

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

betreut am  
Zentrum der Inneren Medizin  
Medizinische Klinik I (Gastroenterologie, Hepatologie, Pneumologie,  
Allergologie, Ernährungsmedizin, Endokrinologie, Diabetologie)  
Direktor: Prof. Dr. Stefan Zeuzem

***Pseudomonas aeruginosa* moduliert die inflammatorische Antwort des  
Atemwegsepithels auf Rhinovirus-Infektionen**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

vorgelegt von  
Adrian Endres

aus Aschaffenburg

Frankfurt am Main, 2020

Dekan: Prof. Dr. Stefan Zeuzem

Referent: Prof. Dr. Gernot Rohde

Korreferent: Prof. Dr. Ralf Schubert

Tag der mündlichen Prüfung: 31.08.2020

**Meiner Familie**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>8</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>10</b>
<b>Tabellenübersicht</b> .....	<b>11</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>12</b>
<b>1.1 Definition und Beschreibungsgeschichte der Mukoviszidose</b> .....	<b>12</b>
<b>1.2 Epidemiologie</b> .....	<b>13</b>
<b>1.3 Ätiologie und Pathogenese</b> .....	<b>14</b>
1.3.1 <i>cftr</i> -Gen und CFTR-Protein.....	14
1.3.2 Aufbau und Funktion des CFTR .....	14
1.3.3 Mutationsklassen .....	16
<b>1.4 Die CF-Lungenerkrankung</b> .....	<b>16</b>
1.4.1 Allgemein .....	16
1.4.2 Mukoziliäre Clearance .....	17
1.4.3 Bakterien in der CF-Lunge.....	18
1.4.4 <i>P. aeruginosa</i> in der CF-Lungenerkrankung.....	19
1.4.5 Virale Atemwegsinfektionen in der CF-Lungenerkrankung.....	24
1.4.6 Inflammation und Hypoxie .....	25
<b>1.5 Coinfektionen in der Lunge</b> .....	<b>28</b>
<b>1.6 Fragestellung</b> .....	<b>34</b>
<b>2 Material</b> .....	<b>35</b>
<b>2.1 Reagenzien und Verbrauchsmaterial</b> .....	<b>35</b>
<b>2.2 Kits</b> .....	<b>37</b>
<b>2.3 Zellkulturmedien</b> .....	<b>38</b>
<b>2.4 Zubereitete Reagenzien</b> .....	<b>40</b>
<b>2.5 Software</b> .....	<b>41</b>
<b>2.6 Geräte</b> .....	<b>41</b>
<b>2.7 PCR Assays</b> .....	<b>42</b>
<b>2.8 Primäre Zellen</b> .....	<b>44</b>
<b>2.9 Bakterien, Viren und Zelllinie</b> .....	<b>45</b>
<b>3 Methoden</b> .....	<b>45</b>
<b>3.1 Zellkultur</b> .....	<b>45</b>
3.1.1 Beschichtung Zellkulturflaschen und Transwell®-Inserts .....	45
3.1.2 Isolation und Anzucht primärer bronchialer Epithelialzellen (pBECs).....	46

3.1.3	Ablösen pBECs und Zellzählung .....	47
3.1.4	Einfrieren pBECs .....	47
3.1.5	Immunhistochemische Charakterisierung pBECs.....	48
3.1.6	Kultur und Differenzierung pBECs .....	49
3.1.7	Messung des transepithelialen Widerstandes .....	51
3.1.8	Verifizierung der Mukusbildung mittels Dotblot.....	52
3.1.9	Bestimmung der Zellzahl im Transwell-Insert .....	52
<b>3.2</b>	<b>Bakterien</b> .....	<b>53</b>
3.2.1	Anzucht auf Blutagar.....	53
3.2.2	Vervielfältigung und Lagerung der Bakterien.....	53
3.2.3	Einstellung der Bakterienkonzentration .....	53
<b>3.3</b>	<b>Viren</b> .....	<b>54</b>
3.3.1	Anzucht der Rhinoviren.....	54
3.3.2	Bestimmung des Virus-Titers .....	55
<b>3.4</b>	<b>Bakteriell-virale Coinfektionen</b> .....	<b>55</b>
<b>3.5</b>	<b>Mischexperimente mit rekombinantem Interleukin-6</b> .....	<b>57</b>
<b>3.6</b>	<b>Auswertung</b> .....	<b>58</b>
3.6.1	Messung der Zytokinkonzentrationen mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay .....	58
3.6.2	Messung der Zytokinkonzentrationen mittels Cytometric Bead Array ....	59
3.6.3	RNA-Isolation.....	60
3.6.4	cDNA Synthese.....	60
3.6.5	Quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion .....	61
3.6.6	Messung der Interleukinkonzentration und Interferonexpression .....	62
3.6.7	Viruslastbestimmung.....	62
<b>3.7</b>	<b>Statistik</b> .....	<b>62</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>64</b>
<b>4.1</b>	<b>Charakterisierung der pBECs</b> .....	<b>64</b>
<b>4.2</b>	<b>Verifizierung der Differenzierung der pBECs in Air-Liquid-Interface Zellkulturen</b> .....	<b>65</b>
4.2.1	Mikroskopisch-visuelle Verifizierung der zilientragenden Zellen und Zilienbewegungen.....	65
4.2.2	Nachweis mukus-produzierender Becherzellen.....	66
4.2.3	Ergebnisse der Messung des transepithelialen Widerstandes .....	66
<b>4.3</b>	<b>Histologische Beurteilung Infektionsexperimente</b> .....	<b>67</b>

<b>4.4</b>	<b>Viruslast</b> .....	<b>69</b>
<b>4.5</b>	<b>Ergebnisse der Zytokinmessungen mittels Cytometric Bead Array</b> .....	<b>71</b>
4.5.1	Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ).....	71
4.5.2	Interleukin-6 (IL-6).....	72
4.5.3	Tumornekrosefaktor $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ).....	73
4.5.4	Transforming growth factor $\beta$ (TGF- $\beta$ ) .....	74
4.5.5	C-X-C motif chemokine 10 .....	75
4.5.6	IL-10 und IFN- $\gamma$ .....	75
4.5.7	C-X-C motif chemokine 8 (IL-8) .....	76
<b>4.6</b>	<b>Ergebnisse der Zytokinmessungen mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay</b> .....	<b>76</b>
4.6.1	Interleukin-8 Konzentration .....	77
4.6.2	Interleukin-6 Konzentration .....	79
<b>4.7</b>	<b>mRNA-Expression der Schlüsselzytokine</b> .....	<b>80</b>
4.7.1	IL-1 $\beta$ mRNA Expression .....	80
4.7.2	IL-6 mRNA Expression .....	81
4.7.3	IL-8 mRNA Expression .....	82
4.7.4	Bestimmung der mRNA-Expression von Interferon (IFN)- $\beta$ und IFN- $\lambda$ 1 .	84
4.7.5	Bestimmung der mRNA-Expression der Interferon-stimulierten Gene ISG15, MX1, RSAD2 und OASL.....	86
<b>4.8</b>	<b>Mischexperimente</b> .....	<b>88</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>90</b>
5.1	Diskussion der Methoden .....	90
5.2	Viruslast und Interferonantwort.....	93
5.3	Interleukin-1 $\beta$ .....	96
5.4	Interleukin-8.....	98
5.5	Interleukin-6.....	99
5.6	Fazit .....	103
5.7	Ausblick und klinische Konsequenzen.....	104
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>106</b>
<b>7</b>	<b>Abstract</b> .....	<b>108</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>109</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>124</b>

<b>10 Lebenslauf .....</b>	<b>125</b>
<b>11 Schriftliche Erklärung.....</b>	<b>127</b>

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
ABC	ATP-binding-cassette
aGM1	asialo ganglioside 1
AHL	N-Acyl homoserine lactone
Akt	Proteinkinase B
ASL	airway surface liquid
ATP	Adenosintriphosphat
BAL	broncho-alveoläre Lavage
BSA	Bovines Serumalbumin
C5a	Komplementfaktor C5, Untereinheit a
CBA	Cytometric Bead Array
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	complementary DNA
CF	Zystische Fibrose, Mukoviszidose
cftr	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DHA	Docosahexaensäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay
ENaC	epithelialer Natriumkanal
FCS	Fötale Kälberserum
FEV <sub>1</sub>	Einsekundenkapazität (Forced Expiratory Volume in 1 second)
GAC	global activator of antibiotic and cyanide synthesis
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
HCN	Blausäure
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HRP	Meerrettichperoxidase
HRV-16	Humanes Rhinovirus 16
HRV-1B	Humanes Rhinovirus 1B
ICAM-1	Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül 1
IL-10	Interleukin 10
IL-17	Interleukin 17
IL-18	Interleukin 18
IL-1R	Interleukin-1 Rezeptor
IL-1 $\alpha$	Interleukin 1 alpha
IL-1 $\beta$	Interleukin 1 beta
IL-22	Interleukin 22



IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
IRF3	Interferon regulatory factor 3
ISG	Interferon stimulierte Gene
KSFM	keratinocyte serum-free medium
LasA	staphylolytic protease
LasB	pseudolysine, elastase B
LTB4	Leukotrien B4
Mbp	Mega-Basenpaare
MMP-8	Matrix-Metalloproteinase-8
MMP-9	Matrix-Metalloproteinase-9
MOI	Multiplizität der Infektion
mRNA	messenger RNA, Boten-RNA
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
NBD	nucleotide-binding domain
NF- $\kappa$ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
OD600	Optische Dichte bei 600 nm
PAFR	platelet-activating factor receptor
pBECs	primäre bronchiale Epithelialzellen
PBS	phosphate buffered saline
PCL	periciliary liquid
PKA	Proteinkinase A
PQS	pseudomonas quinolone signal
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
QS	Quorum-sensing
rcf	Relative Zentrifugalbeschleunigung
RNA	Ribonucleinsäure
RSV	Respiratory-Syncytial-Virus
RvD1	Resolvin D1
SBTI	soybean trypsin inhibitor
SPLUNC 1	short palate, lung, and nasal epithelial clone 1
SPM	specialized proresolving mediators
sRNA	Kleine regulatorische RNA
STGG	skim milk, tryptone, glucose, glycerol
T3SS	Typ III Sekretionssystem
TBS	Tris-buffered saline
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor beta
TLR3	toll-like receptor 3
TLR5	toll-like receptor 5
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha

## **Abbildungsverzeichnis**

<b>Abbildung 1: Entwicklung des medianen Überlebens der Kohorte des kanadischen CF-Registers 1990-2012.....</b>	<b>14</b>
<b>Abbildung 2: Prävalenz respiratorischer Mikroorganismen nach Alterskohorte.....</b>	<b>18</b>
<b>Abbildung 3: Differenzierung pBECs in ALI .....</b>	<b>50</b>
<b>Abbildung 4: Zeitlicher Ablauf der Infektionsexperimente.....</b>	<b>57</b>
<b>Abbildung 5: Charakterisierung primärer bronchialer Epithelialzellen.....</b>	<b>64</b>
<b>Abbildung 6: Längsschnitt einer differenzierten ALI-Zellkultur.....</b>	<b>65</b>
<b>Abbildung 7: QR-Code: Videomaterial von differenzierten pBECs in Air-Liquid-Interface-Zellkultur.....</b>	<b>65</b>
<b>Abbildung 8: Dotblot Mucin5AC .....</b>	<b>66</b>
<b>Abbildung 9: Zunahme des transepithelialen elektrischen Widerstandes über die Zeit.....</b>	<b>67</b>
<b>Abbildung 10: Histologische Beurteilung der Infektionsexperimente .....</b>	<b>68</b>
<b>Abbildung 11: Viruslast Infektionsexperimente .....</b>	<b>70</b>
<b>Abbildung 12: IL-1<math>\beta</math> Konzentration .....</b>	<b>71</b>
<b>Abbildung 13: IL-6 Konzentration .....</b>	<b>72</b>
<b>Abbildung 14: TNF-<math>\alpha</math> Konzentration .....</b>	<b>73</b>
<b>Abbildung 15: TGF-<math>\beta</math> Konzentration .....</b>	<b>74</b>
<b>Abbildung 16: CXCL-10 Konzentration .....</b>	<b>75</b>
<b>Abbildung 17: IL-8 Konzentration .....</b>	<b>76</b>
<b>Abbildung 18: IL-8 Konzentration (Elisa) .....</b>	<b>78</b>
<b>Abbildung 19: IL-6 Konzentration (Elisa) .....</b>	<b>79</b>
<b>Abbildung 20: IL-1<math>\beta</math> mRNA-Expression.....</b>	<b>81</b>
<b>Abbildung 21: IL-6 mRNA-Expression.....</b>	<b>82</b>
<b>Abbildung 22: IL-8 mRNA-Expression.....</b>	<b>83</b>
<b>Abbildung 23: Interferon mRNA-Expression .....</b>	<b>85</b>
<b>Abbildung 24: ISGs mRNA Expression .....</b>	<b>87</b>
<b>Abbildung 25: Ergebnisse Mischexperimente .....</b>	<b>89</b>

## **Tabellenübersicht**

<b>Tabelle 1: Antikörper zur immunhistochemischen Charakterisierung</b>	
<b>pBECs .....</b>	<b>48</b>
<b>Tabelle 2: Abkürzungen Infektionsbedingungen .....</b>	<b>67</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Definition und Beschreibungsgeschichte der Mukoviszidose

Mukoviszidose (Zystische Fibrose, engl. *cystic fibrosis*, CF) ist die häufigste lebensverkürzende autosomal-rezessiv vererbte Multisystemerkrankung in der kaukasischen Bevölkerung.<sup>1</sup> Mutationen im Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Gen (*cftr*) führen zu einem defekten CFTR-Protein. Dieses Protein ist ein Transmembranprotein und dient hauptsächlich als Chloridkanal. Bei CF kommt es durch diesen Defekt zu einer abnormalen Ionen-Zusammensetzung und konsekutiv einer veränderten Sekretzusammensetzung am sekretorischen Epithel exokriner Drüsen verschiedener Organe. Von großer klinischer Bedeutung sind insbesondere die hierdurch verursachte Lungenerkrankung und exokrine Pankreasinsuffizienz.

Einzelne Symptome der Erkrankung wurden bereits früh erkannt. Volkstümliche Sprichwörter beschrieben bereits vor Jahrhunderten die frühe Sterblichkeit bei Neugeborenen „deren Stirn beim Kuss salzig schmecke“.<sup>2,3</sup> Die diesem Symptom zugrunde liegende, veränderte Ionenkonzentration der Haut wurde 1959 zur Entwicklung des Pilocarpin-Iontophorese-Schweißtestes genutzt, welcher bis heute der Diagnosestellung dient.<sup>4-6</sup>

Ein weiteres typisches klinisches Symptom, der Mekoniumileus, wurde durch Karl Landsteiner 1905 erstbeschrieben.<sup>3,7</sup>

Die Zusammenführung der pathologischen Veränderungen der Lunge und des Pankreas erfolgte 1936 durch Guido Fanconi.<sup>8</sup> Zwei Jahre später differenzierte Dorothy Anderson die Erkrankung von der Zöliakie und beschrieb die namensgebenden zystisch-fibrotischen Veränderungen des Pankreas.<sup>9</sup> Der vor allem im deutschsprachigen Raum verbreitete Begriff der Mukoviszidose geht zurück auf Sidney Farber und beschreibt den dickflüssigen, zähen Schleim der exokrinen Drüsen.

