viral infections including SARS-CoV-2. *J Infect Public Health*, *13*(10), 1397-1404.
- Mantlo, E., Bukreyeva, N., Maruyama, J., Paessler, S., & Huang, C. (2020). Antiviral activities of type I interferons to SARS-CoV-2 infection. *Antiviral Res*, *179*, 104811.
- Martinez-Giron, R., Van Woerden, H. C., & Martínez-Torre, C. (2020). Ciliated nasal epithelial cells damage and human rhinovirus infection: cytological findings. *Acta Biomed*, *91*(1), 146-147.
- Martín-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., et al. (1998). Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol*, *142*(1), 117-127.
- McKenzie, C. W., Klonoski, J. M., Maier, T., Trujillo, G., Vitiello, P. F., Huber, V. C., et al. (2013). Enhanced response to pulmonary *Streptococcus pneumoniae* infection is associated with primary ciliary dyskinesia in mice lacking *Pcdp1* and *Spf2*. *Cilia*, *2*(1), 18.
- Melin, M., Jarva, H., Siira, L., Meri, S., Käyhty, H., & Väkeväinen, M. (2009). *Streptococcus pneumoniae* capsular serotype 19F is more resistant to C3 deposition and less sensitive to opsonophagocytosis than serotype 6B. *Infect Immun*, *77*(2), 676-684.
- Melin, M., Trzciński, K., Antonio, M., Meri, S., Adegbola, R., Kaijalainen, T., et al. (2010). Serotype-related variation in susceptibility to complement deposition and opsonophagocytosis among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*, *78*(12), 5252-5261.
- Melin, M., Trzciński, K., Meri, S., Käyhty, H., & Väkeväinen, M. (2010). The capsular serotype of *Streptococcus pneumoniae* is more important than the genetic background for resistance to complement. *Infect Immun*, *78*(12), 5262-5270.
- Mesev, E. V., LeDesma, R. A., & Ploss, A. (2019). Decoding type I and III interferon signalling during viral infection. *Nat Microbiol*.
- Michi, A. N., & Proud, D. (2021). A toolbox for studying respiratory viral infections using air-liquid interface cultures of human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, *321*(1), L263-L280.
- Michi, A. N., Yipp, B. G., Dufour, A., Lopes, F., & Proud, D. (2021). PGC-1 α mediates a metabolic host defense response in human airway epithelium during rhinovirus infections. *Nat Commun*, *12*(1), 3669.
- Mineta, K., Yamamoto, Y., Yamazaki, Y., Tanaka, H., Tada, Y., Saito, K., et al. (2011). Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett*, *585*(4), 606-612.
- Mitchell, A. M., & Mitchell, T. J. (2010). *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. *Clin Microbiol Infect*, *16*(5), 411-418.
- Moll, H. P., Maier, T., Zommer, A., Lavoie, T., & Brostjan, C. (2011). The differential activity of interferon- α subtypes is consistent among distinct target genes and cell types. *Cytokine*, *53*(1), 52-59.
- Monk, P. D., Marsden, R. J., Tear, V. J., Brookes, J., Batten, T. N., Mankowski, M., et al. (2021). Safety and efficacy of inhaled nebulised interferon beta-1a (SNG001) for treatment of SARS-CoV-2 infection: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Respir Med*, *9*(2), 196-206.
- Monto, A. S., Albrecht, J. K., & Schwartz, S. A. (1988). Demonstration of dose-response relationship in seasonal prophylaxis of respiratory infections with alpha-2b interferon. *Antimicrob Agents Chemother*, *32*(1), 47-50.
- Monto, A. S., Shope, T. C., Schwartz, S. A., & Albrecht, J. K. (1986). Intranasal interferon-alpha 2b for seasonal prophylaxis of respiratory infection. *J Infect Dis*, *154*(1), 128-133.

- Mootz, M., Jakwerth, C. A., Schmidt-Weber, C. B., & Zissler, U. M. (2022). Secretoglobins in the big picture of immunoregulation in airway diseases. *Allergy*, *77*(3), 767-777.
- Morens, D. M., Taubenberger, J. K., & Fauci, A. S. (2008). Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *J Infect Dis*, *198*(7), 962-970.
- Morita, K., Furuse, M., Fujimoto, K., & Tsukita, S. (1999). Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(2), 511-516.
- Moriyama, M., Hugentobler, W. J., & Iwasaki, A. (2020). Seasonality of Respiratory Viral Infections. *Annu Rev Virol*, *7*(1), 83-101.
- Mosser, A. G., Brockman-Schneider, R., Amineva, S., Burchell, L., Sedgwick, J. B., Busse, W. W., et al. (2002). Similar frequency of rhinovirus-infectible cells in upper and lower airway epithelium. *J Infect Dis*, *185*(6), 734-743.
- Nakagome, K., Bochkov, Y. A., Ashraf, S., Brockman-Schneider, R. A., Evans, M. D., Pasic, T. R., et al. (2014). Effects of rhinovirus species on viral replication and cytokine production. *J Allergy Clin Immunol*, *134*(2), 332-341.
- Nakanaga, T., Nadel, J. A., Ueki, I. F., Koff, J. L., & Shao, M. X. (2007). Regulation of interleukin-8 via an airway epithelial signaling cascade. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, *292*(5), L1289-1296.
- Nelson, W. J. (2008). Regulation of cell-cell adhesion by the cadherin-catenin complex. *Biochem Soc Trans*, *36*(Pt 2), 149-155.
- O'Donnell, V. B., & Freeman, B. A. (2001). Interactions between nitric oxide and lipid oxidation pathways: implications for vascular disease. *Circ Res*, *88*(1), 12-21.
- Ohkuni, T., Kojima, T., Ogasawara, N., Masaki, T., Fuchimoto, J., Kamekura, R., et al. (2011). Poly(I:C) reduces expression of JAM-A and induces secretion of IL-8 and TNF- α via distinct NF- κ B pathways in human nasal epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, *250*(1), 29-38.
- Olagnier, D., & Hiscott, J. (2014). Type I and type III interferon-induced immune response: it's a matter of kinetics and magnitude. *Hepatology*, *59*(4), 1225-1228.
- Paget, C., & Trottein, F. (2019). Mechanisms of Bacterial Superinfection Post-influenza: A Role for Unconventional T Cells. *Front Immunol*, *10*, 336.
- Palmenberg, A. C. (2017). Rhinovirus C, Asthma, and Cell Surface Expression of Virus Receptor CDHR3. *J Virol*, *91*(7).
- Peltola, V., Heikkinen, T., Ruuskanen, O., Jartti, T., Hovi, T., Kilpi, T., et al. (2011). Temporal association between rhinovirus circulation in the community and invasive pneumococcal disease in children. *Pediatr Infect Dis J*, *30*(6), 456-461.
- Peltola, V. T., & McCullers, J. A. (2004). Respiratory viruses predisposing to bacterial infections: role of neuraminidase. *Pediatr Infect Dis J*, *23*(1 Suppl), S87-97.
- Pezzulo, A. A., Starner, T. D., Scheetz, T. E., Traver, G. L., Tilley, A. E., Harvey, B. G., et al. (2011). The air-liquid interface and use of primary cell cultures are important to recapitulate the transcriptional profile of in vivo airway epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, *300*(1), L25-31.
- Player, M. R., & Torrence, P. F. (1998). The 2-5A system: modulation of viral and cellular processes through acceleration of RNA degradation. *Pharmacol Ther*, *78*(2), 55-113.
- Proud, D., Turner, R. B., Winther, B., Wiehler, S., Tiesman, J. P., Reichling, T. D., et al. (2008). Gene expression profiles during in vivo human rhinovirus infection: insights into the host response. *Am J Respir Crit Care Med*, *178*(9), 962-968.
- Prytherch, Z., Job, C., Marshall, H., Oreffo, V., Foster, M., & Bérubé, K. (2011). Tissue-Specific stem cell differentiation in an in vitro airway model. *Macromol Biosci*, *11*(11), 1467-1477.
- Rahman, I. (2003). Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases. *J Biochem Mol Biol*, *36*(1), 95-109.