Die Aufklärung der Krankheitsursache gelang erst Jahrzehnte später: 1983 konnte Paul Quinton an Schweißdrüsenausführungsgängen von CF-Patienten eine verringerte Chloridpermeabilität und in Folge gehemmte Reabsorption von Natriumchlorid nachweisen.<sup>10</sup> Die genetische Ursache konnte 1985 durch Robert Knowlton mittels Genkopplungsanalysen auf Chromosom 7 lokalisiert werden.<sup>11</sup>

1989 gelang die Entdeckung des *cftr*-Genes mittels positioneller Klonierung durch die Arbeitsgruppen von Lap-Chee Tsui, John Riordan und Francis Collins.<sup>3,12-15</sup>

## 1.2 Epidemiologie

Weltweit sind über 70000 Patienten von CF betroffen.<sup>16</sup> In Deutschland beträgt die Inzidenz bei Neugeborenen 1:3300 bis 1:4800, die Prävalenz 0,829 pro 10000 und somit liegt die Patientenzahl in Deutschland zwischen 6000-7000. Die Heterozygotenfrequenz liegt bei 4%; jeder 25. Mensch in Deutschland ist somit Anlageträger für CF.<sup>1,17</sup> CF erfüllt die Bedingungen der Europäischen Union für seltene Erkrankungen (Prävalenz kleiner als 1:2000).<sup>18</sup>

Es bestehen im Auftreten der Erkrankung jedoch große regionale Unterschiede, so liegt die Inzidenz unter Südafrikanern (afrikanischer Abstammung) bei etwa 1:7000, in den Vereinigten Arabischen Emiraten etwa 1:16000 und in asiatischen Ländern noch deutlich niedriger, in Japan beispielweise nur 1:350000.<sup>19-21</sup>

Aufgrund früher Diagnosestellung und verbesserten Therapien stieg die Lebenserwartung der CF-Patienten deutlich an (Abbildung 1). Erreichten bei Einführung der ersten Patientenregister in den 1960er Jahren nur wenige Patienten das Grundschulalter, liegt die voraussichtliche Lebenserwartung eines heute im Vereinigten Königreich geborenen Patienten bei 47 Jahren.<sup>22</sup> Dies führt zu einem Wandel der Altersstruktur: 2019 waren bereits mehr als die Hälfte der CF-Patienten in Deutschland über 18 Jahre alt.<sup>1</sup> Die Patienten können aufgrund verbesserter Therapieoptionen am gesellschaftlichen Leben partizipieren; in der Kohorte des Patientenregisters der US-amerikanischen Cystic Fibrosis Foundation waren 2017 knapp 70% der Erwachsenen in einem Arbeitsverhältnis oder studierten, fast 40% erzielten einen höheren Bildungsabschluss und über 40% waren verheiratet.<sup>23</sup>

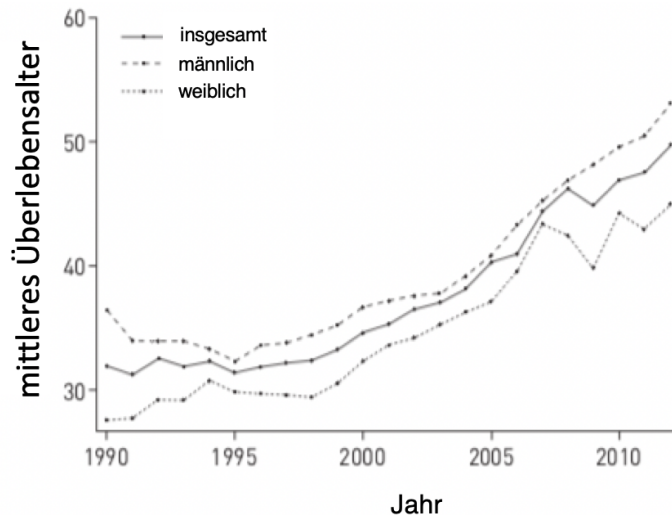


Abbildung 1: Entwicklung des medianen Überlebens der Kohorte des kanadischen CF-Registers 1990-2012<sup>24</sup>

### 1.3 Ätiologie und Pathogenese

#### 1.3.1 *cftr*-Gen und CFTR-Protein

CF ist eine monogenetische, autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung. Ursächlich sind verschiedene Mutationen im Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)-Gen. Dieses ist auf dem langen Arm von Chromosom 7 lokalisiert (7q31.2). Die genomische Sequenz umfasst ca. 230 kbp und besteht aus 27 Exons, welche für das 1480 Aminosäuren große CFTR-Protein codieren.<sup>25-27</sup> Es sind bereits über 2000 unterschiedliche Sequenzvariationen beschrieben, von denen mindestens 200 krankheitsauslösend sind.<sup>28</sup>

#### 1.3.2 Aufbau und Funktion des CFTR

Das CFTR-Protein gehört zu den ATP-binding cassette (ABC)-Transportern, einer Superfamilie integraler Membranproteine deren gemeinsames Merkmal zwei Nukleotid-bindende Domänen (*nucleotide-binding domains*, NBDs) sind, die eine ATP-Hydrolyse katalysieren. Unter den ABC-Transportern stellt der CFTR jedoch in funktioneller Hinsicht eine Besonderheit dar. Während andere ABC-Transporter die chemische Energie der ATP-Hydrolyse nutzen um Substrate gegen deren elektro-chemischen Gradienten zu transportieren, leitet der CFTR

Anionen ausschließlich entlang des Gradienten und stellt somit einen Ionenkanal dar. Der CFTR ist lokalisiert an der apikalen Seite von Epithelzellen. Der Protonengradient für Chlorid sorgt bei Öffnung des Kanals für einen Ausstrom von Chlorid-Ionen aus dem Zellinneren in das extrazelluläre Milieu. Die hierdurch verursachte Ladungsdifferenz hat einen Ausstrom von Natrium (in die gleiche Richtung) zur Folge und das resultierende osmotische Ungleichgewicht führt zu einem Ausfluss von Wasser in den extrazellulären Raum.<sup>29</sup> Durch Ausfall oder Verringerung des CFTR-Chloridstroms, beispielsweise aufgrund einer Mutation des *cftr*, kommt es zu einer Zunahme der Viskosität des sekretorischen Materials. Dies wird durch eine CF-bedingte Überaktivität des Natriumkanals ENaC (epithelial- $\text{Na}^+$ - channel) noch verstärkt. Dieser absorbiert Natrium aus dem Extrazellulärraum und sorgt somit am CF-Atemwegsepithel für eine weitere Austrocknung der Atemwegsoberflächenflüssigkeit (Airway Surface Liquid, ASL).<sup>30,31</sup>

Die genaue Ursache für die Überaktivität des ENaC ist nicht endgültig geklärt. Ein direkter Einfluss der CFTR-Dysfunktion wird diskutiert, hat sich aber nicht in allen experimentellen Modellen bestätigt. Endogene Serinproteasen, welche sich im CF-Atemwegsepithel vermehrt findet, können durch Spaltung zu einer Aktivierung des Kanals führen.<sup>32</sup>

Eine weitere wichtige Funktion erfüllt der CFTR in der Bicarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ )-Sekretion, zum einen aufgrund eines direkten Transportes durch den Kanal selbst, als auch über die Stimulation eines  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers.<sup>33,34</sup> Am Atemwegsepithel von CF-Patienten führt die verringerte Bicarbonatsekretion zu einer Reduktion des pH-Wertes des ASL, was für die Wirkung verschiedener antimikrobieller Faktoren eine ungünstige Bedingung darstellt.

Der niedrigere pH-Wert führt zudem zu einem Funktionsverlust von SPLUNC1 (short palate lung and nasal epithelial clone 1) – ein Sekretionsprotein, welches durch Bindung an ENaC dessen aktivierende Spaltung durch Proteasen verhindert. Dies sorgt für eine weitere Dehydratation des ASL.<sup>35</sup>

Es wurde zudem gezeigt, dass eine verringerte Bicarbonatkonzentration zu einer verstärkten Bindung des Mukus an Epithelien führen kann.<sup>36,37</sup>

### 1.3.3 Mutationsklassen

Die krankheitsbedingenden Mutationen werden in sechs verschiedene Klassen unterteilt:

Klasse I-Mutationen führen zu einem vollständigen Fehlen des CFTR-Proteins da die Proteinbiosynthese aufgrund einer „*nonsense*“- , „*frameshift*“- oder „*splicing*“-Mutation gestört ist. <sup>26,28,38,39</sup>

Klasse II-Mutationen haben eine gestörte Proteinverarbeitung zur Folge. So führt beispielsweise bei der häufigsten CFTR-Mutation überhaupt, der F508del, eine Deletion dreier Nukleotide zu einem Fehlen der Aminosäure Phenylalanin auf Position 508 des CFTR-Proteins. Es kommt hierdurch zu einer fehlerhaften Faltung mit einer topographischen Änderung des Proteins. Dies wird durch Qualitätskontrollmechanismen im Endoplasmatischen Retikulum erkannt und führt konsekutiv zur Ubiquitinierung und anschließenden Degradierung durch das Proteasom. <sup>26,28,38,39</sup>

Bei Klasse III-Mutationen kommt es bei einer normalen Proteinbiosynthese und korrektem Einbau in die Zellmembran zu einer Funktionsstörung des CFTR. Zwar ist die Pore des Ionenkanals selbst intakt, jedoch ist das Öffnen nach Bindung von Adenosintriphosphat (ATP) beeinträchtigt. <sup>26,28,38,39</sup>

Klasse IV-Mutationen führen zu einer Funktionsstörung des Ionenkanals durch Behinderung der Leitung der Ionen durch die Kanalpore aufgrund gestörter Ionen-Ionen-Interaktion innerhalb der Pore. <sup>26,28,38,39</sup>

Klasse V-Mutationen führen dazu, dass die Proteine eine normale Funktion haben, jedoch in geringerer Anzahl in der Zellmembran vorhanden sind. <sup>26,28,38,39</sup>

Klasse VI-Mutationen verringern die Stabilität des Proteins in der Plasmamembran, was dessen frühzeitigen Abbau hervorruft. <sup>26,28,38,39</sup>

## 1.4 Die CF-Lungenerkrankung

### 1.4.1 Allgemein

Da der CFTR-Kanal in epithelialen Zellen verschiedener Organe vorkommt, führt ein Ausfall oder eine Funktionseinschränkung zu einer Multisystemerkrankung.



Pulmonale Infektionen stehen im Zentrum dieser Arbeit, daher werden extrapulmonale Manifestationen im Folgenden nicht dargestellt.

Die CF-Lungenerkrankung ist der Hauptgrund für die hohe Morbidität und Mortalität der CF-Patienten.<sup>40</sup> Sie ist geprägt von chronischen Infektionen, einer Unfähigkeit diese erfolgreich zu bekämpfen, sowie einer andauernden Inflammation und progressiven Destruktion des Lungengewebes.

Klinische Symptome sind ein chronischer, produktiver Husten, Keuchen, Kurzatmigkeit und progrediente Verminderung der Lungenfunktion. Oftmals wechseln sich Phasen relativ gleichbleibender Symptomschwere ab mit akuten Verschlechterungen, sogenannten Exazerbationen. Im Verlauf kommt es zu schweren strukturellen Lungenveränderungen mit Ausbildung von Bronchiektasien.

Im Folgenden sollen die wichtigsten Mechanismen beschrieben werden, die zur CF-Lungenerkrankung beitragen.

#### **1.4.2 Mukoziliäre Clearance**

Der Ausfall des CFTR führt über eine verringerte Cl<sup>-</sup>- Sekretion und erhöhte Na<sup>+</sup>- Absorption zu einem Volumenverlust des ASL.

Der ASL besteht aus einer dünnflüssigen periziliären Flüssigkeitsschicht (*periciliary liquid*, PCL), die etwa die gleiche Höhe wie die Zilien der Epithelzellen hat, sowie einer darüber liegenden dickflüssigeren Mukusschicht.

In gesunden Lungen werden bakterielle Pathogene innerhalb weniger Stunden mittels mukoziliärer Clearance entfernt. Mukoziliäre Clearance beschreibt den Selbstreinigungsmechanismus der Bronchien: das zilientragende respiratorische Epithel von den Bronchioli terminales bis zu den Hauptbronchien transportiert durch koordinierte Bewegungen innerhalb des PCL die darüber liegende Mukusschicht mit den darin befindlichen Pathogenen oralwärts, wo diese abgehustet oder verschluckt werden.

Hierfür ist es jedoch notwendig, dass die PCL eine optimale Höhe von etwa 7 µm aufweist und die Viskosität einen effektiven Zilienschlag ermöglicht. Bei Lungengesunden dient die Mukusschicht als eine Art Flüssigkeitsreservoir, mit dessen Hilfe das Volumen der PCL in engen Grenzen reguliert wird. Bei CF ist diese Volumenregulation gestört, durch den Volumenverlust kommt es zur

Verminderung des Mukustransportes. Die Zilien können sich nicht mehr entfalten und die Mukusschicht kommt in Kontakt mit der Glycocalyx, wodurch es zu adhäsiven Interaktionen kommt.

Da der Mukusfluss eine turbulente Strömung darstellt, können inhalierte Pathogene eingefangen und zum Abtransport gefangen gehalten werden. Diese Turbulenzen in der Mukusschicht verschwinden, wenn der horizontale Transport zum Erliegen kommt. Dies ist eine der Ursachen für die schlechte Pathogenabwehr in der CF-Lunge.<sup>41-43</sup>

### 1.4.3 Bakterien in der CF-Lunge

Es spricht zwar vieles dafür, dass zumindest ein Teil der Inflammation in der CF-Lunge infektionsunabhängig ist. Lungen von CF-Patienten zeigen zwar unmittelbar nach der Geburt kaum Anzeichen einer Entzündung, aber es sind bereits erste strukturelle Änderungen nachweisbar.<sup>43-46</sup>

Sicher ist jedoch, dass die Lungen von CF-Patienten bereits oft im Säuglingsalter und der frühen Kindheit mit Mikroorganismen besiedelt und infiziert werden.

Das Erregerspektrum im frühen Kindesalter umfasst vor allem *Staphylococcus aureus*, der bereits in den ersten sechs Lebensmonaten in 30% der Patienten nachgewiesen werden kann, und *Haemophilus influenzae*.<sup>47</sup>

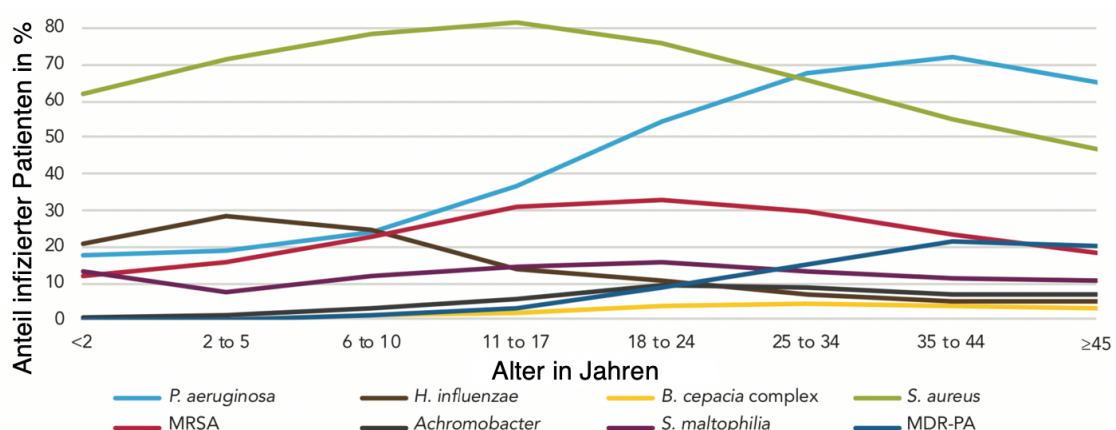


Abbildung 2: Prävalenz respiratorischer Mikroorganismen nach Alterskohorte<sup>48</sup>

Im Verlauf der CF-Lungenerkrankung kommt es mit zunehmendem Alter regelhaft zu einer chronischen Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa*

(Abbildung 2). Dies ist ein Schlüsselmoment im Krankheitsverlauf, denn dies geht mit einer progressiven Verschlechterung der Lungenfunktion und einer verkürzten Lebenserwartung einher.

Die Infektionen mit *P. aeruginosa* sollen in dieser Arbeit im nächsten Kapitel im Detail betrachtet werden.

Weitere häufige, in späteren Stadien der Lungenerkrankung relevante Bakterien sind *Burkholderia cepacia*, nicht-tuberkulöse Mykobakterien, *Achromobacter xylosoxidans* und *Stenotrophomonas maltophilia*.

Die Entwicklung neuer diagnostischer Methoden, die DNA-basiert funktionieren und damit kulturunabhängig sind, öffnete den Blick auf eine Reihe weiterer Bakterien, die permanent die Atemwege von CF-Patienten kolonisieren.<sup>49</sup> Diese gehören vor allem den Gattungen *Streptococcus*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Rothia*, *Granulicatella*, *Gemella* und *Fusobacterium* an und stellen das Kernmikrobiom. Dieses ist im Krankheitsverlauf Veränderungen unterworfen. Jüngere, gesündere Patienten zeigen ein diverseres bakterielles Mikrobiom und eine geringere Dominanz potentiell pathogener Bakterien. Im Laufe der Lungenerkrankung werden die Bakterien des Kernmikrobioms jedoch in zunehmendem Maße durch CF-Pathogene wie *P. aeruginosa* verdrängt. Es konnte gezeigt werden, dass die Abnahme der Mikrobiomdiversität mit einer Zunahme der Inflammation in den Atemwegen und mit einer Verschlechterung der Lungenfunktion der Patienten korreliert.<sup>48,50</sup>

Das Zusammenspiel der einzelnen Bakterien ist komplex und unzureichend erforscht. Einige Arten zeigten jedoch einen protektiven Effekt gegen Pseudomonasinfektionen.<sup>51,52</sup>

#### **1.4.4 *P. aeruginosa* in der CF-Lungenerkrankung**

*Pseudomonas aeruginosa* ist ein gramnegatives Stäbchenbakterium aus der Gattung *Pseudomonas*. Der Gattungsname ist eine Zusammensetzung der altgriechischen Wörter „ψεῦδος“ (= Täuschung) und „μονᾶς“ (= Einheit) und geht auf den Erstbeschreiber Walter Migula zurück. Der Artnamen „aeruginosa“ ist abgeleitet vom lateinischen „aerugo“ (= Grünspan) und beschreibt treffend die

grünliche Farbe, welche die Art bei Anzucht aufgrund Ihrer Virulenzfaktoren Pyoverdin und Pyocyanin zeigt.<sup>53</sup>

Es kommt in der Natur beinahe ubiquitär vor, tritt aber gehäuft an Orten mit menschlicher Aktivität auf und kann beispielsweise auch Teil der normalen Darmflora sein.<sup>54</sup>

*P. aeruginosa* ist ein opportunistischer Erreger, bei Gesunden führt er zunächst nicht zu Infektionen. Ein großes Problem stellt der Erreger jedoch für immunkompromittierte Patienten dar; er ist zudem für viele nosokomiale Infektionen verantwortlich. So spielt er neben seiner zentralen Rolle in der CF-Lungenerkrankung eine ebenfalls wichtige Rolle bei nosokomialen Pneumonien, insbesondere bei beatmeten Patienten (Ventilator-assoziierte Pneumonien) und nosokomialen Harnwegsinfekten. Bei vorgeschädigter Cornea kann er zu einer ulzerativen Keratitis führen.<sup>55</sup>

Da es bei Verbrennungen der Haut zu einer Schädigung der epithelialen Schutzmechanismen kommt, kann *P.aeruginosa* hier zu schwerwiegenden Infektionen führen und hat einen erheblichen Anteil an der septischen Mortalität bei Verbrannten.<sup>56</sup>

In CF hat die chronische Lungeninfektion mit *P. aeruginosa* einen großen Anteil an der Verschlechterung der Lungenfunktion im Verlauf der Erkrankung und damit verbundenen erhöhten Morbidität und Mortalität der Patienten.

*P. aeruginosa* kann aufgrund verschiedener bakterieller Adaptionenmechanismen eine Persistenz in der CF-Lunge erreichen. Zu diesen Mechanismen zählen Biofilmbildung, Ausbildung von Antibiotikaresistenzen und die Fähigkeit seine zahlreichen Virulenzfaktoren und seinen Metabolismus dem jeweiligen Infektionsstadium anzupassen.

Während der Initiation der Infektion sorgt ein einzelnes Flagellum für Motilität, eine Vielzahl an Pili ermöglicht ein Anheften an respiratorische Epithelialzellen.<sup>57</sup> Sekretorische Virulenzfaktoren werden mittels spezialisierten Exportsystemen transportiert, welche aus Sekretionsapparat, Translokationsapparat und sekretierten Proteinen bestehen.

Das Typ III Sekretionsystem (T3SS) ist beispielsweise assoziiert mit akuten, invasiven Infektionen. Die Effektorproteine des Typ III Systems können

Surfactant inaktivieren, in Epithelialzellen Zelltodmechanismen auslösen und durch Zerstörung der Tight-junctions die epitheliale Barrierefunktion stören und Wundheilungsprozesse verhindern.<sup>58</sup>

Während das T3SS in aus der Umwelt und aus in frühen Infektionsphasen isolierten Bakterienstämmen in bis zu 90% der Stämme aktiv ist, sekretieren nur 4% der Stämme aus chronischen CF-Lungeninfektionen diese Proteine.<sup>59</sup>

Zentral für den Erfolg von *P. aeruginosa* ist, dass sowohl die Ausbildung der Virulenzfaktoren, als auch die Änderung des Metabolismus und des Wachstumsverhaltens von einer großen Flexibilität gekennzeichnet ist.

Diese Anpassungsfähigkeit hat ihre Ursache in einem fein abgestimmten regulatorischen System und einer großen genetischen Variabilität. Zum einen wird die Variabilität durch das für Bakterien sehr große Genom von 6,3 Mbp verursacht.

Außerdem führen Defekte in DNA-Reparatursystemen zum Auftreten von *P. aeruginosa*- Stämmen, die deutlich erhöhte Mutationsraten aufweisen, sogenannten Hypermutanten. Diese erhöhten Mutationsraten sorgen zusätzlich für eine rasche Anpassung an die unterschiedlichen Bedingungen, die zum einen in verschiedenen Bereichen einer Lunge vorkommen und sich zum anderen im Verlauf der Lungenerkrankung verändern.<sup>60,61</sup>

Im Folgenden soll ein kurzer Einblick in die bakteriellen Regulationssysteme gegeben werden, insbesondere im Hinblick auf die Anpassung von *P. aeruginosa* an die Umgebung in der CF-Lunge.

Quorum-sensing (QS), die interzelluläre, chemische Kommunikationsform von Bakterien, ist bei *P. aeruginosa* ausgeprägt und reguliert Zielgene in Abhängigkeit der Zelldichte der Bakterien, welche vorrangig mittels kleinen, diffundierbaren Molekülen, sogenannten „Autoinducern“ durch die Bakterien gemessen werden kann.

N-Acyl-homoserine lactone (AHLs) sind die bekanntesten dieser Signalmoleküle und zwei AHL-Systeme sind in *P. aeruginosa* an der Regulation beteiligt: das Las und das Rhl-System.

N-3-oxo-dodecanoyl homoserine lactone wird durch die LasI-Synthase produziert und durch den Transkriptionsregulator LasR erkannt. Dieser kontrolliert unter

anderem die Proteasen LasA, LasB und Alkalische Protease sowie das Exotoxin A – Virulenzfaktoren die insbesondere in akuten Infektionen relevant und direkte zellschädigende Wirkung haben. <sup>62,63</sup>

Im Rhl-System produziert die RhlI-Synthase N-butanoyl homoserine lactone, welches durch den Transkriptionsregulator RhlR wahrgenommen wird.

Das Las-System kontrolliert wiederum hierarchisch das Rhl-System, indem aktiviertes LasR direkt die Transkription von Rhl induzieren kann. <sup>63</sup>

Mutationen mit Funktionsverlust in den AHL-Systemen mit Verlust des QS sind häufig im Übergang von akuten zu chronischen Infektionen zu beobachten. Dies führt zum Verlust akuter Virulenzfaktoren. In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass dies zu einer Abnahme der Infektionsschwere in akuten Infektionen führt. <sup>63-65</sup>

Im PQS-System reguliert 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone (*Pseudomonas quinolone signal*) ebenfalls das Quorum-sensing und passt die Bakterienpopulation an diverse Stressumgebungen an. <sup>66,67</sup> Da PQS Eisen ( $Fe^{3+}$ ) chelatiert und die Expression der Siderophoren Pyoverdin und Pyochelin induzieren kann, spielt es außerdem eine Rolle im Eisenstoffwechsel von *P. aeruginosa*. PQS reguliert positiv die Virulenzfaktoren LasB und Pyocyanin. <sup>68</sup> Interessanterweise moduliert PQS auch die Immunantwort des Wirtes. NF- $\kappa$ B-abhängig hemmt es die Bildung von IL-6 und TNF- $\alpha$ . <sup>69</sup> Es induziert hingegen Chemotaxie von neutrophilen Granulozyten. <sup>70</sup>

Das PQS-Signal wird ebenfalls durch das AHL-System reguliert: LasR induziert und RhlR- hemmt die Bildung von PQS durch Bindung an den Promotionsregulator PqsR. <sup>68,71</sup>

Das GAC (*global activator of antibiotic and cyanide synthesis*)- System ist das wichtigste von über 60 verschiedenen Zwei-Komponenten Kinasesystemen. Es spielt ebenfalls eine wichtige Rolle im Übergang von akuter zu chronischer Infektion. Es besteht aus einer Transmembranen Sensorkinase GacS, die den Regulator GacA phosphoryliert und damit aktiviert. Daraufhin reguliert dieser die Expression der kleinen regulatorischen RNAs (small regulatory RNA, sRNA) RsmZ und RsmY. Binden diese regulatorischen RNAs an das sRNA-Bindungsprotein RsmA, aktiviert dieses die Expression verschiedener Gene zur Biofilmbildung unter anderem für die Polysaccharide Pel und Psl, und

unterdrückt andere Gene, welche eine akute Virulenz induzieren, wie unter anderem das T3SS.<sup>63</sup>

*P. aeruginosa* produziert mindestens drei extrazelluläre Polysaccharide, die für die Biofilmbildung relevant sind, Pel, Psl und Alginate.<sup>72</sup>

Biofilme sind oberflächen-assoziierte bakterielle Gemeinschaften, die in einer (in der Regel selbst produzierten) extrazellulären Matrix eingebettet sind.<sup>73</sup>

Die Toleranz gegenüber Antibiotika kann innerhalb eines Biofilms im Vergleich zu planktonischen Bakterien vielfach erhöht sein.<sup>61</sup>

Ein wichtiges Merkmal der Chronifizierung der Infektion in der CF-Lunge ist die Entwicklung eines mukoiden Phänotyps, der sich durch die Produktion großer Mengen des Polysaccharids Alginate (= mucoid exopolysaccharide) auszeichnet. Dies spielt eine wichtige Rolle in der bakteriellen Adhärenz an die Wirtszellen und bietet *P. aeruginosa* einen Schutz vor dem Immunsystem sowie vor antimikrobiellen Substanzen. Die Entwicklung eines mukoiden *P. aeruginosa*-Phänotyps ist pathognomonisch für die CF-Lungenerkrankung.

Für die Synthese von Alginate ist die Transkription von 12 Genen notwendig, die einer Transkriptionskontrolle durch den Masterregulator (Sigma Faktor) AlgU unterliegen.

AlgU steht unter direkter Kontrolle des anti-Sigma-Faktors, und damit Transkriptioneninhibitors MucA. Diese Interaktion wird durch MucB stabilisiert. Eine Mutation in *mucA* (dem Gen, welches für MucA codiert) ist in mukoiden *P. aeruginosa* -Stämmen eine häufig anzutreffende genetische Ursache dieses Phänotyps.

Eine weitere häufige Ursache für den mukoiden *P. aeruginosa*-Phänotyp ist die proteolytische Spaltung von MucA durch die Proteasen AlgW und MucP. AlgW kann durch den Zellwandinhibitor D-cycloserin und durch MucE nach Simulation durch Stressfaktoren an der Bakterienwand (*envelope stress response*) aktiviert werden. Neben der Regulation der Alginateproduktion aktiviert AlgU beispielsweise die HCN-Produktion (Hydrogen cyanide) und hemmt das T3SS-System.<sup>60,73-76</sup>

Mit der Ausbildung des mukoiden Phänotyps verliert *P. aeruginosa* beispielsweise auch sein Flagellum und damit seine Motilität.

Da das Flagellum durch Bindung an TLR5 (toll-like receptor 5) zu einer Immunreaktion führt, unter anderem mit erhöhter IL-8 Produktion, ist sein Verlust

mit einer geringeren Immunogenität des Erregers verbunden. Dies trägt dazu bei, dass *P. aeruginosa* „unter dem Radar“ des Immunsystems bleiben kann.<sup>77</sup>

Während also einige Virulenzfaktoren, die für eine chronische Persistenz sorgen, nach der Etablierung der Lungeninfektion neu ausgebildet werden, werden andere durch Mikroevolution ausselektiert oder durch die verschiedenen Regulationssysteme unterdrückt.

Obwohl *P. aeruginosa* ein aerobes Bakterium ist, ist er an das mikroaerobe Milieu in der CF-Lunge gut angepasst, welches insbesondere im Bereich der Mukusplaques entsteht. Es konnte zudem gezeigt werden, dass unter hypoxischen Bedingungen vermehrt Alginat durch die Bakterien produziert wird.<sup>78</sup>

Es konnte gezeigt werden, dass das CFTR-Protein selbst, neben seiner Funktion als Ionenkanal, als epithelialer Rezeptor für *P. aeruginosa* dient und für dessen Internalisierung durch Atemwegsepithelzellen notwendig ist.<sup>79</sup>

Die beschriebenen Anpassungsreaktionen von *P. aeruginosa* in Verbindung mit den zuvor erläuterten Einschränkungen der CF-Atemwege in der Erregerabwehr sorgen für eine Persistenz von *P. aeruginosa* in der CF-Lunge.

#### **1.4.5 Virale Atemwegsinfektionen in der CF-Lungenerkrankung**

Studien legen nahe, dass virale Atemwegsinfektionen in mindestens 40% der Exazerbationen von CF-Patienten eine Rolle spielen.<sup>80-82</sup>

Dies zeigt sich auch in BAL-Spülflüssigkeit von CF-Patienten während einer Exazerbation. Hier konnten in 40-50% der Fälle Atemwegsviren nachgewiesen werden, während bei stabiler klinischer Situation nur in 9% Viren nachweisbar waren.<sup>83</sup>

Die häufigsten viralen respiratorischen Erreger bei CF-Patienten sind Respiratorische Syncytial Viren (RSV), Adenoviren, Parainfluenza Viren, Influenza A und B sowie Rhinoviren.<sup>82,84,85</sup>



Die Anzahl viraler Atemwegsinfektionen im Vergleich zu gesunden Kontrollen und Geschwistern ist bei CF-Patienten nicht erhöht, jedoch sind sie mit einer deutlich höheren Morbidität verbunden.<sup>80,84,86</sup>

Es konnte gezeigt werden, dass virale Infektionen zu einer Verschlechterung der Lungenfunktion führen, mit Abnahme sowohl der forcierten Vitalkapazität insgesamt, als auch der Einsekundenkapazität (forciertes expiratorische Volumen innerhalb einer Sekunde, FEV<sub>1</sub>). Virale Infektionen führen zu vermehrten respiratorischen Symptomen, Gewichtsabnahme und Abnahme des Shwachman-Scores. Zudem erhöhen sie die Frequenz und Dauer der Hospitalisation der betroffenen Patienten und führen zu vermehrtem Antibiotikaeinsatz.<sup>80,85,87,88</sup>

Diese klinischen Daten werden durch experimentelle Untersuchungen gestützt. *In vitro* war die Viruslast nach RV-Infektion in primären bronchialen Epithelzellen von CF-Patienten im Vergleich zu denen von Gesunden erhöht. Ein Grund hierfür könnte die verringerte antivirale Immunantwort sein, mit niedrigerer Induktion von Interferonen und Expression interferon-stimulierter Gene.<sup>89</sup>

Virale Erreger stehen zudem in einem wechselseitigen Zusammenspiel mit bakteriellen Pathogenen.

#### **1.4.6 Inflammation und Hypoxie**

Die chronische Inflammation in der CF-Lungenerkrankung beginnt früh und ist persistent. Obwohl sie im Vergleich zu Gesunden im Verhältnis zur Bakterienlast erhöht ist, gelingt es dem Körper nicht, die Infektion effektiv zu bekämpfen.<sup>90</sup> Stattdessen führt die anhaltende Entzündung letztlich zu strukturellen Schäden.

Die Inflammation in der CF-Lungenerkrankung ist charakterisiert durch einen übermäßigen Einstrom neutrophiler Granulozyten und verringertem Abbau.

Die Atemwege von CF-Patienten enthalten hohe Konzentrationen der neutrophilen „Anlockstoffe“ (*chemoattractants*) IL-8, Leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), Komplementkomponente C5a und andere sowie der Neutrophilen aktivierenden Stoffe TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17 und GM-CSF.

Neutrophile Granulozyten sind für die Abwehr von Pathogenen unabdingbar, ihr Übermaß in der CF-Lungenerkrankung ist jedoch schädlich.

Durch von Neutrophilen produzierte Serinproteasen wie Cathepsin G; Proteinase-3, vor allem aber Neutrophilenelastase können die CFTR-Expression und Funktion gestört werden. Zusätzlich aktivieren diese ENaC. Außerdem beeinträchtigt die Elastase auch die mukoziliäre Clearance durch Reduktion des Zilienschlags.<sup>91-93</sup> In hohen Konzentrationen wie in der CF-Lunge, wo sie zu einem Ungleichgewicht zwischen Proteasen und Proteaseinhibitoren führen, können sie einen strukturellen Schaden am Lungengewebe anrichten.<sup>94</sup>

Neutrophile sekretieren außerdem Matrix Metalloproteasen MMP-8 und -9, die für Umbauprozesse des Lungengewebes während der chronischen Inflammation mitverantwortlich sind. Die neutrophilen Granulozyten selbst sind zudem eine wichtige Quelle für die Lockstoffe IL-8, IL-17, LTB<sub>4</sub> und führen so zu einem weiteren Einfluss von Neutrophilen.

Neutrophile sind die wichtigste Quelle extrazellulärer DNA, die eine Ursache für die hohe Viskosität und Zähigkeit des Atemwegsekretes bei CF-Patienten ist.<sup>95</sup>

Der chronische Neutrophileneinstrom wird durch eine Reihe von Chemokinen stimuliert, IL-8 ist jedoch der wichtigste Entzündungsmediator für deren chemotaktische Rekrutierung und Aktivierung. Erhöhte IL-8 Spiegel finden sich im Sputum, der bronchoalveolären Lavage (BAL) und im Serum von CF-Patienten und sie korrelieren mit der Anzahl neutrophiler Granulozyten in der BAL und dem klinischen Status der Patienten.<sup>96</sup>

*In vivo* und *in vitro* produzieren bronchiale Epithelzellen von CF-Patienten abnormal hohe IL-8 Spiegel aufgrund konstitutiv aktivem NF-κB-Signalweg.<sup>97</sup>

Bindung von *P. aeruginosa* an aG<sub>M1</sub>-Rezeptoren der Epithelzellen aktiviert NF-κB weiter und somit auch die IL-8 Expression. Es wurde gezeigt, dass diese Aktivierung durch *P. aeruginosa* bei CF-Zellen ausgeprägter und länger andauern kann als bei nicht-CF Zellen.<sup>98</sup> *Pseudomonas* DNA kann die IL-8 Produktion auch auf einem NF-κB-unabhängigen Signalweg aktivieren.<sup>99</sup>

Im Gegensatz hierzu finden sich in den Atemwegen von CF-Patienten niedrigere Spiegel des antiinflammatorischen Zytokins IL-10.

Es besteht in der CF-Lunge somit eine Dysbalance von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen.<sup>100</sup>

Neben dem Anfluten der Inflammation ist auch die Beendigung der Entzündungsreaktion in den Atemwegen der CF-Patienten, die sogenannte Resolution, gestört. Diese ist eng verbunden mit dem Fettsäurestoffwechsel.<sup>101</sup> CF-Patienten haben in den betroffenen Geweben beispielsweise niedrigere Konzentrationen Docosahexaensäure (DHA). DHA ist der Ausgangsstoff der Biosynthese vieler Resolvine. Diese werden zusammen mit Protectinen und Maresinen zu sogenannten SPMs (*specialized proresolving mediators*) zusammengefasst – Signalmoleküle zur Orchestrierung der Resolution.

Für das im Kontext der CF-Lungenerkrankung besonders relevante Resolvin RvD1 konnte gezeigt werden, dass es in der akuten Phase die Infiltration mit neutrophilen Granulozyten begrenzt und in chronischen Infektionen zusätzlich zu einer Verringerung der Gewebeschädigung führen kann.<sup>102</sup>

Ein Ungleichgewicht zwischen Einleitung und Beendigung ist somit ein wichtiger Faktor für die andauernde chronische Inflammation in der CF-Lungenerkrankung.