- Raleigh, D. R., Marchiando, A. M., Zhang, Y., Shen, L., Sasaki, H., Wang, Y., et al. (2010). Tight junction-associated MARVEL proteins marveld3, tricellulin, and occludin have distinct but overlapping functions. *Mol Biol Cell*, *21*(7), 1200-1213.
- Ramakrishnan, M. A. (2016). Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J Virol*, *5*(2), 85-86.
- Reis, G., Moreira Silva, E. A. S., Medeiros Silva, D. C., Thabane, L., Campos, V. H. S., Ferreira, T. S., et al. (2023). Early Treatment with Pegylated Interferon Lambda for Covid-19. *N Engl J Med*, *388*(6), 518-528.
- Rennard, S. I., Romberger, D. J., Sisson, J. H., Von Essen, S. G., Rubinstein, I., Robbins, R. A., et al. (1994). Airway epithelial cells: functional roles in airway disease. *Am J Respir Crit Care Med*, *150*(5 Pt 2), S27-30.
- Rezaee, F., & Georas, S. N. (2014). Breaking barriers. New insights into airway epithelial barrier function in health and disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*, *50*(5), 857-869.
- Rezaee, F., Harford, T. J., Linfield, D. T., Altawallbeh, G., Midura, R. J., Ivanov, A. I., et al. (2017). cAMP-dependent activation of protein kinase A attenuates respiratory syncytial virus-induced human airway epithelial barrier disruption. *PLoS One*, *12*(7), e0181876.
- Rezaee, F., Meednu, N., Emo, J. A., Saatian, B., Chapman, T. J., Naydenov, N. G., et al. (2011). Polyinosinic:polycytidylic acid induces protein kinase D-dependent disassembly of apical junctions and barrier dysfunction in airway epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol*, *128*(6), 1216-1224.e1211.
- Rock, J. R., Onaitis, M. W., Rawlins, E. L., Lu, Y., Clark, C. P., Xue, Y., et al. (2009). Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(31), 12771-12775.
- Rodriguez-Boulan, E., & Macara, I. G. (2014). Organization and execution of the epithelial polarity programme. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *15*(4), 225-242.
- Rohde, G., Wiethège, A., Borg, I., Kauth, M., Bauer, T. T., Gillissen, A., et al. (2003). Respiratory viruses in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease requiring hospitalisation: a case-control study. *Thorax*, *58*(1), 37-42.
- Royston, L., & Tapparel, C. (2016). Rhinoviruses and Respiratory Enteroviruses: Not as Simple as ABC. *Viruses*, *8*(1).
- Rubins, J. B. (2003). Alveolar macrophages: wielding the double-edged sword of inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*, *167*(2), 103-104.
- Russo, R. C., Garcia, C. C., Teixeira, M. M., & Amaral, F. A. (2014). The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert Rev Clin Immunol*, *10*(5), 593-619.
- Rutland, J., Griffin, W. M., & Cole, P. J. (1982). Human ciliary beat frequency in epithelium from intrathoracic and extrathoracic airways. *Am Rev Respir Dis*, *125*(1), 100-105.
- Sadler, A. J., & Williams, B. R. (2008). Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol*, *8*(7), 559-568.
- Sajjan, U., Wang, Q., Zhao, Y., Gruenert, D. C., & Hershenson, M. B. (2008). Rhinovirus disrupts the barrier function of polarized airway epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med*, *178*(12), 1271-1281.
- Sanders, S. P., Proud, D., Permutt, S., Siekierski, E. S., Yachechko, R., & Liu, M. C. (2004). Role of nasal nitric oxide in the resolution of experimental rhinovirus infection. *J Allergy Clin Immunol*, *113*(4), 697-702.
- Sasaki, Y., Togo, Y., Wagner, H. N., Hornick, R. B., Schwartz, A. R., & Proctor, D. F. (1973). Mucociliary function during experimentally induced rhinovirus infection in man. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, *82*(2), 203-211.
- Schlingmann, B., Molina, S. A., & Koval, M. (2015). Claudins: Gatekeepers of lung epithelial function. *Semin Cell Dev Biol*, *42*, 47-57.
- Schneeberger, E. E., & Lynch, R. D. (2004). The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol*, *286*(6), C1213-1228.