Ein weiterer Aspekt der CF-Lungenerkrankung ist die andauernde Hypoxie.

Da die Mucinsekretion trotz des fehlenden Mukusabtransportes fortbesteht, entstehen auf dem Atemwegsepithel dicke Mukusplaques, die den Diffusionsweg für Sauerstoff vergrößern. CF-Atemwegsepithelzellen weisen zudem zur mitochondrialen Energiegewinnung für den vermehrten Na<sup>+</sup>-Transport einen zwei- bis dreifach erhöhten Sauerstoffverbrauch auf. Beide Mechanismen führen zu einer lokalen Hypoxie in den Bereichen der Mukusplaques.<sup>78</sup>

Hinzu kommt, dass durch den Verlust des CFTR auch der Transport des Antioxidanz Glutathion eingeschränkt ist.<sup>103</sup> Dies führt zu vermehrtem intrazellulärem Glutathion und in der Folge reduzierter Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$ . Dies hat eine schlechtere transkriptionale Anpassung an die Hypoxiebedingungen zur Folge.

Hypoxie führt über vermehrten Calciumeinstrom direkt zur Aktivierung des NF- $\kappa$ B Signalwegs. Außerdem führt Hypoxie über Zellnekrosen zu IL-1 $\alpha$  Freisetzung und IL1-R Aktivierung und hierdurch ebenfalls zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B<sup>104</sup> und damit zur Freisetzung von IL-8 und Rekrutierung neutrophiler Granulozyten.<sup>105,106</sup> Nach Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten führt das hypoxische

Milieu noch zu ihrem verstärkten Überleben, vermehrter Migration ins Gewebe und verstärkter Freisetzung von neutrophilen Elastase.<sup>107</sup>

Die physiologische Reaktion des pulmonalen Gefäßsystems auf Hypoxie ist pulmonale Vasokonstriktion. Eine verringerte pulmonale Perfusion ist bereits bei sehr jungen CF-Patienten zu beobachten. Dauert dieser Zustand länger an, führt die Vasokonstriktion zu pulmonaler Hypertension und vaskulären Umbauvorgängen.<sup>108</sup>

## 1.5 Coinfektionen in der Lunge

Es ist bekannt, dass vorangegangene virale Infektionen in der Lunge bakterielle Sekundärinfektionen zur Folge haben können. Ein großer Teil der Mortalität der „Spanischen Grippe“ von 1918/19, einer Influenza A (H1N1) -Pandemie, die etwa 50 Millionen Todesfälle verursachte, ist auf Komplikationen mit bakteriellen Superinfektionen von *Streptococcus pneumoniae* und anderen bakteriellen Atemwegserregern zurückzuführen.

Während der Influenza A (H1N1)-Pandemie von 2009 waren etwa 25-50% der hospitalisierten Patienten von bakteriellen Superinfektionen betroffen und diese waren von einer erhöhten Morbidität und Mortalität betroffen.<sup>109</sup>

Es sind zahlreiche Pathomechanismen beschrieben, die erklären wie eine Virusinfektion bakterielle Sekundärinfektionen bahnt. Epitheliale Barrierschädigung durch Zelltod, überschießende Entzündungsantwort und gestörte Reperaturmechanismen sowie die Abnahme der Frequenz und Koordination des Zilienschlags stören Abwehrmechanismen des Atemwegepithels.<sup>110,111</sup>

Virale Infektionen können zudem die Expression bakterieller Bindungsrezeptoren verstärken. Influenza, HRV, RSV, Parainfluenzavirus- Infektionen induzieren eine vermehrte Expression von Platelet activating factor receptor (PAFR), der als Bindungsrezeptor für *S. pneumoniae* und *H. influenzae* dient.<sup>112-116</sup>

Virale Proteine, die auf der Oberfläche der infizierten Zellen ausgebildet werden, können ebenfalls einen Bindungspunkt für Bakterien darstellen. An das RSV-Oberflächenglykoprotein G können *H. influenzae*, *P. aeruginosa* und *S. pneumoniae* binden<sup>117,118</sup> und Haemagglutinin von Influenza erleichtert die

Bindung von *Streptococcus pyogenes* an infizierten Zellen und eine anschließende invasive Infektion.<sup>116,119</sup>

Im Rahmen von viralen Infektionen kann es zu Veränderungen des Immunsystems kommen, die eine bakterielle Sekundärinfektion erleichtern können.

Ein erster viraler Schlag kann Immunzellen desensibilisieren, sodass es bei einer anschließenden bakteriellen Infektion zu einer verzögerten Immunreaktion kommt. So haben beispielsweise Makrophagen aus RSV- oder Influenza infizierten Mäusen eine geringere Immunantwort auf bakterielle Stimuli gezeigt. Dies führte in Sekundärinfektionen zu einer größeren Bakterienlast.<sup>120</sup> *In vitro* zeigten neutrophile Granulozyten nach gemeinsamer Inkubation mit Influenza A und *S. pneumoniae* ein verkürztes Überleben aufgrund vermehrter Apoptose. Neben einer verminderten Rekrutierung ist auch eine funktionelle Einschränkung der Neutrophilenfunktion nach Virusinfektionen beschrieben worden.<sup>116,121</sup>

Es konnte gezeigt werden, dass eine Influenzainfektion die Anzahl der Alveolarmakrophagen um über 90% reduzieren kann. Die frühe angeborene Immunantwort war hierdurch deutlich eingeschränkt und eine Folgeinfektion mit *S. pneumoniae* konnte wesentlich schlechter aus der Lunge entfernt werden. Diese verminderte bakterielle Clearance war reversibel, nachdem die Alveolarmakrophagen nach zwei Wochen wieder ihre Ausgangszahl erreicht hatten.<sup>116,122</sup>

Im Mausmodell einer post-Influenza MRSA-Pneumonie konnte durch eine frühe Gabe monoklonaler Antikörper, die gegen Influenza-Haemagglutinin gerichtet waren, neben einer Reduktion der Virus- und Bakterienlast auch eine Verbesserung der Makrophagenfunktion erzielt werden. Die Intervention mit dem monoklonalen Antikörper führte zu einer verbesserten Überlebensrate.<sup>123</sup>

In einer weiteren Studie zeigte sich auch die Immunantwort natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) auf sekundäre bakterielle Infektionen mit *S. aureus* nach vorangegangener Influenzainfektion gestört. Durch verringerte TNF- $\alpha$  Produktion der NK-Zellen kam es hier zu einer abgeschwächten Phagozytoseaktivität der Alveolarmakrophagen.<sup>124</sup>

Virale Atemwegsinfektionen können bakterielle Infektionen auch bei CF-Patienten erleichtern und gehen diesen oftmals voraus. In einer prospektiven Studie über 17 Monate waren fünf von sechs Erstisolationen mit *P. aeruginosa*, sowie alle Erstisolationen mit *H. influenzae* und *S. aureus* während oder innerhalb von 3 Wochen nach einer viralen Infektion der oberen Atemwege.<sup>125</sup>

Eine retrospektive Auswertung der CF-Klinik Kopenhagen über einen Zeitraum von 25 Jahren zeigte, dass zwischen Oktober und März, der Hauptzeit für virale Atemwegsinfektionen, das Risiko der Erstinfektion mit *P. aeruginosa* am höchsten war.<sup>126</sup>

Ob virale Atemwegsinfektionen in der Lage sind das bakterielle CF-Atemwegsmikrobiom während Exazerbationen zu modulieren konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Bei nicht-viralen Exazerbationen sind nur wenige Änderungen im Mikrobiom festzustellen.<sup>127,128</sup> Bei viralen Exazerbationen ist die Studienlage nicht eindeutig. In vergleichbaren klinischen Studien wurde teilweise über eine deutliche Zunahme der *Pseudomonas*-Last während viraler Infektionen berichtet<sup>129</sup>, während in anderen Studien kein solcher Zusammenhang nachweisbar war.<sup>130</sup>

*In vitro* konnte gezeigt werden, dass eine HRV-Infektion ein Herauslösen von *P. aeruginosa* aus einem Biofilm verursachen kann.<sup>131</sup>

Zunehmend in den Fokus gerät die Frage, wie eine vorangehende bakterielle Infektion oder Kolonisation der Atemwege darauf anschließende virale Infektionen beeinflusst.

In Mäusen ist ein intaktes Lungenmikrobiom notwendig zur Entwicklung einer adaptiven Immunantwort gegen Influenzaviren. Mäuse, die zuvor antibiotisch behandelt wurden, konnten kein Inflammasom ausbilden und die davon abhängige Reifung von IL-1 $\beta$  und IL-18 war gestört. Sie zeigten niedrigere Antikörperlevel und eine verringerte Anzahl Influenza-spezifischer CD4<sup>+</sup> sowie CD8<sup>+</sup> -T-Zellen. Die Viruslast in den Lungen war im Vergleich zu unbehandelten Tieren signifikant erhöht.<sup>132</sup> In einer weiteren Studie zeigten keimfreie Mäuse eine erhöhte Mortalität durch Influenzainfektion im Vergleich zu Mäusen in natürlicher Umgebung. Durch Vorbehandlung mit *S. aureus* konnte bei den zuvor keimfreien Tieren ein anschließender Influenza-vermittelter Lungenschaden

signifikant verringert werden. Die Vorbehandlung mit *S. aureus* führte zu einer Rekrutierung peripherer Monozyten in die Alveoli und anschließender Ausbildung zu M2 Alveolarmakrophagen. Es konnte gezeigt werden, dass M2 Alveolarmakrophagen während der folgenden Influenzainfektion vermehrt antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 und TGF- $\beta$  bildeten.<sup>133</sup>

Interessanterweise konnte auch, ganz im Gegensatz zu einer sekundären bakteriellen Infektion, eine vorangegangene zehntägige *S. pneumoniae*-Kolonisation Mäuse vor Influenza-induziertem Lungenschaden schützen. Es konnte mittels *S. pneumoniae*-Mutanten ermittelt werden, dass dieser Effekt abhängig vom bakteriellen Virulenzfaktor Pneumolysin ist. Die bakterielle Vorbehandlung schützte vor influenza-vermittelter Depletion der Alveolarmakrophagen und vor einer Reduktion der Immunantwort<sup>134,135</sup>

Neben den protektiven Mechanismen eines intakten respiratorischen Mikrobioms auf virale Atemwegsinfekte wurden jedoch auch Prozesse entdeckt, die eine vorausgehende bakterielle Kolonisation mit aggravierten viralen Folgeinfektionen in Verbindung bringen.

Der Schweregrad und die Entzündungsantwort auf eine RSV Infektion konnte mit dem Vorkommen spezifischer bakterieller Cluster im Mikrobiom der oberen Atemwege assoziiert werden. Die Ergebnisse hierzu sind jedoch nicht durchgängig deckungsgleich. Während in einer Studie eine positive Korrelation zwischen dem Auftreten einer RSV-Infektion und dem Vorhandensein von *Streptococcus* und *H. influenzae*, sowie eine negative Korrelation zu *S. aureus* gefunden<sup>136</sup>, korrelierte in einer vergleichbaren Studie eine *H. influenzae* Besiedelung der oberen Atemwege mit einer schwerwiegenderen RSV-Infektion während *Streptococcus* mit milderer Infektion in Zusammenhang gebracht werden konnte.<sup>137</sup>

Eine Überrepräsentation von *H. influenzae* im Mikrobiom des Nasopharynx geht nicht nur mit einem schwerwiegenderen klinischen Verlauf der RSV-Infektion einher, sondern ist sowohl mit einer höheren Viruslast, als auch mit einer vermehrten proinflammatorischen Zytokinantwort (IL-8) verbunden.<sup>138</sup>

Ursache für eine aggravierte Virusinfektion kann beispielweise die Expression viraler Eintrittsrezeptoren durch bakterielle Exposition des Wirtes sein.

Respiratorische Epithelialzellen exprimieren *in vitro* nach Infektion mit *H. influenzae* vermehrt ICAM-1 (Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül 1), welches als Eintrittsrezeptor für (Hauptgruppen)- Rhinoviren dient. Hierdurch kommt es zu einer vermehrten Bindung und Replikation von Rhinoviren der Majorgruppe (HRV-16), jedoch nicht von Minorgruppen-Rhinoviren (HRV-1B), die den LDL-Rezeptor als Eintrittsrezeptor benutzen.<sup>139</sup>

Es konnten auch Veränderungen der Immunantwort des Wirtes auf virale Infektion durch bakterielle Vorbehandlung gesehen werden. Eine Infektion mit *H. influenzae* verstärkte die inflammatorische Zytokinantwort von bronchialen Epithelialzellen auf eine sekundäre virale Infektion mit RSV<sup>139</sup> und HRV.<sup>140</sup> Dieser Effekt wurde sogar dann beobachtet, wenn die Exposition mit *H. influenzae* vor der Virusinfektion beendet wurde.

Zumindest für HRV scheint diese vermehrte inflammatorische Antwort teilweise auf hochregulierte Expression von TLR3 (toll-like receptor 3) zurückzuführen sein.

Ebenfalls wurde gezeigt, dass auch *P. aeruginosa* in Coinfektion mit RSV zu einer vermehrten IL-6 und IL-8 Antwort führt, jedoch im Gegensatz zu *H. influenzae* nur bei simultaner, nicht jedoch bei sequentieller Coinfektion.<sup>141</sup>

Ob eine virale Atemwegsinfektion bei CF-Patienten schwerwiegender ausfällt, wenn diese auch mit *P. aeruginosa* infiziert sind ist bislang nicht endgültig geklärt.<sup>142</sup>

*In vitro* konnte demonstriert werden, dass differenzierte primäre bronchiale Epithelialzellen von CF-Patienten bei sequentieller Coinfektion mit einem klinischen, mukoiden *P. aeruginosa* -Stamm und anschließender HRV-Infektion eine niedrigere Interferonantwort und eine höhere Viruslast haben als ohne vorangegangene bakterielle Infektion. Interessanterweise war jedoch bei Epithelialzellen von Nicht-CF-Patienten die Interferonantwort nach Coinfektion höher als bei rein viraler Infektion. Die für die Interferonantwort notwendige Akt- und IRF3- (interferon response factor 3) Phosphorylierung war durch die bakterielle Vorbehandlung in CF-Zellen, nicht jedoch in normalen Zellen gehemmt.<sup>143</sup>



Eine Kolonisation durch Pilze findet in der CF-Lunge ebenfalls häufig statt. Verschiedene *Aspergillus spp.* konnten aus CF-Lungen isoliert werden, insbesondere *Aspergillus fumigatus*, der mit einer Prävalenz von bis zu 57% auftritt.<sup>144,145</sup>

Eine chronische Infektion mit *A. fumigatus* führt zu einer verschlechterten Lungenfunktion<sup>146</sup>, erhöht das Risiko einer chronischen *P. aeruginosa* Infektion und kann in Coinfektion mit diesem zu einer synergistischen, über einen rein additiven Effekt hinausgehenden Verschlechterung der CF-Lungenerkrankung führen.<sup>147</sup>

*Pseudomonas* und *Aspergillus* können speziesübergreifende Biofilme bilden, was eine Rolle in der sehr schwierigen Eradikation dieser Infektionen spielt.<sup>144,148</sup> Auch die Ausbildung von Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa* kann durch eine Coinfektion mit *A. fumigatus* moduliert werden – so ist im Zusammenspiel der beiden Erreger beispielsweise eine vermehrte Bildung bakterieller Proteasen beschrieben worden.<sup>149</sup>

Die komplexen Interaktionen der verschiedenen Mikroorganismen untereinander und dem Wirt spielen aufgrund der Vielzahl der beteiligten Erreger in der CF-Lunge eine herausragende Rolle, die bislang unzureichend untersucht ist.

## 1.6 Fragestellung

Dem komplexen Netzwerk an Interaktionen zwischen bakteriellen Gemeinschaften der Atemwege, viralen Erregern und dem Wirt selbst wird zunehmend mehr Bedeutung beigemessen.

Es ist bekannt, dass chronische Infektionen mit *P. aeruginosa* eine wichtige Rolle für den Verlauf der CF-Lungenerkrankung spielen.

Außerdem stehen virale Erreger im Verdacht akute Exazerbationen bei CF-Patienten auszulösen.

Dennoch ist bislang nur unzureichend untersucht, welchen Einfluss eine chronische *P. aeruginosa* Infektion auf eine virale Atemwegsinfektion hat.

In der vorliegenden Arbeit sollten deshalb folgende Fragen beantwortet werden:  
Kann eine chronische *P. aeruginosa*-Infektion die Antwort primärer bronchialer Epithelzellen auf eine Rhinovirus Infektion modulieren? Ist eine etwaige Modulation abhängig vom bakteriellen Phänotyp?

Sind Unterschiede zwischen rein viralen Infektionen und bakteriell-viralen Coinfektionen in der Zytokin- und Interferonantwort feststellbar?

Beeinflussen diese Unterschiede den Schweregrad einer Rhinovirus Infektion?

Findet sich eine veränderte Viruslast bei coinfizierten Zellen im Vergleich zu rein viralen Infektionen?

Unterscheiden sich die Zellen von CF- und NichtCF-Spendern in ihrer Reaktion auf bakteriell-virale Coinfektionen?