- Schulzke, J. D., & Fromm, M. (2009). Tight junctions: molecular structure meets function. *Ann N Y Acad Sci*, *1165*, 1-6.
- Shahangian, A., Chow, E. K., Tian, X., Kang, J. R., Ghaffari, A., Liu, S. Y., et al. (2009). Type I IFNs mediate development of postinfluenza bacterial pneumonia in mice. *J Clin Invest*, *119*(7), 1910-1920.
- Shao, Y., Cheng, Z., Li, X., Chernaya, V., Wang, H., & Yang, X. F. (2014). Immunosuppressive/anti-inflammatory cytokines directly and indirectly inhibit endothelial dysfunction--a novel mechanism for maintaining vascular function. *J Hematol Oncol*, *7*, 80.
- Shen, L., Weber, C. R., Raleigh, D. R., Yu, D., & Turner, J. R. (2011). Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo. *Annu Rev Physiol*, *73*, 283-309.
- Singh, D., Solan, J. L., Taffet, S. M., Javier, R., & Lampe, P. D. (2005). Connexin 43 interacts with zona occludens-1 and -2 proteins in a cell cycle stage-specific manner. *J Biol Chem*, *280*(34), 30416-30421.
- Smith, C. M., Sandrini, S., Datta, S., Freestone, P., Shafeeq, S., Radhakrishnan, P., et al. (2014). Respiratory syncytial virus increases the virulence of *Streptococcus pneumoniae* by binding to penicillin binding protein 1a. A new paradigm in respiratory infection. *Am J Respir Crit Care Med*, *190*(2), 196-207.
- Smith, S. M., Lee, D. K., Lacy, J., & Coleman, D. L. (1990). Rat tracheal epithelial cells produce granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *Am J Respir Cell Mol Biol*, *2*(1), 59-68.
- Spence, J. S., He, R., Hoffmann, H. H., Das, T., Thinon, E., Rice, C. M., et al. (2019). IFITM3 directly engages and shuttles incoming virus particles to lysosomes. *Nat Chem Biol*, *15*(3), 259-268.
- Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J. P., Eberl, G., et al. (2013). Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol*, *13*(2), 145-149.
- Staudt, M. R., Buro-Auriemma, L. J., Walters, M. S., Salit, J., Vincent, T., Shaykhiev, R., et al. (2014). Airway Basal stem/progenitor cells have diminished capacity to regenerate airway epithelium in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, *190*(8), 955-958.
- Stewart, C. E., Torr, E. E., Mohd Jamili, N. H., Bosquillon, C., & Sayers, I. (2012). Evaluation of differentiated human bronchial epithelial cell culture systems for asthma research. *J Allergy (Cairo)*, *2012*, 943982.
- Stille, W. T., Pierce, W., & Crawford, Y. E. (1961). Multiple infections in acute respiratory illness. I. Severity of illness of naval recruits and independence of infectious agents. *J Infect Dis*, *109*, 158-165.
- Swindle, E. J., Collins, J. E., & Davies, D. E. (2009). Breakdown in epithelial barrier function in patients with asthma: identification of novel therapeutic approaches. *J Allergy Clin Immunol*, *124*(1), 23-34; quiz 35-26.
- Synairgen plc. (21. Februar 2022). Topline results from Phase 3 SPRINTER trial. Retrieved 16.12.2022; 15:23 Uhr, from <https://www.synairgen.com/media/2022-02-21-topline-results-from-phase-3-sprinter-trial>
- Taboada, B., Espinoza, M. A., Isa, P., Aponte, F. E., Arias-Ortiz, M. A., Monge-Martínez, J., et al. (2014). Is there still room for novel viral pathogens in pediatric respiratory tract infections? *PLoS One*, *9*(11), e113570.
- Tadokoro, T., Wang, Y., Barak, L. S., Bai, Y., Randell, S. H., & Hogan, B. L. (2014). IL-6/STAT3 promotes regeneration of airway ciliated cells from basal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(35), E3641-3649.
- Takeda, K., & Akira, S. (2001). Regulation of innate immune responses by Toll-like receptors. *Jpn J Infect Dis*, *54*(6), 209-219.

- Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, *140*(6), 805-820.
- Taniguchi, T., & Takaoka, A. (2001). A weak signal for strong responses: interferon-alpha/beta revisited. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *2*(5), 378-386.
- Tarran, R., Grubb, B. R., Gatzky, J. T., Davis, C. W., & Boucher, R. C. (2001). The relative roles of passive surface forces and active ion transport in the modulation of airway surface liquid volume and composition. *J Gen Physiol*, *118*(2), 223-236.
- Thomas, J., Morlé, L., Soulavie, F., Laurençon, A., Sagnol, S., & Durand, B. (2010). Transcriptional control of genes involved in ciliogenesis: a first step in making cilia. *Biol Cell*, *102*(9), 499-513.
- Thomason, H. A., Scothern, A., McHarg, S., & Garrod, D. R. (2010). Desmosomes: adhesive strength and signalling in health and disease. *Biochem J*, *429*(3), 419-433.
- Tong, H. H., Grants, I., Liu, X., & DeMaria, T. F. (2002). Comparison of alteration of cell surface carbohydrates of the chinchilla tubotympanum and colonial opacity phenotype of *Streptococcus pneumoniae* during experimental pneumococcal otitis media with or without an antecedent influenza A virus infection. *Infect Immun*, *70*(8), 4292-4301.
- Triantafilou, M., Manukyan, M., Mackie, A., Morath, S., Hartung, T., Heine, H., et al. (2004). Lipoteichoic acid and toll-like receptor 2 internalization and targeting to the Golgi are lipid raft-dependent. *J Biol Chem*, *279*(39), 40882-40889.
- Troy, N. M., & Bosco, A. (2016). Respiratory viral infections and host responses; insights from genomics. *Respir Res*, *17*(1), 156.
- Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T., & Pennington, D. J. (2014). Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta*, *1843*(11), 2563-2582.
- Umeda, K., Matsui, T., Nakayama, M., Furuse, K., Sasaki, H., Furuse, M., et al. (2004). Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1. *J Biol Chem*, *279*(43), 44785-44794.
- Upton, J. W., & Chan, F. K. (2014). Staying alive: cell death in antiviral immunity. *Mol Cell*, *54*(2), 273-280.
- Utepergenov, D. I., Fanning, A. S., & Anderson, J. M. (2006). Dimerization of the scaffolding protein ZO-1 through the second PDZ domain. *J Biol Chem*, *281*(34), 24671-24677.
- Venarske, D. L., Busse, W. W., Griffin, M. R., Gebretsadik, T., Shintani, A. K., Minton, P. A., et al. (2006). The relationship of rhinovirus-associated asthma hospitalizations with inhaled corticosteroids and smoking. *J Infect Dis*, *193*(11), 1536-1543.
- Viana, F., O'Kane, C. M., & Schroeder, G. N. (2022). Precision-cut lung slices: A powerful ex vivo model to investigate respiratory infectious diseases. *Mol Microbiol*, *117*(3), 578-588.
- Voigt, E. A., & Yin, J. (2015). Kinetic Differences and Synergistic Antiviral Effects Between Type I and Type III Interferon Signaling Indicate Pathway Independence. *J Interferon Cytokine Res*, *35*(9), 734-747.
- Walter, M. R. (2020). The Role of Structure in the Biology of Interferon Signaling. *Front Immunol*, *11*, 606489.
- Waltl, E. E., Selb, R., Eckl-Dorna, J., Mueller, C. A., Cabauatan, C. R., Eiwegger, T., et al. (2018). Betamethasone prevents human rhinovirus- and cigarette smoke- induced loss of respiratory epithelial barrier function. *Sci Rep*, *8*(1), 9688.
- Wan, H., Winton, H. L., Soeller, C., Stewart, G. A., Thompson, P. J., Gruenert, D. C., et al. (2000). Tight junction properties of the immortalized human bronchial epithelial cell lines Calu-3 and 16HBE14o-. *Eur Respir J*, *15*(6), 1058-1068.
- Wang, Q., Nagarkar, D. R., Bowman, E. R., Schneider, D., Gosangi, B., Lei, J., et al. (2009). Role of double-stranded RNA pattern recognition receptors in rhinovirus-induced airway epithelial cell responses. *J Immunol*, *183*(11), 6989-6997.

- Wang, Y., Ninaber, D. K., van Schadewijk, A., & Hiemstra, P. S. (2020). Tiotropium and Fluticasone Inhibit Rhinovirus-Induced Mucin Production via Multiple Mechanisms in Differentiated Airway Epithelial Cells. *Front Cell Infect Microbiol*, *10*, 278.
- Wanner, A., Salathé, M., & O'Riordan, T. G. (1996). Muciliary clearance in the airways. *Am J Respir Crit Care Med*, *154*(6 Pt 1), 1868-1902.
- Wansleben, C., Barkauskas, C. E., Rock, J. R., & Hogan, B. L. (2013). Stem cells of the adult lung: their development and role in homeostasis, regeneration, and disease. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, *2*(1), 131-148.
- Warliah, L., Rohman, A. S., & Rusmin, P. H. (2012). Model Development of Air Volume and Breathing Frequency in Human Respiratory System Simulation. *Procedia - Social and Behavioral Sciences*, *67*, 260-268.
- Warner, S. M., Wiehler, S., Michi, A. N., & Proud, D. (2019). Rhinovirus replication and innate immunity in highly differentiated human airway epithelial cells. *Respir Res*, *20*(1), 150.
- Weight, C. M., Venturini, C., Pojar, S., Jochems, S. P., Reiné, J., Nikolaou, E., et al. (2019). Microinvasion by *Streptococcus pneumoniae* induces epithelial innate immunity during colonisation at the human mucosal surface. *Nat Commun*, *10*(1), 3060.
- Wen, Z., Liu, Y., Qu, F., & Zhang, J. R. (2016). Allelic Variation of the Capsule Promoter Diversifies Encapsulation and Virulence In *Streptococcus pneumoniae*. *Sci Rep*, *6*, 30176.
- Whiteman, S. C., & Spiteri, M. A. (2008). IFN-gamma regulation of ICAM-1 receptors in bronchial epithelial cells: soluble ICAM-1 release inhibits human rhinovirus infection. *J Inflamm (Lond)*, *5*, 8.
- Widdicombe, J. H., & Widdicombe, J. G. (1995). Regulation of human airway surface liquid. *Respir Physiol*, *99*(1), 3-12.
- World Health Organization. (June 2021). Chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs315/en/>. Retrieved 12.08.2021, 2021
- World Health Organization. (May 2021). Asthma. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/asthma>. Retrieved 12.08.2021, 2021, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/asthma>
- Wray, C., Mao, Y., Pan, J., Chandrasena, A., Piasta, F., & Frank, J. A. (2009). Claudin-4 augments alveolar epithelial barrier function and is induced in acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, *297*(2), L219-227.
- Wu, J., Wang, Y., Liu, G., Jia, Y., Yang, J., Shi, J., et al. (2017). Characterization of air-liquid interface culture of A549 alveolar epithelial cells. *Braz J Med Biol Res*, *51*(2), e6950.
- Yang, Z., Mitländer, H., Vuorinen, T., & Finotto, S. (2021). Mechanism of Rhinovirus Immunity and Asthma. *Front Immunol*, *12*, 731846.
- Yeo, A. J., Henningham, A., Fantino, E., Galbraith, S., Krause, L., Wainwright, C. E., et al. (2019). Increased susceptibility of airway epithelial cells from ataxia-telangiectasia to *S. pneumoniae* infection due to oxidative damage and impaired innate immunity. *Sci Rep*, *9*(1), 2627.
- Yeo, N. K., & Jang, Y. J. (2010). Rhinovirus infection-induced alteration of tight junction and adherens junction components in human nasal epithelial cells. *Laryngoscope*, *120*(2), 346-352.
- Yuan, G., Drost, N. A., & McIvor, R. A. (2013). Respiratory rate and breathing pattern. *McMaster Univ. Med. J*, *10*(1), 23-25.
- Yuta, A., Doyle, W. J., Gaumont, E., Ali, M., Tamarkin, L., Baraniuk, J. N., et al. (1998). Rhinovirus infection induces mucus hypersecretion. *Am J Physiol*, *274*(6), L1017-1023.
- Zaheer, R. S., Wiehler, S., Hudy, M. H., Traves, S. L., Pelikan, J. B., Leigh, R., et al. (2014). Human rhinovirus-induced ISG15 selectively modulates epithelial antiviral immunity. *Mucosal Immunol*, *7*(5), 1127-1138.

- Zemke, A. C., Snyder, J. C., Brockway, B. L., Drake, J. A., Reynolds, S. D., Kaminski, N., et al. (2009). Molecular staging of epithelial maturation using secretory cell-specific genes as markers. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 40(3), 340-348.
- Zhang, H., He, F., Li, P., Hardwidge, P. R., Li, N., & Peng, Y. (2021). The Role of Innate Immunity in Pulmonary Infections. *Biomed Res Int*, 2021, 6646071.
- Zhou, H., Møhlenberg, M., Terczyńska-Dyla, E., Winther, K. G., Hansen, N. H., Vad-Nielsen, J., et al. (2020). The *IFNL4* Gene Is a Noncanonical Interferon Gene with a Unique but Evolutionarily Conserved Regulation. *J Virol*, 94(5).
- Zhou, Y., Li, S., Tang, Z., Xu, C., Huang, S., Wu, J., et al. (2017). Different antiviral effects of IFN α and IFN β in an HBV mouse model. *Immunobiology*, 222(3), 562-570.
- Zhu, J., Ghosh, A., & Sarkar, S. N. (2015). OASL-a new player in controlling antiviral innate immunity. *Curr Opin Virol*, 12, 15-19.
- Zihni, C., Mills, C., Matter, K., & Balda, M. S. (2016). Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 17(9), 564-580.

7. Anhang

7.1. Ergänzende Ergebnisse

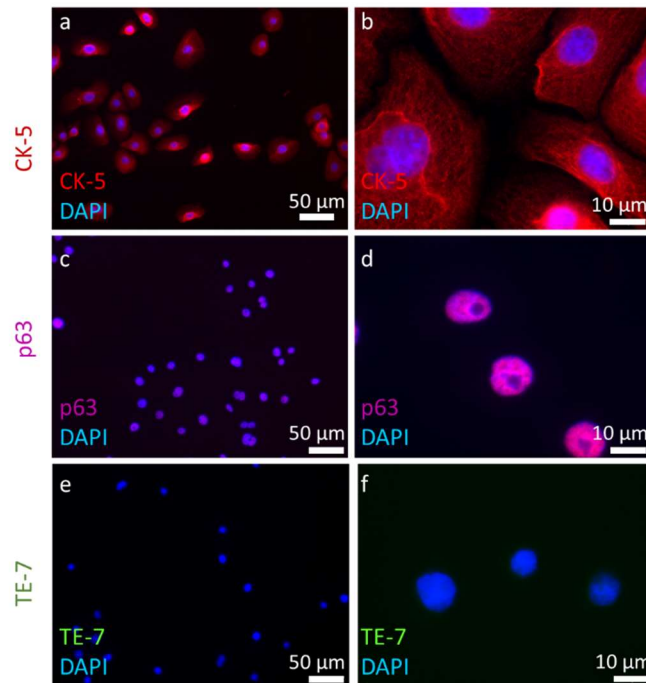


Abbildung 7.1: Beispiel für die Charakterisierung von pBECs eines Spenders nach der Zellisolation

Nach der Isolation wurden die pBECs vor ihrer Verwendung charakterisiert. Verwendet wurden dazu die Antikörper Cytokeratin-5 (positives Signal in a) und b)), p63 (positives Signal in c) und d)) und TE-7 (kein Signal in e) und f)). Grün = TE-7, rot = Cytokeratin (CK)-5, magenta = p63, blau = DAPI.

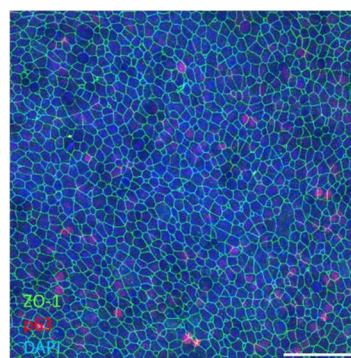


Abbildung 7.2: Beispiel einer Färbung der differenzierten pBECs in ALI-Kultur mit ZO-1, p63 und DAPI

Gezeigt ist eine repräsentative Aufnahme differenzierter, fixierter pBECs in ALI-Kultur, immunfluoreszenzgefärbt gegen ZO-1 und p63 und nach der Markierung der Zellkerne mit DAPI mittels KLSM analysiert. Maßstabsbalken: 50 µm; *Tight Junctions* (grün, ZO-1 markiert), basale Zellen (rot, p63 markiert); Zellkerne (blau, DAPI markiert).