## 2 Material

### 2.1 Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Name	Hersteller
Amicon Ultra Centrifuge Filter 100K	Merck
Amicon Ultra Centrifuge Filter 30K	Merck
Anti-Mucin 5AC antibody	Abcam
Antibiotic Antimycotic Solution	Sigma
Aspirationspipette 2 ml	Corning
Blutagarplatte	ThermoFisher
Bovines Typ I/III Kollagen PureCol	Sigma
BPE (Bovine Pituitary Extract)	ThermoFisher
BSA (Bovines Serumalbumin), niedriger Endotoxin-Gehalt	Sigma
Cellstar Tube Reaktionsgefäß 50 ml	Greiner Bio-one
Cellstar Tube Reaktionsgefäß 15 ml	Greiner Bio-one
Chloramphenicol	Sigma
Costar 96-Well Assay Platte	Corning
DMEM	Thermo Fisher
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma
DPBS (Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung)	Thermo Fisher
ECL-Detektionsreagenz	GE Healthcare Life Sciences
EGF Recombinant Human Protein	ThermoFisher
Ethanol 100%	Sigma
Ethanol 70% vergällt	Carl Roth
Fötales Kalbsserum (FCS)	Sigma
Gentamicin	Lonza
Heparin Lösung	Stemcell Technologies
Humanes Fibronectin	VWR

Hydrocortison	Stemcell Technologies
Isoproterenol	Sigma
Keratinocyte-SFM	ThermoFisher
Messküvetten Tischphotometer	Sarstedt
MicroAmp Fast-96-Well Reaction Plate	Life technologies
Mikroreaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt
Mikroschraubröhre 2 ml	Sarstedt
Multiply Pro Gefäß 0,2 ml	Sarstedt
MycoZap Plus-PR	Lonza
Nitrozellulosemembran	GE Healthcare Life Sciences
Paraformaldehyd	VWR
Penicillin-Streptomycin	Sigma
PneumaCult ALI 100x Supplement	Stemcell Technologies
PneumaCult ALI 10x Supplement	Stemcell Technologies
PneumaCult ALI Basal Medium	Stemcell Technologies
PneumaCult Ex 50x Supplement	Stemcell Technologies
PneumaCult Ex Basal Medium	Stemcell Technologies
Primärantikörper Kaninchen-anti-Cytokeratin 5	BioLegend
Primärantikörper Kaninchen-anti-p63	Abcam
Primärantikörper Maus-anti-TE7	Sigma
ProLong Diamond Antifade mit DAPI	ThermoFisher
Protease XIV	Sigma
SBTI (Soy Bean Trypsin Inhibitor)	Sigma
Sekundärantikörper AlexaFluor 488(grün) Ziege-anti-Maus	ThermoFisher

Sekundärantikörper AlexaFluor 555(rot) Ziege-anti-Kaninchen	ThermoFisher
Stabpipette Costar Stripette 10 ml	Corning
Stabpipette Costar Stripette 25 ml	Corning
Stabpipette Costar Stripette 5 ml	Corning
Sterilfilter, Porengröße 0,2 µm	Sigma
TipOne Pipettenspitzen 1 ml	TipOne
TipOne Pipettenspitzen 10 µl	TipOne
TipOne Pipettenspitzen 20 µl	TipOne
TipOne Pipettenspitzen 200 µl	TipOne
Tobramycin	Sigma
Transwell TC-Inserts	Sarstedt
Triton X-100 Detergent	AppliChem
Trypsin	Lonza
Tween 20	Sigma
Vancomycin	Sigma
Zellkulturflasche 250 ml, 75 cm <sup>2</sup> , Filterverschluss	Greiner Bio-one
Zellkulturflasche 50 ml, 25 cm <sup>2</sup> , Filterverschluss	Greiner Bio-one
Zellkulturflasche 550 ml, 175 cm <sup>2</sup> , Filterverschluss	Greiner Bio-one

## 2.2 Kits

Name	Funktion	Hersteller
Cytometric Bead Array (CBA) Human Soluble Protein Master Buffer Kit	CBA Buffer Kit	BD
Human IFN-γ Flex Set	CBA Kit	BD
Human IL-10 Flex Set	CBA Kit	BD
Human IL-1β Flex Set	CBA Kit	BD
Human IL-6 Flex Set	CBA Kit	BD
Human IL-6 Uncoated ELISA	IL-6 Elisa	Invitrogen
Human IL-8 Flex Set	CBA Kit	BD
Human IL-8 Uncoated ELISA	IL-8 Elisa	Invitrogen

Human IP-10 Flex Set	CBA Kit	BD
Human TGF- $\beta$ 1 Single Plex Flex Set	CBA Kit	BD
Human TNF- $\alpha$ Flex Set	CBA Kit	BD
iScript gDNA Clear cDNA Synthesis Kit	cDNA Synthese	BioRad
peqGOLD Total RNA Kit	RNA Isolation	peqlab (VWR)
SsoAdvanced Universal Probes Supermix	qPCR	BioRad
Western Blotting-Detektionsreagenz Amersham™ ECL™ Prime	DotBlot	VWR

### 2.3 Zellkulturmedien

Medium zur Isolation primärer bronchialer Epithelialzellen (pBEC): KSFM complete:

Inhaltsstoffe	Menge
	<b>50 ml</b>
Antibiotic/Antimycotic (10,000 units/ml penicillin, 10 mg/ml streptomycin, and 25 $\mu$ g/ml, Amphotericin B)	500 $\mu$ l
BPE	1,25 mg
Chloramphenicol (50 mg/ml)	5 $\mu$ l
EGF	10 ng
Gentamicin (50 mg/ml)	100 $\mu$ l
Isoproterenol	50 $\mu$ g
Keratinocyte-SFM	auf 50 ml aufgefüllt
MycoZap	100 $\mu$ l
Tobramycin (50 mg/ml)	100 $\mu$ l
Vancomycin (100 mg/ml)	50 $\mu$ l

Expansionsmedium Air Liquid Interface Zellkulturen: PneumaCult Ex complete:

Inhaltsstoffe	Menge
	<b>50 ml</b>
Hydrocortison Stock Lösung	50 µl
PneumaCult Ex 50x Supplement	1 ml
PneumaCult Ex Basal Medium	auf 50 ml aufgefüllt

Nährmedium Air Liquid Interface Zellkulturen: PneumaCult ALI complete:

Inhaltsstoffe	Menge
	<b>50 ml</b>
Heparin Lösung	100 µl
Hydrocortison Stock Lösung	250 µl
PneumaCult ALI 100x Supplement	500 µl
PneumaCult ALI 10x Supplement	5 ml
PneumaCult ALI Basal Medium	auf 50ml aufgefüllt

Antibiotikahaltiges Nährmedium Air Liquid Interface Zellkulturen: PneumaCult ALI complete +:

Inhaltsstoffe	Menge
	<b>50ml</b>
MycoZap	100 µl
Penicillin-Streptomycin	500 µl
PneumaCult ALI complete	auf 50ml aufgefüllt

Nährmedium für HeLa Ohio Zellen: DMEM + 10 % FCS:

Inhaltsstoffe	Menge
	<b>500 ml</b>
DMEM	450 ml
FCS	50 ml

Nährmedium für HeLa Ohio Zellen während Infektion: DMEM + 2 % FCS:

Inhaltsstoffe	Menge
	<b>500 ml</b>
DMEM	490 ml
FCS	10 ml

*Skim milk tryptone glucose glycerol-* (STGG) Medium:

<b>Inhaltsstoffe</b>	<b>Menge</b>
H <sub>2</sub> O	100 ml
TSB	3 g
Glukose	0,5 g
Glycerin	10 ml
Magermilchpulver	2 g

## 2.4 Zubereitete Reagenzien

Beschichtungslösung zur Beschichtung der ALI-Transwellmembran und Zellkulturflaschen:

<b>Inhaltsstoffe</b>	<b>Menge</b>
	<b>10 ml</b>
BSA 1 mg/ml	100 µl
DPBS	9,7 ml
Humanes Fibronectin 1 mg/ml	100 µl
Kollagen PureCol 3 mg/ml	100 µl

Antibiotikahaltige Spüllösung für die Isolation der pBECs (PBS+):

<b>Inhaltsstoffe</b>	<b>Menge</b>
	<b>500 ml</b>
DPBS	494 ml
MycoZap	1 ml
Penicillin-Streptomycin	5 ml

Gefrierlösung zum Einfrieren der pBECs:

<b>Inhaltsstoffe</b>	<b>Menge</b>
	<b>10 ml</b>
BPE	3 mg
DMSO	1 ml
Keratinocyte-SFM	9 ml



Waschlösung für Dotblot (TBS-T):

Inhaltsstoffe	Konzentration
H <sub>2</sub> O	
NaCl	150 mM
Tris-HCl pH 7,5	100 mM
Tween-20	0,1 %

## 2.5 Software

Name	Funktion	Version	Hersteller
ImageJ	Bildbearbeitung	2.0.0-rc-69/1.52p	Wayne Rasband (NIH), public domain
Prism 8 for Mac OS	Grafik- und Statistikprogramm	8.3.0	Graphpad
Biorender.com	Illustration		biorender
AxioVision	Mikroskop	4.8.2	Zeiss
StepOne Software	qPCR Datenauswertung	2.3	life technology (ThermoFisher Scientific)

## 2.6 Geräte

Gerätename	Funktion	Hersteller
Analog Vortex Mixer	Vibrationsmischer	VWR
Biofuge fresco	Mikroliterzentrifuge	Thermo Scientific Heraeus
Centrifuge 5804 R	Zentrifuge	Eppendorf
Fusion Fx	Geldokumentations-system	Vilber

Kombischüttler KL 2	Tischschüttler	Edmund Bühler
Nanodrop ND-1000	Spektrophotometer	Peqlab (VWR)
PCR Workstation Pro	PCR Arbeitsplatz	VWR
PerfectSpinP	Plattenzentrifuge	Peqlab (VWR)
PIPETMAN L P1000L, 100-1000 µL, Metal Ejector	Pipette	Gilson
PIPETMAN L P200L, 20- 200 µL, Metal Ejector	Pipette	Gilson
PIPETMAN L P20L, 2-20 µL, Metal Ejector	Pipette	Gilson
PIPETMAN L P2L, 0.2- 2 µL, Metal Ejector	Pipette	Gilson
Reax 2000	Vibrationsmischer	Heidolph
Sprout Minizentrifuge	Minizentrifuge	Biozym
StepOnePlus Real-Time PCR System	qPCR	Applied Biosystems
Thermomixer compact	Thermomixer	Eppendorf

## 2.7 PCR Assays

Ziel	Funktion	Sequenz (5'-3')	Hersteller
GAPDH	Vorwärts- primer	ATTCCACCCATGGCAAATTC	IDT
GAPDH	Rückwärts- -primer	CGCTCCTGGAAGATGGTGAT	IDT
GAPDH	Sonde	JOE-CGTTTCTCAGCCTTGACGGTG CCA-BHQ1	IDT
HRV	Vorwärts- primer	GGTGTGAAGAGCCGCGTG	Sigma-Aldrich

HRV	Rückwärts- -primer	CAAAGTAGTCGGTCCCATCC	Sigma-Aldrich
HRV	Sonde	FAM-TCCTCCGGCCCCTGAATGTG G-BHQ1	Sigma-Aldrich
HRV	gBlock/ Standard		IDT
IL 6	Vorwärts- -primer	GGTACATCCTCGACGGCATCT	IDT
IL 6	Rückwärts- -primer	GTGCCTCTTTGCTGCTTTCAC	IDT
IL 6	Sonde	TGTTACTCT-ZENQ- TGTTACATGTCTCCTTTCTCAGGG CT-IowaBlackFQ	IDT
IL 8	Vorwärts- -primer	CTGGCCGTGGCTCTCTTG	Sigma-Aldrich
IL 8	Rückwärts- -primer	TTAGCACTCCTTGGCAAACTG	Sigma-Aldrich
IL 8	Sonde	FAM-CCTTCCTGATTTCTGCAGCT CTGTGTGAA-BHQ1	Sigma-Aldrich
IL 1b	Vorwärts- -primer	CTTCGAGGCACAAGGCACAA	Sigma-Aldrich
IL 1b	Rückwärts- -primer	TTCACTGGCGAGCTCAGGTA	Sigma-Aldrich
IL 1b	Sonde	FAM-TCTGCCATGGCTGCTTCAGA CACT-BHQ1	Sigma-Aldrich
Interferon beta	Vorwärts- -primer	CGCCGCATTGACCATCTA	Sigma-Aldrich
Interferon beta	Rückwärts- -primer	TTAGCCAGGAGGTTCTCAACAATA GTCTCA	Sigma-Aldrich
Interferon beta	Sonde	FAM-TCAGACAAGATTCATCTAGC ACTGGCTGGA-BHQ1	Sigma-Aldrich
Interferon lambda 1	Vorwärts- -primer	GGACGCCTTGGAAGAGTCACT	Sigma-Aldrich
Interferon lambda 1	Rückwärts- -primer	AGAAGCCTCAGGTCCCAATTC	Sigma-Aldrich
Interferon lambda 1	Sonde	FAM-AGTTGCAGCTCTCCTGTCTT CCCCG-BHQ1	Sigma-Aldrich
ISG 15	Vorwärts- -primer	CCTCTGAGCATCCTGGTGAG	Sigma-Aldrich

ISG 15	Rückwärts- -primer	CGAAGGTCAGCCAGAACAGG	Sigma-Aldrich
ISG 15	Sonde	FAM-ATCCTGGTGAGGAATAACAA GGGCC-BHQ1	Sigma-Aldrich
MX 1	Vorwärts- -primer	CAGCCTGCTGACATTGGGTA	Sigma-Aldrich
MX 1	Rückwärts- -primer	CCACATTACTGGGGACCACC	Sigma-Aldrich
MX 1	Sonde	FAM-CCACATTACTGGGGACCACC -BHQ1	Sigma-Aldrich
OASL	Vorwärts- -primer	TGAGGCAGGAGCATTTCAG	Sigma-Aldrich
OASL	Rückwärts- -primer	CTCCTGAGAACCGTGCCATT	Sigma-Aldrich
OASL	Sonde	FAM-AAGGAGCCCACCTTGACTAC C-BHQ1	Sigma-Aldrich
RSAD 2	Vorwärts- -primer	ATCCTTTGTGCTGCCCCTTG	Sigma-Aldrich
RSAD 2	Rückwärts- -primer	CTTGCCCAGGTATTCTCCCC	Sigma-Aldrich
RSAD 2	Sonde	FAM-CTTGCCCAGGTATTCTCCC C-BHQ1	Sigma-Aldrich

## 2.8 Primäre Zellen

Interne SpenderID	Grunderkrankung	Alter	Geschlecht
MHH 001A	Emphysem	58	w
MHH 005	Emphysem	49	w
MHH 006	Emphysem	57	m
MHH 009A	CF	31	m
MHH 004	CF	42	m
MHH 015	CF	33	w

## 2.9 Bakterien, Viren und Zelllinie

Name	Typ	Herkunft
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , NM1967	nicht-mukoider Phänotyp	Mikrobiologie Universitätsklinikum Frankfurt
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , M1967	mukoider Phänotyp	Mikrobiologie Universitätsklinikum Frankfurt
HRV-16	Majorgruppen Rhinovirus	ATCC
HRV-1B	Minorgruppen Rhinovirus	Departement of Medical Microbiology, Maastricht Medical Center
HeLa Ohio Strain	Zelllinie	Sigma

## 3 Methoden

### 3.1 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden durchgängig an der biologischen Sicherheitswerkbank durchgeführt.

#### 3.1.1 Beschichtung Zellkulturflaschen und Transwell®-Inserts

Steril filtrierte Beschichtungslösung wurde auf den Zellkulturflaschenboden, beziehungsweise die apikale Seite der Transwell®-Inserts gegeben, sodass die gesamte Fläche bedeckt war. Anschließend erfolgte die Inkubation für mindestens 2 h, maximal über Nacht bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank. Danach wurden die vorbeschichteten Flaschen und Inserts entweder unmittelbar benutzt oder in Plastikfolie verpackt bei 4 °C zur späteren Benutzung (maximal 72 h) gelagert.

### **3.1.2 Isolation und Anzucht primärer bronchialer Epithelialzellen (pBECs)**

Lungengewebe zur Isolation von pBECs wurde von der Lungengewebebank des Instituts für Pathologie der Medizinischen Hochschule Hannover (Prof. Dr. med. Danny Jonigk) zur Verfügung gestellt. Für die Überlassung des humanen Lungengewebes und die Versuche dieser Dissertation bestand ein positives Ethikvotum der Ethikkommission der Medizinischen Hochschule Hannover (Nr. 2700-2015: Charakterisierung von Zytokinprofilen und Wirtsreaktion in akuten und chronischen Infektionen der Lunge). Das Gewebe wurde im Rahmen von Lungentransplantationen explantiert und zunächst im Institut für Pathologie der Medizinischen Hochschule Hannover aufgearbeitet. Dort wurden einzelne Bronchialringe zugeschnitten und für den Transport gekühlt in RPMI + Penicillin/Streptomycin in einem 50 ml Reaktionsgefäß gelagert. Der Versand erfolgte mittels Übernachtexpress. Die Isolation der pBECs erfolgte durch uns 24-48 Stunden nach Explantation.

Das Gewebe wurde hierfür aus dem Transportgefäß entnommen und mit 20 ml antibiotika-haltiger Spüllösung PBS+ in eine 100 mm Zellkulturschale gegeben. Überschüssiges Gewebe um den Bronchialring wurde entfernt und der Bronchialring mit PBS+ abgespült. Der Bronchialring wurde nun aufgeschnitten, wenn dies nicht bereits durch die Pathologie der Medizinischen Hochschule Hannover erfolgt war. Anschließend wurde das Gewebe in einen 50 ml Falcon mit 10 ml Protease XIV-Lösung gegeben. In den Fällen, in denen mehr als ein Bronchialring eines Patienten eingesandt wurde, erfolgte die Aufteilung auf mehrere Falcons.