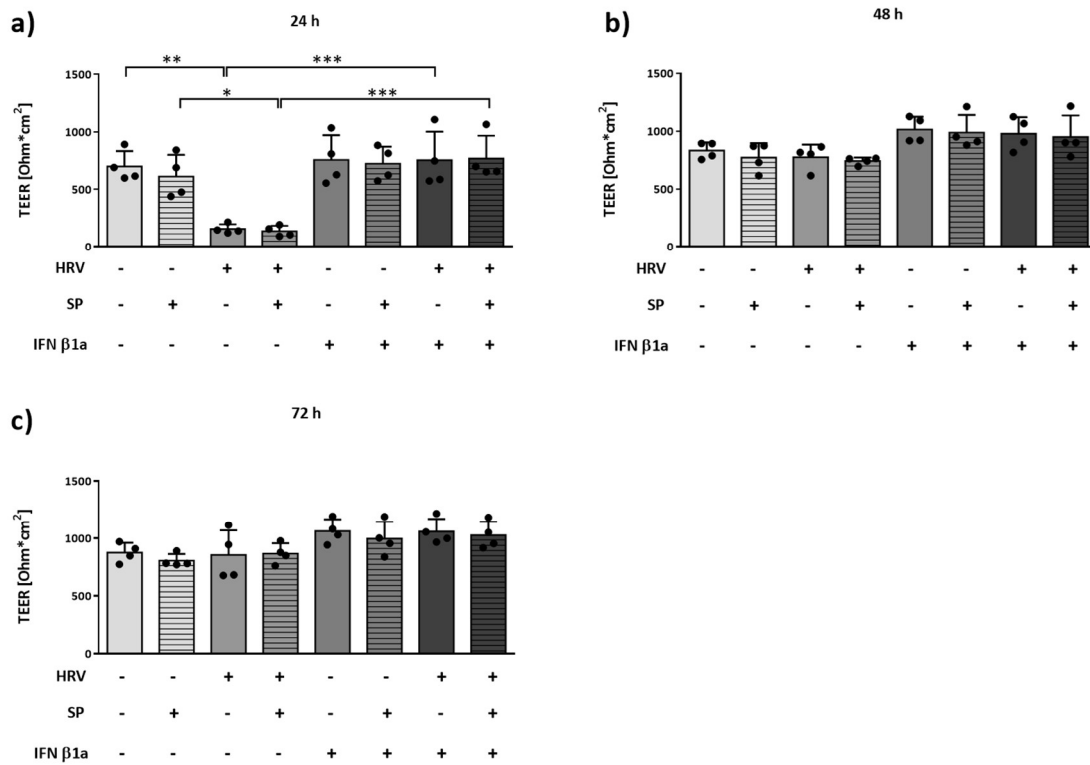


Abbildung 7.3: Messung des transepithelialen Widerstand in differenzierten pBECs in ALI-Kultur nach IFN β1a-Stimulation HRV16-Infektion vor Infektion mit *S. pneumoniae*

Differenzierte pBECs in ALI-Kultur wurden für 24 h mit 1.600 ng IFN β1a stimuliert, anschließend für 2 h mit HRV16 infiziert, bevor erneut 1.000 ng IFN β1a zugegeben wurde. An den Zeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h wurde der transepitheliale Widerstand der Zellen gemessen, bevor eine 8-stündige Ko-Infektion mit *S. pneumoniae* (SP) erfolgte; Mittelwert ± Standardabweichung, (n=4). a) TEER-Werte 24 h nach HRV16-Infektion, b) TEER-Werte 48 h nach HRV16-Infektion, c) TEER-Werte 72 h nach HRV16-Infektion. Signifikanzniveau: * $p \leq 0,05$; *Three-Way ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test, Matching Faktor= Bakterien.*

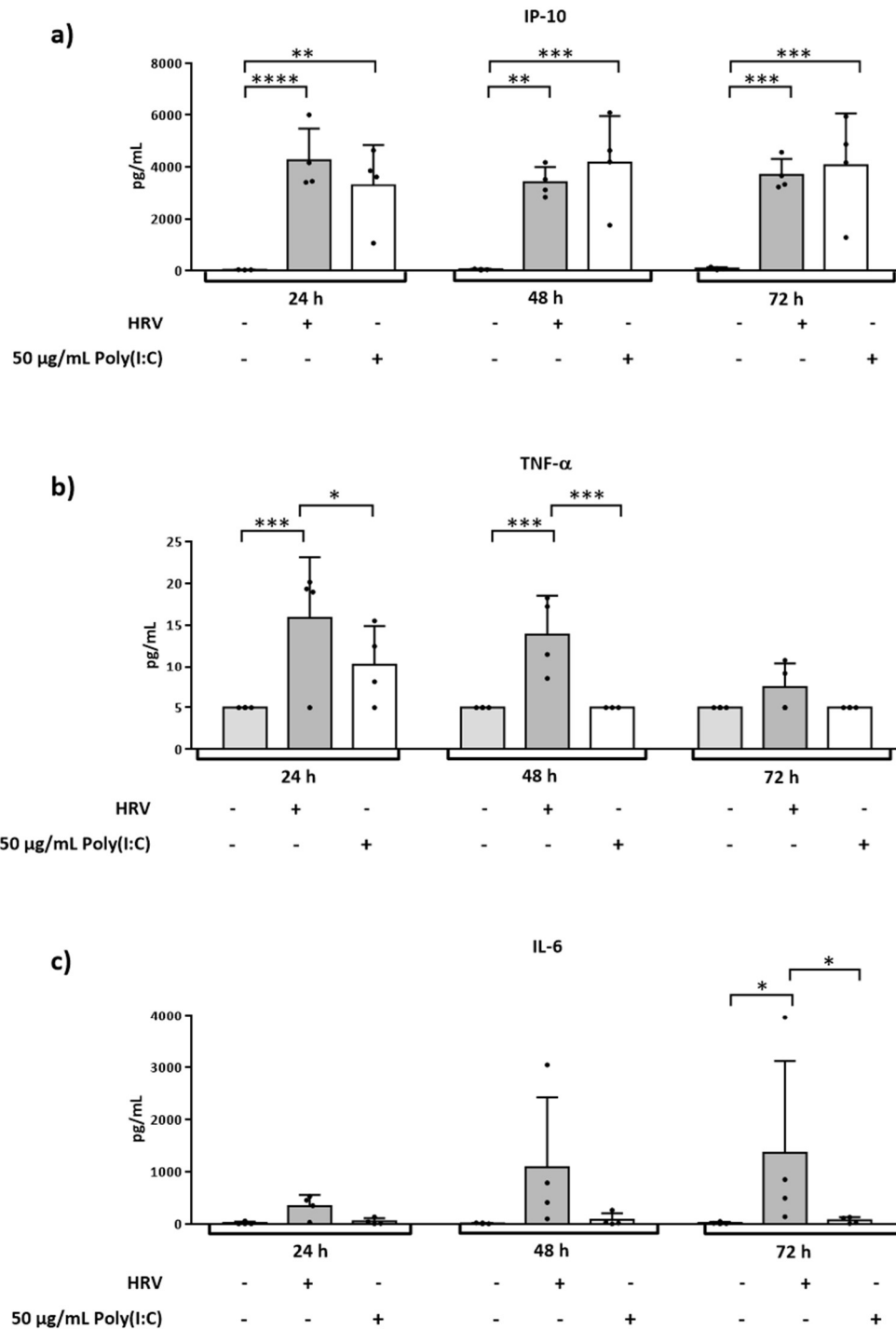


Abbildung 7.4: Poly(I:C)-Stimulation aktiviert die Immunantwort der differenzierten pBECs in ALI-Kultur
 Differenzierte pBECs in ALI-Kultur wurden für 2 h mit Poly(I:C) stimuliert oder mit HRV16 infiziert. Nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation wurden mittels CBA die Proteinkonzentration der Zytokine a) IP-10, b) TNF- α und c) IL-6 bestimmt; Mittelwert \pm Standardabweichung, (n=4). LLoQ = 10 pg/mL, alle Werte die diese Grenze nicht erreichten wurden mit 0,5 x 10 pg/mL ersetzt. Signifikanzniveau: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; **** $p \leq 0,0001$; Two-Way ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test.

Tabelle 7.1: Auswertung der CellIROX™-gefärbten pBECs in ALI-Kultur mit IFN β 1a-Stimulation und HRV16-Infektion

	Versuch I		Versuch II		Versuch III		Versuch IV	
	Bild 1	Bild 2	Bild 1	Bild 2	Bild 1	Bild 2	Bild 1	Bild 2
2 h 10 mM H ₂ O ₂	+++	++	++	++	+++	+++	++	+++
2 h 50 μ g/mL Poly(I:C)	-	++	+	-	+	+	+	+
2 h -IFN β 1a/-HRV	+	-	+	+	+	+	-	+
2 h -IFN β 1a/+HRV	++	-	+++	+	-	++	+++	++
2 h +IFN β 1a/-HRV	++	++	++	+++	++	++	++	++
2 h +IFN β 1a/+HRV	++	++	+	++	-	-	-	++
4 h -IFN β 1a/-HRV	-	+	+	-	+	+	+	-
4 h -IFN β 1a/+HRV	-	++	+	++	+	+++	+++	++
4 h +IFN β 1a/-HRV	+	+	++	+++	++	++	++	++
4 h +IFN β 1a/+HRV	+	-	+++	+++	-	-	+++	+++
8 h -IFN β 1a/-HRV	+	+	-	-	-	++	-	-
8 h -IFN β 1a/+HRV	-	-	++	-	++	++	++	++
8 h +IFN β 1a/-HRV	+++	++	-	++	+++	+	+	++
8 h +IFN β 1a/+HRV	+	+	++	++	+	-	++	++
12 h -IFN β 1a/-HRV	-	-	-	-	+	-	-	+
12 h -IFN β 1a/+HRV	-	-	+++	+++	++	-	+++	+++
12 h +IFN β 1a/-HRV	+++	++	-	-	+	+++	+++	+
12 h +IFN β 1a/+HRV	+	-	+	+	+	-	+	-

+++	Der gesamte Z-Stapel wies eine Fluoreszenz auf
++	Bereiche des Z-Stapels (Patches) wiesen eine Fluoreszenz auf
+	Einzelne Zellen des Z-Stapels wiesen eine Fluoreszenz auf
-	Keine Zelle im Z-Stapel wies eine Fluoreszenz auf

7.2. Lebenslauf

Die Seite 162 (Lebenslauf) enthält persönliche Daten. Aus diesem Grund ist diese nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

7.3. Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden auf den folgenden Konferenzen vorgestellt:

Poster:

Boland, H., Endres, A., Burger-Kentischer, A., Jonigk, D., Braubach, P., Rohde, G. & Bellinghausen, C.: *Protective effect of interferon type I on barrier function of the human airway epithelium during rhinovirus infections in vitro*. 21st Lung Science Conference - European Respiratory Society (2023)

Boland, H., Endres, A., Burger-Kentischer, A., Jonigk, D., Braubach, P., Rohde, G. & Bellinghausen, C.: *Protective effect of interferon type I on barrier function of human airway epithelium during rhinovirus infections in vitro*. Herbsttagung of the German Respiratory Society (DGP) Section Cell Biology, Marburg, Deutschland (2022)

Boland, H., Endres, A., Schwarzbach, H., Burger-Kentischer, A., Jonigk, D., Braubach, P., Rohde, G. & Bellinghausen, C.: *Protective effect of interferon type I on barrier function of human airway epithelium during rhinovirus infections in vitro*. 20th Lung Science Conference - European Respiratory Society (2022) - ePoster

Bellinghausen, C., **Boland, H.**, Ahrends, M., Hesse, C., Wronski, S., Sewald, K., Wacker, M., Rohde, G. & Ashtikar, M.: *Prevention of viral infections by inhalation of type I and type III Interferon nanocapsules in chronic lung disease*. Tag der Immunforschung Fraunhofer Cluster of Excellence Immune Mediated Diseases CIMD, Frankfurt, Deutschland (2019)

Vortrag:

Boland, H., Bellinghausen, C., Ahrends, M., Hesse, C., Wronski, S., Sewald, K., Wacker, M., Rohde, G. & Ashtikar, M.: *Prevention of viral infections by inhalation of type I and type III Interferon nanocapsules in chronic lung disease*. Forschungscluster – Nachwuchsförderung Fraunhofer Cluster of Excellence Immune Mediated Diseases CIMD, Frankfurt, Deutschland (2019)

Weitere Publikationen:

Endres, A., Hügel, C., **Boland, H.**, Hogardt, M., Schubert, R., Jonigk, D., Braubach, P., Rohde, G. & Bellinghausen, C. (2022). *Pseudomonas aeruginosa Affects Airway Epithelial Response and Barrier Function During Rhinovirus Infection*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*