Nun erfolgte die Inkubation im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> für zwei Stunden. Dann wurde das Gewebe erneut mit 10 ml PBS+ in eine 100 mm Zellkulturschale gegeben. Anschließend wurde an der Innenseite des Bronchialrings (Bronchialwand) vorsichtig mit einer geschlossenen stumpfen Schere gekratzt bis die PBS+ Lösung durch die abgelösten Zellen wolkig eingetrübt war. Die Zelllösung wurde in einen Falcon transferiert und die Zellkulturschale zweimal mit jeweils 10 ml PBS+ gespült. Die Spüllösung wurde ebenfalls in den Falcon gegeben um möglichst alle abgelösten Zellen weiter zu verarbeiten. Das restliche Gewebe wurde zu diesem Zeitpunkt verworfen. Die Zellsuspension wurde nun bei 23 °C, 112 rcf für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde

abgeschüttet, das Zellpellet in 10 ml PBS+ gelöst und erneut zentrifugiert (112 rcf, 5 min, 23 °C). Anschließend wurde der Überstand erneut abgeschüttet und das Zellpellet nun in 12 ml KSFM complete Medium aufgenommen.

Die Zellsuspension wurden dann in eine vorbeschichtete 250 ml Zellkulturflasche gegeben und bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Es erfolgte alle 2-3 Tage ein Mediumwechsel. Hierfür wurde zunächst das alte Medium abgenommen, die Zellschicht anschließend mit 10 ml PBS+ gewaschen und dann erneut KSFM complete zugegeben. Im Verlauf von 7-10 Tagen war die Zellkulturflasche konfluent mit Zellen bedeckt. Die Zellen konnten nun zur späteren Verwendung eingefroren werden, ein Teil wurde zu diesem Zeitpunkt zur immunhistochemischen Charakterisierung genutzt.

### **3.1.3 Ablösen pBECs und Zellzählung**

Zum Einfrieren und Charakterisieren war es zunächst notwendig die Zellen von der Zellkulturflasche zu lösen. Hierfür wurde zunächst das Medium entfernt und die Zellen mit 10 ml PBS+ gewaschen. Dann wurde bei Raumtemperatur 2 ml Trypsinlösung zugegeben und bis zum Ablösen der Zellen vom Zellkulturflaschenboden (ca. 10 min) gewartet. Anschließend erfolgte die Neutralisierung des Trypsins mittels Zugabe von 4 ml SBTI. Danach wurde die Suspension zentrifugiert (112 rcf, 5 min, 23 °C), der Überstand abgeschüttet und die Zellen in 10 ml KSFM complete resuspendiert.

Nun erfolgte eine Zählung der Zellen mittels Neubauer Zählkammer. Es wurden jeweils vier Kammern mit 0,1 mm<sup>3</sup> Volumen ausgezählt.

### **3.1.4 Einfrieren pBECs**

Zum Einfrieren der pBECs wurde die Zellsuspension erneut zentrifugiert (112 rcf, 5 min, 23 °C) und in Gefrierlösung gebracht, sodass sich in 1 ml Suspension  $1,7 \times 10^5$  Zellen befanden. Dann wurde jeweils 1 ml in ein 1,5 ml-Kryo-Lagerungsröhrchen gegeben und diese in einem Mr. Frosty™ Gefrierbehälter über Nacht in einen -80 °C Gefrierschrank gegeben um eine Abkühlung von

1 °C/Minute zu erzielen. Am Folgetag wurde das Lagerungsfläschchen in einen Kryokanister mit flüssigem Stickstoff zur Kryokonservierung überführt.

### 3.1.5 Immunhistochemische Charakterisierung pBECs

Für die immunhistochemische Charakterisierung wurden 60 µl der resuspendierten Zelllösung in 6 ml KSFM complete verdünnt und anschließend hiervon jeweils 500 µl auf vorbeschichtete Deckgläser mit 15 mm Durchmesser in eine 24-well Platte gegeben. Nachdem die Zellschicht eine Dichte von 50 % erreicht hatten, konnten sie zunächst fixiert und anschließend immunhistochemisch gefärbt werden (Tabelle 1)

Zunächst erfolgte hierfür die Abnahme des Mediums, anschließend wurden drei Waschschrte mit jeweils 1 ml PBS/well durchgeführt. Dann erfolgte die Fixierung mit 1 ml/well 4 % Formaldehyd für 15 min. Anschließend wurden die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen und mit 1 ml/well 0,1 % Triton X-100 für 15 min permeabilisiert. Nach drei weiteren Waschschrten mit PBS erfolgte das Auftragen jeweils eines Primärantikörpers. Die Antikörper waren in 1 % BSA-PBS gelöst. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 4 °C. Am Folgetag erfolgten zunächst drei Waschvorgänge mit 1 ml/well PBS. Anschließend wurden die Sekundärantikörper aufgetragen, welche ebenfalls in 1 % BSA-PBS gelöst waren. Danach erfolgte für eine Stunde eine Inkubation im Dunkeln.

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
Rabbit-anti-p63	1:1000	Alexa 555(rot) goat-anti-rabbit	1:1000
Rabbit-anti-Cyt5	1:1000	Alexa 555(rot) goat-anti-rabbit	1:1000
Mouse-anti-TE7	1:500	Alexa 488(grün) goat-anti-mouse	1:1000

**Tabelle 1: Antikörper zur immunhistochemischen Charakterisierung pBECs**

Nach abgeschlossener Inkubation des Sekundärantikörpers, wurde erneut dreimalig mit 1 ml/well PBS gewaschen. Dann wurden zur Gegenfärbung und Fixierung der gefärbten 15 mm Deckgläschen auf Objektträgern alle Proben mit einem Tropfen *ProLong<sup>TM</sup> Diamond Antifade Mountant with DAPI* (enthält DAPI zur DNA-Kernfärbung) behandelt und das Deckgläschen auf einen Objektträger aufgebracht. Es erfolgte anschließend eine Trocknung über Nacht. Der zur



Kernfärbung genutzte 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) Fluoreszenzfarbstoff fluoreszierte bei Anregung im sichtbaren Bereich blau.

Cytokeratin 5 ist ein wichtiger Epithelzellmarker und diente zur Einordnung der Zellen aus epitheliale Ursprung. Durch die Kombination mit dem Zweitantikörper AlexaFluor 555 wurde Cytokeratin 5 in rot dargestellt. Um sicherzustellen, dass es sich um basale Zellen handelt, die im Verlauf differenzieren können, erfolgte eine Markierung von p63. Da hierbei ebenfalls AlexaFluor 555 als Zweitantikörper eingesetzt wurde, fluoresziert es ebenfalls in rot. Um eine Kontamination mit Fibroblasten auszuschließen, wurde der Antikörper TE-7 eingesetzt, der gegen mesenchymale Zellen gerichtet ist. Die Zweitmarkierung erfolgte mittels Alexa 488, welches in grün fluoresziert.

### **3.1.6 Kultur und Differenzierung pBECs**

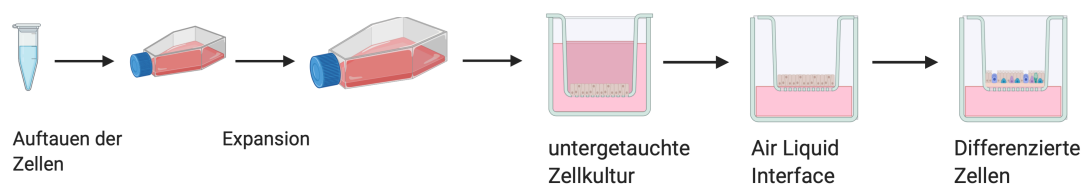
Zur Kultivierung der pBECs wurden zunächst  $1,7 \times 10^5$  Zellen, entsprechend einem Kryolagerungsfläschchen, aus dem Flüssigstickstofftank entnommen und aufgetaut. Die Zellen wurden dann in eine vorbeschichtete 25 ml Zellkulturflasche mit 5 ml PneumaCultEx complete Medium gegeben und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

Der erste Mediumwechsel erfolgte sobald die Zellen angeheftet waren, spätestens nach 24 Stunden, die folgenden Wechsel des Mediums alle zwei bis drei Tage. Wenn die Zellen eine Konfluenz von 80% erreicht hatten, was nach drei bis fünf Tagen der Fall war, wurden sie in eine größere Zellkulturflasche umgesetzt. Hierfür wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Dann erfolgte bei Raumtemperatur eine Zugabe von 2 ml Trypsinlösung und unter leichtem Schütteln und Klopfen lösten sich die Zellen nach etwa 5-10 Minuten. Dann erfolgte die Neutralisierung des Trypsins mittels Zugabe von 4 ml SBTI. Danach wurde die Lösung zentrifugiert (112 rcf, 5 min, 23 °C), der Überstand abgeschüttet und die Zellen in 10 ml PneumaCultEx complete Medium resuspendiert. Nun erfolgte die Kultivierung wie zuvor. War in dieser Flasche eine Konfluenz von 80% erreicht, was erneut drei bis fünf Tage in Anspruch nahm, konnten die Zellen in Transwell®-Inserts ausgesät werden.

Es erfolgte hierzu zunächst ein Ablösen der Zellen wie zuvor beschrieben. Dann wurde die Zellsuspension zentrifugiert (112 rcf, 5 min, 23 °C), der Trypsin-SBTI-Überstand abgekippt und die Zellen in 3 ml PneumaCultEx complete Medium resuspendiert. Anschließend wurde eine Zellzählung mittels Neubauer Zählkammer durchgeführt. Entsprechend der Zählung wurden 40000 Zellen/Insert in 500 µl PneumaCultEx complete Medium im Insert (apikal) ausgesät und 1,5 ml Medium im Well (basal) zugegeben.

Die zunächst also noch apikal mit Medium bedeckten Zellen expandierten unter diesen Bedingungen im Verlauf von drei bis fünf Tagen zu einer vollständigen Konfluenz. Es erfolgte während diesem Zeitraum ein Wechsel des PneumaCultEx complete Mediums apikal und basal alle zwei bis drei Tage.

Nach Erreichen von 100% Konfluenz wurde das Medium geändert. Hierzu wurde zunächst das PneumaCultEx complete Medium apikal abgenommen, dann apikal 500 µl PBS zugegeben, danach PneumaCultEx complete basal abgenommen und 1 ml PneumaCult ALI+ zugegeben. Danach erfolgte die Abnahme des PBS apikal, sodass nun von der Apikalseite Luftkontakt zu den Zellen bestand (*Air-Liquid-Interface*, ALI). Unter diesen Bedingungen kam es im Verlauf der folgenden drei bis vier Wochen zu einer Differenzierung der basalen bronchialen Epithelialzellen. Es erfolgte alle zwei bis drei Tage ein Mediumwechsel und ein apikales Waschen der Zellen mit PBS. Zudem wurde immer gleichzeitig mit den Mediumwechsel eine transepitheliale Widerstandsmessung durchgeführt. Nach etwa drei Wochen zeigten sich erste zilientragende Zellen. Ab diesem Zeitpunkt wurde das Medium von antibiotikahaltigem PneumaCultALI+ auf antibiotikafreies PneumaCultALI gewechselt, sodass die Zellen vor Beginn der Infektionsexperimente mindestens fünf Tage keinem Antibiotikum ausgesetzt waren. Eine vollständige Differenzierung mit flächigen Zilienbewegungen war nach etwa vier Wochen zu sehen.



**Abbildung 3: Differenzierung pBECs in ALI**

### 3.1.7 Messung des transepithelialen Widerstandes

Die Messung des transepithelialen Widerstandes (transepithelial electrical resistance, TEER) ist eine bewährte Methode zur quantitativen Bestimmung des interzellulären Zusammenhalts. Der TEER dient als Indikator einer verbundenen Zellschicht. Er steigt durch Ausbildung von *tight junctions* und indirekt durch die Differenzierung der Zellen in ALI-Zellkultur an.<sup>150</sup>

Während der Differenzierungsphase der Zellen in der ALI-Zellkultur wurde bei jedem Mediumwechsel eine TEER-Messung durchgeführt. Dafür wurden zunächst 500 µl PBS apikal zugegeben, danach das Medium basal entfernt und durch 1 ml PBS ersetzt. Anschließend erfolgte ein apikales Waschen. Mittels mehrfacher Spülung der apikalen Flüssigkeit durch Aufnahme und Abgabe durch eine Pipette konnten apikale Zellsekretionen und Debris entfernt werden. Die apikale Flüssigkeit wurde dann verworfen und erneut 500 µl frisches PBS zugegeben. Der gesamte Waschvorgang wurde dreimal wiederholt. Nach dem letzten Waschvorgang waren 500 µl PBS in der apikalen Kammer und 1 ml PBS in der basalen Kammer. Parallel wurden die Elektroden des TEER-Messgerätes für 5 min in 70% Ethanol desinfiziert und anschließend mehrfach in PBS getaucht um Ethanol-Reste zu entfernen. Dann wurden die Elektroden des Messgerätes so platziert, dass die kürzere Messelektrode im Insert und damit knapp oberhalb der apikalen Seite der Zellmembran und die längere Elektrode außerhalb des Inserts lag. Vom gemessenen Widerstand wurde ein ebenfalls gemessener Leerwert abgezogen. Dieser wurde bestimmt, indem die TEER Messung wie oben beschrieben mit 500 µl PBS in der apikalen Kammer und 1 ml PBS in der basalen Kammer an einem Transwell®-Insert ohne Zellen durchgeführt wurde. Zur Berechnung des Widerstandes pro Fläche wurde das Ergebnis mit einem Ausgleichfaktor multipliziert, der die Fläche der Transwell®-Insert-Membran berücksichtigte.

$$(R_{\text{Insert}} - R_{\text{Leerwert}}) \times 1,1/\text{cm}^2$$

### **3.1.8 Verifizierung der Mukusbildung mittels Dotblot**

Um die zunehmende Differenzierung zu mukus-bildenden Becherzellen und die damit einhergehende zunehmende Mukusproduktion nachweisen zu können wurde die im Verlauf beginnende und ansteigende Produktion des Glykoproteins Mucin5AC mittels Dotblot dargestellt. Hierfür wurde an den Tagen 3, 10, 17 und 24 nach Beginn des ALI, vor dem normalen apikalen Waschen der Zellen, mit jeweils 100 µl PBS gespült und die Spülflüssigkeit asserviert (bei -20°C). Nach dem Auftauen wurden jeweils 10 µl auf eine Amersham Protran Nitrocellulosemembran aufgetragen und 10 Minuten trocknen lassen. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran mit 3% BSA+TBS-T für 1 h abgesättigt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit gegen das Zielprotein gerichtete Anti-Mucin5AC-Antikörper (1:250) für 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 Minuten mit TBS-T gewaschen. Danach wurde der Zweitantikörper aufgetragen (Goat-anti-Mouse, 1:5000), welcher spezifisch an die F<sub>c</sub>-Region des Erstantikörpers bindet und das Reporterenzym Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP) enthält. Anschließend erneut drei Waschschrte mit TBS-T für jeweils 10 Minuten. Hiernach erfolgte die Entwicklung. Dafür wurde zunächst ECL-Detektionsreagenz, welches von HRP umgesetzt wird hinzugegeben und für 1 Minute inkubiert. Im Geldokumentationssystem Fusion Fx wurde das Ergebnis detektiert und dokumentiert.

### **3.1.9 Bestimmung der Zellzahl im Transwell-Insert**

Hierfür wurde in ein mit ausdifferenzierten Zellen bedecktes Transwell-Insert 250 µl Trypsin gegeben. Nach 10 Minuten Inkubation und mehrfachem Abspülen der Transwell-Membran wurde das Trypsin mit der doppelten Menge SBTI neutralisiert. Anschließend Zellzählung in Neubauer Zählkammer.

## **3.2 Bakterien**

### **3.2.1 Anzucht auf Blutagar**

Zur Anzucht für Experimente und zur Vervielfältigung wurden die *P. aeruginosa*-Stämme von -80 °C auf Eis aufgetaut. Es wurde mittels ausgeglühter Impföse jeweils eine bis zwei Ösen Bakterienlösung auf eine Blutagarplatte gebracht und mittels 3-Ösen-Vereinzelungsausstrich ausgestrichen. Es erfolgte dann eine Inkubation bei 37 °C über Nacht.

### **3.2.2 Vervielfältigung und Lagerung der Bakterien**

Zur Vermehrung der Bakterien wurden sie wie oben beschrieben angezüchtet. Zur Lagerung wurde 1 ml steriles STGG-Medium in einem 1,5 ml Kryolagerungsfläschchen mit 3 Ösen Bakterien einer Blutagar-Übernachtskultur angeimpft. Die Suspension wurde daraufhin sorgfältig gemischt und anschließend bei -80 °C eingefroren.

### **3.2.3 Einstellung der Bakterienkonzentration**

Zur reproduzierbaren Einstellung der Multiplizität der Infektion (MOI) musste die Anzahl der Bakterien bekannt sein, welche in dem jeweiligen Experiment eingesetzt werden sollte.