7.4. Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrenden an der Philipps-Universität in Marburg waren in alphabetischer Reihenfolge die Damen und Herren:

Bartsch, Batschauer, Benzler, Bölker, Bolte, Borchers, Brandis-Heep, Brandl, Brändle, Bremer, Buttgereit, Conrad, Elsässer, Essen, Feuser, Greene, Grgic, Grolig, Hassel, Heider, Hempp, Höhenreich, Homberg, Imhof, Jacob, Kahmann, Kinscherf, Kostron, Lill, Lingelbach, Lohöfer, Lohoff, Maier, Mösch, Mühlenhoff, Önel, Pankuweit, Przyborski, Randau, Rathke, Reinkawitz-Pohl, Reis, Renigunata, Rensing, Sandrock, Schallenberg-Rüdinger, Schmeck, Schmidt, Steffens, Stehling, Thanbichler, Timmesfeld, Tups, Zauner

7.5. Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Ralf Kinscherf für seine Unterstützung, seinen Input zu dieser Arbeit, seine Ratschläge und seine stets motivierenden Worte bedanken. Auch möchte ich danke sagen, für die Durchführung einiger Versuche in seinem Labor.

Herrn Prof. Dr. Gernot Rohde danke ich für die Bereitstellung des interessanten und herausfordernden Dissertationsthemas, für die Möglichkeit meine Arbeit in seinem Labor durchführen zu dürfen, für die Bereitstellung der Materialien, seine Unterstützung und seinen stets wertvollen Input zu meiner Arbeit.

Meiner/meinem Zweitgutachter/in möchte ich für die Bewertung dieser Arbeit danken.

Bei Herrn Prof. Dr. Stefan Zeuzem möchte ich mich für die Finanzierung und die Möglichkeit der Durchführung meiner Arbeit im biomedizinischen Forschungslabor der Medizinischen Klinik 1 bedanken.

Mein Dank gebührt auch Frau Prof. Dr. Angela Brieger für Ihre Unterstützung und Organisation.

Bei Frau Dr. Carla Bellinghausen möchte ich mich für ihren Input zu dieser Arbeit, ihre Unterstützung, ihre gute fachliche Anleitung und das Korrekturlesen dieser Thesis bedanken. Danke für Deine Zeit und die Adoption meiner Tomatenpflanzen!

Vielen Dank an Frau Dr. Anke Burger-Kentischer und ihrer Gruppe des Fraunhofer IGB für die Herstellung des hier verwendeten Interferons.

Ich möchte mich bei Frau Prof. Dr. Beate Wilhelm und Frau Christa Merte-Grebe für die Durchführung der Elektronenmikroskopie bedanken. Auch Frau Claudia Keppler möchte ich Danke sagen, für die Durchführung des GSH-Assays. Ein Dankeschön geht ebenfalls an Herrn Hans Schwarzbach, ohne dessen ImageJ Macro die Quantifizierung meiner KLSM-Bilder nicht möglich gewesen wäre. Vielen Dank Euch allen für die zuverlässige und schöne Zusammenarbeit sowie die liebe Aufnahme bei Euch im Institut.

Bei Frau Petra Schön und Herrn Prof. Dr. Ralf Schubert möchte ich mich für die Durchführung der CBA-Assays und für die schöne und unkomplizierte Zusammenarbeit bedanken.

Ein großes Dankeschön geht an Frau Sandra Paßmann. Dafür, dass sie mich ins Labor eingearbeitet hat und immer ein offenes Ohr sowie eine helfende Hand hatte. Mit Dir war die Zusammenarbeit immer schön, Danke!

Ich bedanke mich bei dem gesamten Team des Biomedizinischen Forschungslabors der Klinik 1 für die gute Aufnahme. Im Besonderen möchte ich der ‚Lunch‘-Crew, bestehend aus Dr. Maïke von Harten, Lucia Alcober Boquet, Dr. Adrian Endres und Jan Henrik Klug, danken. Mit Euch war jedes Mittagessen ein Highlight.

Bei Dr. Adrian Endres möchte ich mich zusätzlich für die jahrelange Bürositznachbarschaft, die Literweise Kaffee, die Schoki und seine Hilfe bedanken.

Was hätte ich ohne die After-Work-River-Meetings, Pizza Nights und ohne Gym-Time gemacht? To Dr. Maïke von Harten and Lucia Alcober Boquet: thank you so much!

Auch May-Britt Firnau und Dr. Sandra Beyer möchte ich Danke sagen. Danke fürs Korrekturlesen, eure Unterstützung, für Curry-Abende, für Apple Crumble und einfach euch!

Frau Kerstin Klaus gebührt ein Dankeschön dafür, dass sie die beste Bürositznachbarin ist und immer ein offenes Ohr hat. Deine IT-Problemchen waren mir immer die Liebsten!

Ein riesiges Dankeschön geht auch an Dr. Laura Meyer und Dr. Franziska Nadler, fürs Korrekturlesen, für Kaffee und für die wunderschöne gemeinsame Zeit in Marburg und Frankfurt.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie und meinen Freunden Danken. Allen voran meinen Eltern und Maxi, danke für eure unendliche Unterstützung!

7.6. Ehrenwörtliche Erklärung

„Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

„Protektiver Effekt von Interferon Typ I auf die Barrierefunktion des humanen Atemwegsepithels während einer Rhinovirus-Infektion“

im Institut für Anatomie und Zellbiologie, der Abteilung Medizinische Zellbiologie unter Leitung von Prof. Dr. Ralf Kinscherf mit Unterstützung durch Prof. Dr. Gernot Rohde ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ich versichere, dass ich sämtliche wörtlichen oder sinngemäßen Übernahmen und Zitate kenntlich gemacht habe.

Mit dem Einsatz von Software zur Erkennung von Plagiaten bin ich einverstanden.

Ort, Datum, **Helena Boland**

„Die Hinweise zur Erkennung von Plagiaten habe ich zur Kenntnis genommen.“

Ort, Datum, **Prof. Dr. Ralf Kinscherf**

Ort, Datum, **Prof. Dr. Gernot Rohde**