Hierfür wurde zunächst für jeden Stamm einzeln die Bakterienkonzentration einer Bakterienlösung mit einer festgelegten optischen Dichte mittels Tischphotometer bestimmt. Dafür wurden von einer Blutagar-Übernachtskultur des jeweiligen Bakterienstamms mehrere Ösen mittels ausgeglühter Impföse in 10 ml steriles PBS in einen 15 ml Falcon übertragen. Anschließend wurde gemischt und zentrifugiert (1000 rcf, 5 min, 23 °C). Da insbesondere bei den mukoiden Pseudomonasstämmen nach der Zentrifugation über dem Bakterienzellpellet eine Alginatschicht sichtbar wurde erfolgte bei allen Bakterienstämmen ein Herauswaschen dieser nicht-zellhaltigen Anteile. Hierzu wurde das Pellet drei Mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Bakterienzellpellet in PBS

gelöst. Zur Bestimmung der optischen Dichte wurden 0,5 ml dieser Bakterienlösung in eine Messküvette gegeben. Die Absorption eines Lichtstrahls mit einer Längswelle von 600 nm wurde gemessen. Von diesem Wert wurde ein zuvor mit PBS gemessener Leerwert subtrahiert. Das Ergebnis entspricht der optischen Dichte  $OD_{600}$ . Je nach Ergebnis der photometrischen Messung wurde die initiale Bakterienlösung soweit weiter verdünnt und repetitiv gemessen bis die  $OD_{600} = 0,4$  war.

Zur Bestimmung der Bakterienkonzentration wurde die auf  $OD_{600} = 0,4$  eingestellte Bakterienlösung  $1:10^5$  mit PBS verdünnt und 100  $\mu$ l der verdünnten Lösung auf einer Blutagarplatte mittels Drigalskispatel ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht erfolgte die Zählung der Einzelkolonien. Dies wurde für jeden Bakterienstamm dreimal durchgeführt und der Mittelwert der Messungen gebildet.

### **3.3 Viren**

#### **3.3.1 Anzucht der Rhinoviren**

Für die Anzucht von Rhinovirus HRV-1B und HRV-16 erfolgte zunächst die Aussaat von HeLa Ohio Zellen in Zellkulturflaschen mit DMEM + 10% FCS Medium. Nachdem die Zellen eine Konfluenz von 70% erreicht hatten, wurde das Medium gewechselt auf 15 ml DMEM + 2 % FCS. Dann erfolgte die Infektion mit HRV-16 oder HRV-1B mit einer Multiplizität der Infektion (multiplicity of infection, MOI) von 0,1. Anschließend wurden die Zellen im Brutschrank bei 33 °C und 5% CO<sub>2</sub> für 2 Stunden inkubiert. Danach erfolgte die Abnahme des Mediums und es wurde zwei Mal mit jeweils 15 ml PBS gewaschen. Dann wurde erneut 15 ml DMEM + 2 % FCS zugegeben und weiterhin bei 33 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Inkubation erfolgte bis mikroskopisch ein zytopathischer Effekt bei 90-95% der Zellen erkennbar war.

Um den Virus zu ernten wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgeschabt und zusammen mit dem Medium in einen 50 ml Falcon überführt. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 1800 rcf für 10 min bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde anschließend in einen neuen 50 ml Falcon überführt. Um die infizierten, aber noch intakten Zellen zu öffnen und intrazellulär gelegenen Viren freizusetzen

wurde 2 ml DMEM + 2% FCS zugegeben, die Suspension in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und anschließend wieder aufgetaut. Nun erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 1800 rcf für 10 min bei Raumtemperatur und es wurde erneut der Überstand abgenommen und mit dem zuvor gewonnenen Überstand zusammengeführt und gemischt.

Zur Konzentration der Viruspools und Aufreinigung wurden Amicon Ultra Centrifuge Filter (Molecular Weight Cut-off 30 kDa) genutzt. Die Filter wurden zunächst in 70% Ethanol desinfiziert und anschließend drei Mal mit PBS gespült. Der Filter konnte dann mit 15 ml des Ausgangsvirusmaterials beladen werden. Dann erfolgte eine Zentrifugation mit 1800 rcf so lange bis nur noch 1,5 ml Überstand im Filter verblieben. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

### **3.3.2 Bestimmung des Virus-Titers**

Die Virustiterbestimmung erfolgte in mindestens drei unabhängigen Experimenten an HeLa Ohio Zellen. Diese wurden in DMEM + 10 % FCS in eine 96 well Platte ausgesät und bei 80 % Konfluenz infiziert. Der Viruspool wurde hierfür in DMEM + 2% FCS verdünnt ( $10^2$  bis  $10^{11}$ ). Pro Verdünnung wurden 8 Wells infiziert und bei 33 °C für 2 Stunden bei 5% CO<sub>2</sub> bebrütet. Nach zwei Stunden wurden pro Well jeweils 100 µl DMEM + 2% FCS zugegeben und die Platten für fünf weitere Tage bei 33 °C inkubiert.

Anschließend wurden die Wells mikroskopisch begutachtet und bei vorhandenem zytopathischen Effekt als positiv, ansonsten als negativ eingestuft. Die Berechnung der TCID<sub>50</sub> erfolgte mittels Spearman-Kärber Formel.<sup>151</sup>

### **3.4 Bakteriell-virale Coinfektionen**

Für die Durchführung einer Coinfektion von *P. aeruginosa* und Rhinoviren erfolgte zunächst wie zuvor beschrieben die Differenzierung der pBECs in ALL-Kulturen. Nachdem eine Differenzierung erreicht war wurde zunächst eine chronische bakterielle Infektion simuliert und hieran anschließend die simultane Infektion mit *P. aeruginosa* und Rhinoviren durchgeführt (Abbildung 4).

Zur Simulation einer chronischen Infektion mit *P. aeruginosa* wurde für einen Zeitraum von 16 Tagen alle 4 Tage (Tag 0, 4, 8, 12) eine bakterielle Infektion durchgeführt. Zunächst wurde dafür das Medium (PneumaCult ALI) gewechselt und dreimalig apikal mit jeweils 500 µl PBS gewaschen. Anschließend wurden pro Insert apikal jeweils  $10^3$  CFU *P. aeruginosa* in 50 µl PBS incl. 25 µg/ml Tobramycin zugegeben. Ausgehend von  $2 \times 10^6$  Zellen pro Insert, entspricht dies einer MOI von 0,0005. Bei den Kontrollen ohne bakterielle Infektion wurde stattdessen entweder nur 50 µl PBS und Tobramycin 25 µg/ml zugefügt.

Anschließend wurden die infizierten ALI-Kulturen wieder bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> im Zellkulturschrank inkubiert.

Es wurden nun täglich drei Waschvorgänge an der Apikalseite mit 500 µl PBS durchgeführt und anschließend 50 µl PBS und Tobramycin 25 µg/ml zugegeben. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Nach 16 Tagen erfolgte die Koinfektion mit Rhinoviren. Hierfür wurden nach dem Mediumwechsel und dreimaligem Waschen  $2 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml Rhinoviren (HRV-16 oder HRV-1B) auf die Apikalseite der Zellen gegeben, entsprechend einer MOI von 1. Trotz Aufreinigung der Viren im Zuge der Herstellung war es denkbar, dass zelluläre Faktoren der Anzuchtzellen einen Effekt auf die infizierten pBECs gehabt haben könnten. Durch Einsatz von UV-inaktivierten Kontrollen konnte dies ausgeschlossen werden.

Die Viren wurden jeweils so in PBS gelöst, dass das zugegebene Gesamtvolumen jeweils 100 µl/well betrug. Bei Proben ohne Virusinfektion wurde stattdessen 100 µl PBS zugegeben. Um die optimale Temperatur zur Infektion mit Rhinoviren zu ermöglichen erfolgte anschließend eine zweistündige Inkubation bei 33 °C, 5% CO<sub>2</sub>.<sup>152</sup>

Anschließend wurde die apikale Flüssigkeit wieder abgenommen und eine bakterielle Infektion, wie zuvor beschrieben, durchgeführt. Daraufhin wurde für 48h bei 33 °C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 48 Stunden wurde das Experiment beendet, das Medium bei -20 °C eingefroren zur späteren Auswertung. Die Zellen wurden durch Zugabe von 400 µl RNA-Lysepuffer aufgelöst und in sterilen Mikroreaktionsgefäßen bei -80 °C aufbewahrt bis zur RNA-Isolation.



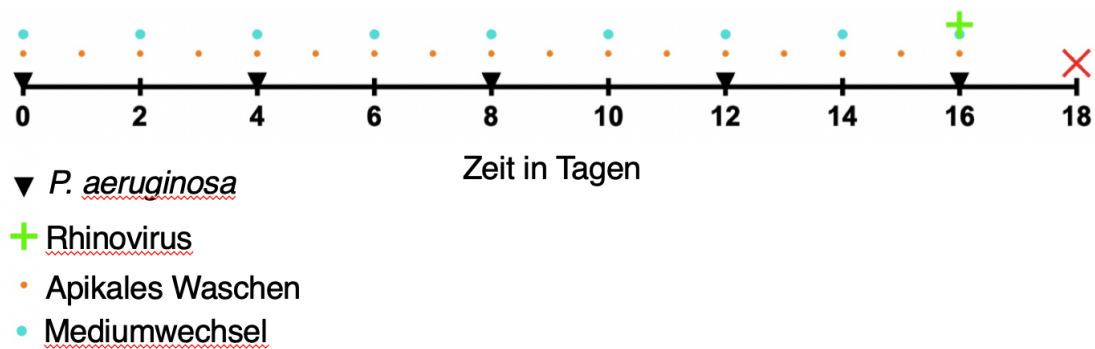


Abbildung 4: Zeitlicher Ablauf der Infektionsexperimente

### 3.5 Mischexperimente mit rekombinantem Interleukin-6

Um die Ursache der nahezu vollständig depletierten IL-6 Proteinkonzentrationen in Coinfektionen von HRV mit einem nicht-mukoiden *P. aeruginosa*-Isolat zu untersuchen, wurden folgende Mischexperimente durchgeführt. Zunächst wurden jeweils 15  $\mu$ l Zellkulturmedium aus den Infektionsexperimenten gemischt mit 15  $\mu$ l rekombinantem IL-6. Als Kontrolle erfolgte das Mischen von Zellkulturmedium aus den Infektionsexperimenten mit der gleichen Menge Wasser. Um einen möglichen Abbau von rekombinantem IL-6 durch Metalloproteasen zu inhibieren wurden diese Experimente zusätzlich durchgeführt mit Zugabe des Inhibitors Phosphoramidon (85  $\mu$ M).

Die so gemischten Proben wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die IL-6 Konzentration der verschiedenen Bedingungen mittels ELISA bestimmt. Außerdem wurden identische Mischexperimente noch mit Hitze-inaktiviertem Zellkulturmedium durchgeführt. Hierfür wurde das Zellkulturmedium aus den Infektionsexperimenten zunächst bei 95 °C für 5 Minuten erhitzt und anschließend abkühlen gelassen. Erst dann erfolgte das Mischen mit rekombinantem IL-6 wie zuvor beschrieben.

## 3.6 Auswertung

### 3.6.1 Messung der Zytokinkonzentrationen mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Die quantitative Auswertung der Interleukin-Konzentrationen erfolgte mittels antikörperbasiertem Nachweisverfahren (Sandwich-ELISA).

Für die Ermittlung von Interleukin 6 wurde das Human IL-6 Uncoated ELISA-Kit von Invitrogen benutzt, für Interleukin 8 das Human IL-8 Uncoated ELISA-Kit. Der Ablauf war bei beiden äquivalent und erfolgte exakt gemäß Kit Manual.

Es wurde eine Corning Costar™ 96-Well ELISA-Platte mit einem Fängerantikörper (*capture antibody*) beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am Folgetag wurde die Platte zunächst dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Als nächster Schritt erfolgte die Inkubation mit ELISASPOT-Blockierlösung (*blocking solution*) für eine Stunde bei Raumtemperatur, um die freien Bindungsstellen abzusättigen. Nach einem weiteren Waschschrift wurde Interleukin-Standard in einer seriellen Verdünnungsreihe sowie die zu untersuchenden Proben aufgetragen. Es erfolgte eine Inkubation für zwei Stunden. Nach erneutem Waschen wurde der Detektionsantikörpers (*detection antibody*) hinzugegeben und für eine Stunde inkubiert. Danach wurde ein sekundärer, Reporterenzym-gekoppelter Antikörper, Streptavidin-Meerrettichperoxidase (*Horseradish-Peroxidase, HRP*) hinzugefügt, der an den Detektionsantikörper koppelte und die Reduktion von Peroxiden katalysierte. Es folgte eine Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur und anschließend ein weiterer Waschschrift. Nach Zugabe von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)-Lösung und Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur nahm die Lösung eine bläuliche Farbe an, deren Intensität von der Konzentration von HRP und damit indirekt auch von der Konzentration des zu quantifizierenden Proteins abhängig war. Die Katalysereaktion der Peroxidase wurde durch Zugabe von Schwefelsäure beendet. Die Lösung erfuhr hierdurch einen Farbumschlag ins Gelbe, deren Intensität bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen werden konnte. Der Hintergrund wurde bei 570 nm gemessen. Die Auswertung erfolgte mittels Punkt-zu-Punkt Auswertung.

### 3.6.2 Messung der Zytokinkonzentrationen mittels Cytometric Bead Array

Die Cytometric Bead Array (CBA) Technologie basiert auf der Durchflusszytometrie und ermöglichte die Bestimmung mehrerer Zytokine gleichzeitig.

Polysterolpartikel (*beads*), die sich anhand Ihrer mittleren Fluoreszenzintensität unterscheiden, waren dabei an monoklonale Fängerantikörper gebunden, jeweils spezifisch für das zu bestimmende Analyt. Wird das Analyt von diesem Antikörper gebunden und von einem zweiten Antikörper (Detektionsantikörper), an den ein weiterer Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, erkannt, gab dessen mittlere Fluoreszenzintensität die Menge des gebundenen Analyten im Vergleich zu einer Standardkurve wieder.

Der CBA wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt (BD Bioscience).

Zunächst wurde für die Zytokinstandards eine serielle Verdünnungsreihe hergestellt.

Dann wurde ein Mastermix aus *Testbeads* Lösung und *Test Capture Beaddiluent* hergestellt und je 50 µl /well des Beadmastermix in einer 96 well-Platte verteilt. Danach wurden 50 µl der Standardreihe oder 50 µl der jeweiligen Probe hinzugegeben. Es folgte eine Stunde Inkubation im Dunkeln bei 23 °C. Im nächsten Schritt wurden 50 µl des Detektionsantikörpers zugegeben. Der Ansatz wurde für weitere zwei Stunden bei 23 °C im Dunkeln inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurden auf jedes Well 200 µl Waschpuffer gegeben und die Platte bei 300 x g für 10 Minuten bei 23 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, das Beadspellet erneut in 200 µl Waschpuffer resuspendiert. Die darauffolgende Messung erfolgte mit dem FACS Verse (BD). Für die Auswertung der Daten wurde die FCAP Software verwendet. <sup>153,154</sup>

### 3.6.3 RNA-Isolation

Zur RNA-Isolation wurde das peqGOLD Total RNA Kit verwendet.

Zellysate wurden auf eine spezielle Säule geladen, deren Membran DNA bindet (*DNA Removing Column*), und anschließend bei 12000 x g zentrifugiert. Hierdurch wurde die DNA aus dem Zellysat entfernt, der Säulendurchfluss wurde in einem 2 ml Mikroreaktionsgefäß aufgefangen und in gleichen Anteilen mit 70% Ethanol gemischt. Dann wurde die Mischung auf eine RNA-bindende Kolumne (*RNA Binding Column*) geladen, bei 10000 x g zentrifugiert und der Säulendurchfluss anschließend verworfen. Die nun auf der Kolumnenmembran haftende RNA wurde anschließend in zwei Waschschritten gereinigt (*RNA Wash Buffer I* und *II*). Hierfür wurde jeweils der Waschpuffer auf die Kolumne geladen und bei 10000 x g für 15 s zentrifugiert. Nach 2 min Trocknen durch Zentrifugation bei 10000 x g wurde die RNA in 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert (1 min, 5000 x g). Die Messung der RNA-Konzentration wurde mittels NanoDrop ND1000 Mikrovolumen-Spektralphotometer durchgeführt. Nach Zugabe von 2 µl der Proben in die Messeinheit fand die Konzentrationsbestimmung photometrisch mit Hilfe der Extinktion der Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm statt. RNA-Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C aufbewahrt.

### 3.6.4 cDNA Synthese

Zur Durchführung einer quantitativen PCR zur Bestimmung der Viruslast von RNA-Viren und relativen Quantifizierung Gentranskription einzelner Gene, war ein Umschreiben viraler RNA und zellulärer mRNA in komplementäre DNA (complementary DNA = cDNA) notwendig. Die Synthese der cDNA wurde mittels *iScript™ gDNA Clear cDNA Synthesis Kit* durchgeführt. Vor der Durchführung der reversen Transkription zur cDNA Synthese wurde die genomische DNA mittels DNase-Verdau entfernt. Hierfür wurde zunächst die RNA so mit RNase-freiem Wasser verdünnt, dass in 14 µl exakt 100 ng RNA gelöst waren, anschließend wurden 2 µl *DNase Mastermix* zugegeben. Danach erfolgte die Inkubation im Thermozykler: Zunächst wurde für 5 min ein DNase-Verdau bei 25 °C durchgeführt, anschließend eine DNase Inaktivierung bei 75 °C. Dann wurde

zur DNase-behandelten RNA-Vorlage *iScript Reverse Transcription Supermix* hinzugegeben, welcher Reverse Transkriptase aus murinem Leukämievirus (MMLV) beinhaltet, die RNA in cDNA umschrieb. Zur Synthese wurden zunächst bei 25 °C für 5 min Oligonukleotide als Startpunkte der reversen Transkription angelagert. Dann erfolgt die eigentliche reverse Transkription bei 46 °C für 20 min, gefolgt von einer Inaktivierung der Reversen Transkriptase bei 95 °C für 1 min. Die cDNA wurde bis zur weiteren Benutzung bei -20 °C gelagert. Zum Einsatz in der quantitativen Echtzeit PCR erfolgte eine 1:5 Verdünnung der cDNA in Wasser.

### 3.6.5 Quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion

Die quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion (quantitative real time Polymerase chain reaction, qPCR) ist eine Methode, welche die Nukleinsäureamplifikation einer klassischen PCR mit der Detektion und Quantifizierung des Amplicons verbindet.<sup>155</sup> Dies geschieht in Echtzeit, das heißt während dem Amplifikationsprozess, mittels Messung der Fluoreszenzintensität, die zur Produktmenge proportional war und somit auch eine Quantifizierung der Ausgangs-DNA erlaubte. Um die Fluoreszenz zu erzeugen werden zusätzlich zu *Primern* weitere Oligonukleotide eingesetzt, sogenannte Sonden (*Probes*). Diese Sonden hybridisieren an eine Nukleotidsequenz zwischen Vorwärts- und Rückwärtsprimern und enthalten ein Fluorophor und einen sogenannten *Quencher*. Solange Fluorophor und Quencher in enger räumlicher Nähe sind, löscht der Quencher durch Fluoreszenzlöschung die Fluoreszenz des Fluorophors aus. Da die Taq-Polymerase zusätzlich zur Polymerasefunktion auch eine 5'→3' Exonukleaseaktivität aufweist, baut sie das 5'-Ende der *Probe* ab, sodass es zur Trennung von Fluorophor und Quencher kommt und die Fluoreszenz gemessen werden kann.

Für die anschließenden Analysen wurde der sogenannte *Cycle Threshold* (CT-) Wert gemessen, das heißt der erste Zyklus, bei dem die gemessene Fluoreszenz einen bestimmten Schwellenwert überschritt. Die CT-Werte waren also invers-proportional zur DNA-Menge. Eine vollständige Liste der eingesetzten Primer und Probes findet sich unter Material 2.7. Die Durchführung der qPCR erfolgte

als Duplex-PCR mit Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als interner Kontrolle. Es wurden jeweils 10 µl SsoAdvanced Universal Probes Supermix/ well eingesetzt, 0,8 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer der jeweiligen Messung (20 µM), 0,5 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer für GAPDH (10 µM) sowie jeweils 0,5 µl *Probe* (10 µM) der Messung und GAPDH.

### 3.6.6 Messung der Interleukinkonzentration und Interferonexpression

Die Messung der Genexpression erfolgte mittels relativer Quantifizierung. Hierfür wurden die in der PCR gemessenen CT-Werte zunächst gegen die konstitutiv exprimierte, nicht regulierte interne Kontrolle (*housekeeping gene*) GAPDH der gleichen Bedingung normiert ( $Ct \text{ des Zielgens} - Ct \text{ GAPDH} = \Delta CT$ ). Anschließend wurde von diesem  $\Delta CT$  der zu messenden Bedingung das  $\Delta CT$  der Kontrollbedingung (nicht infizierte Probe) subtrahiert. ( $\Delta CT(\text{Bedingung}) - \Delta CT(\text{Kontrolle}) = \Delta\Delta CT$ ). Der relative Expressionsunterschied des Gens (Ratio) ergab sich somit aus der Formel  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .<sup>156</sup>

### 3.6.7 Viruslastbestimmung

Die Bestimmung der Viruslast erfolgte durch Messung der absoluten Anzahl der Rhinovirus-RNA anhand einer Standardkurve, die auf einer Verdünnungsreihe von Genfragmenten (sogenannte „gBlocks“) bekannter Konzentration beruhte.

## 3.7 Statistik

Zur statistischen Auswertung der Infektionsexperimente wurden die Daten der CBA, ELISA und qPCR- Messungen von sechs unabhängigen Experimenten (n=6) verwendet. Jedes unabhängige Experiment enthielt pro Bedingung ein biologisches Duplikat. Aus den beiden Werten wurde der arithmetische Mittelwert gebildet. Es wurde dann von diesen Werten der Logarithmus zur Basis 10 gebildet. Von den dekadisch logarithmierten Werten wurde nun eine Zweiweg-Varianzanalyse (2-way-ANOVA) durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde

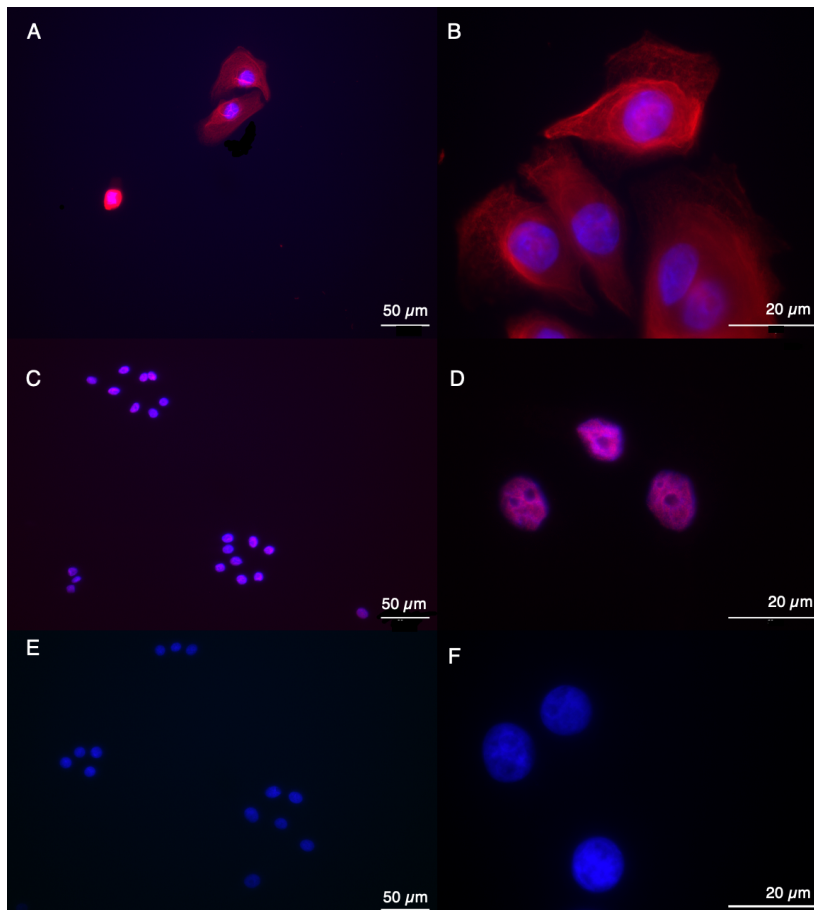
mittels Tukey's multiplen Vergleichstest ermittelt. Dabei wurde das Signifikanzniveau für den Fehler 1. Art auf 0,05 festgelegt.

Zur besseren Verständlichkeit wurde für jede Bedingung der Durchschnitt und die Standardabweichung der nicht logarithmierten Werte angegeben. Die Auswertung der Mischexperimente erfolgte äquivalent, jedoch wurden Daten von drei unabhängigen Experimenten erhoben und es wurden keine biologischen Duplikate verwendet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung der pBECs

Alle isolierten Zellen wurden mittels Immunfluoreszenz charakterisiert und waren positiv für den epithelialen Marker Cytokeratin-5 (Abbildung 5 A und B, rot) und den Basalzellenmarker p63 (Abbildung 5 C und D, rot). Zum Ausschluss mesenchymaler Kontaminationen (Fibroblasten) wurde der Antikörper TE-7 eingesetzt (Abbildung 5 E und F).



**Abbildung 5: Charakterisierung primärer bronchialer Epithelialzellen**

Positiv für Cytokeratin-5 gefärbte Zellen eines CF-Spenders in 20-facher (A) und 100-facher (B) Vergrößerung. Zellen des gleichen Spenders, positiv für p63 markiert (C und D) und negativ für TE-7 (E und F). In allen Aufnahmen Kernfärbung mittels DAPI.



## 4.2 Verifizierung der Differenzierung der pBECs in Air-Liquid-Interface Zellkulturen

### 4.2.1 Mikroskopisch-visuelle Verifizierung der zilientragenden Zellen und Zilienbewegungen

Im Verlauf der Differenzierung kam es zur Ausbildung zilientragender Zellen. In Hämatoxylin-Eosin- gefärbten Schnitten konnten diese dargestellt werden (Abbildung 6).

Diese konnten bei mikroskopischer Kontrolle zunächst vereinzelt beobachtet werden. Im weiteren zeitlichen Verlauf zeigten sich flächige und koordinierte Zilienbewegungen. (Videoaufnahmen können unter den Weblinks oder mittels QR Code in Abbildung 7 geöffnet werden)



**Abbildung 6: Längsschnitt einer differenzierten ALI-Zellkultur**

Längsschnitt, Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Pfeil: Zilien



**Abbildung 7: QR-Code: Videomaterial von differenzierten pBECs in Air-Liquid-Interface-Zellkultur**

Aufnahmen von apikal auf differenzierte ALI-Zellkulturen mit Zilienbewegungen. 10-fache Vergrößerung.  
<https://youtu.be/SGyF4H3gw1s>, <https://youtu.be/tfGOhKKmpQ8>

#### 4.2.2 Nachweis mukus-produzierender Becherzellen

Während der Differenzierung der Zellen im Air-Liquid Interface Modell differenzierten Teile der basalen Zellen zu Becherzellen. Diese produzieren Mukus, der das Glykoprotein Mucin5AC enthält. Der Mukus selbst war bereits makroskopisch auf der Apikalseite der Zellkulturen sichtbar. Mittels Dotblot konnte (wie im Methodenteil 3.1.8 beschrieben) die Bildung des Mukoproteins Mucin5AC nachgewiesen werden. Der erste Nachweis von Mucin5AC erfolgte an Tag 7. Im weiteren zeitlichen Verlauf war Mucin5AC stets nachweisbar. (Abbildung 8)

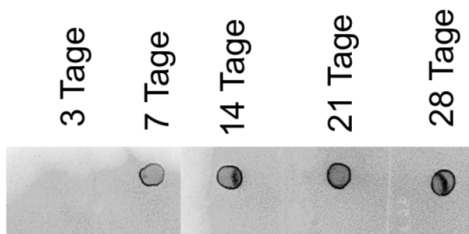


Abbildung 8: Dotblot Mucin5AC

Nachweis des Glykoproteins Mucin5AC mittels Dotblot zur Bestätigung mukus-produzierender Becherzellen

#### 4.2.3 Ergebnisse der Messung des transepithelialen Widerstandes

Während der Differenzierungsphase der Zellen in der ALI-Zellkultur wurde bei jedem Mediumwechsel eine TEER-Messung durchgeführt, welche den interzellulären Zusammenhalt maß und damit indirekt auch den Differenzierungsgrad der Zellschicht widerspiegelte. Direkt nach der Abnahme des apikalen Mediums und damit Schaffung der Air-Liquid-Interface Bedingungen mit Luft an der apikalen Zelloberfläche war kein Unterschied zu einer parallel durchgeführten Leermessung ohne Zellen festzustellen. Im Verlauf der ersten 5 Tage stieg der transepitheliale Widerstand (TEER) nur geringfügig an. So lag der TEER an Tag 5 bei Emphysemzellen bei  $45,8 \pm 31,3$  (Durchschnitt +/- Standardabweichung)  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  und bei Zellen von CF-Spendern bei  $59,4 \pm 22,5$   $\Omega \cdot \text{cm}^2$ . Zu diesem Zeitpunkt bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Spendergruppen. Zwischen Tag 5 und 10 nahm der TEER bei beiden Gruppen deutlich zu, bei Zellen von Emphysempatienten erreichte er  $184,2 \pm 7,0$

$\Omega \cdot \text{cm}^2$ , bei CF-Zellen  $287,0 \pm 54,4 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . Nach Tag 10 stieg der TEER bei Emphysemzellen nur noch geringfügig weiter und erreichte ein Plateau, während es bei CF-Zellen zu einem weiteren Anstieg kam. Der TEER lag bei CF-Zellen anschließend deshalb höher als bei Emphysemzellen (Tag 19: CF:  $229,9 \pm 54,4 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , Emphysem:  $441,6 \pm 59,2 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ,  $p = 0,0002$ ; Tag 24: CF:  $550 \pm 52,4 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , Emphysem:  $225,0 \pm 25,1 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ,  $p < 0,0001$ ).

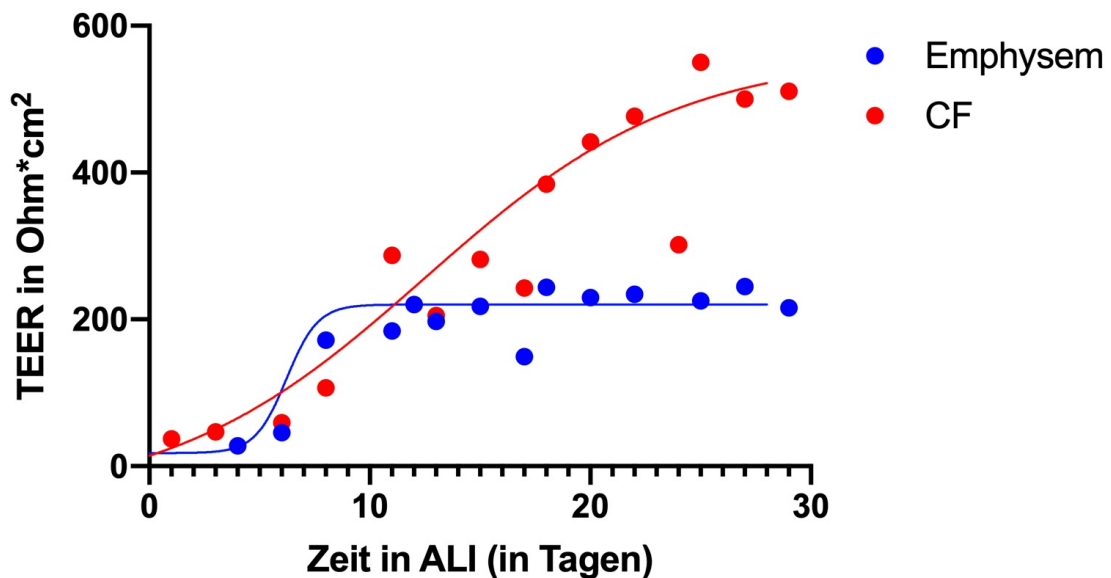


Abbildung 9: Zunahme des transepithelialen elektrischen Widerstandes über die Zeit

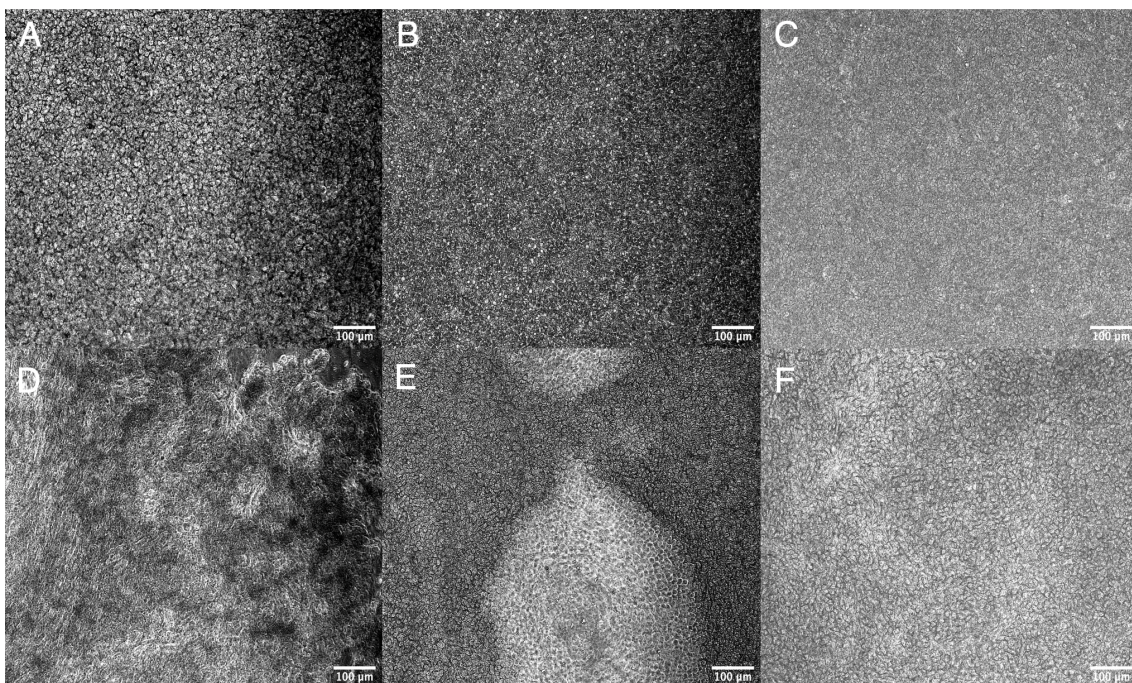
### 4.3 Histologische Beurteilung Infektionsexperimente

Die Infektionsbedingungen der Infektionsexperimente werden im Folgenden abgekürzt (Tabelle 2).

Name	<i>P. aeruginosa</i>	Rhinovirus
PA-/RV-	keine bakterielle Infektion	keine virale Infektion
NM+/RV-	Nicht mukoides klinisches Isolat	keine virale Infektion
M+/RV-	Mukoides klinisches Isolat	keine virale Infektion
PA-/RV+	keine bakterielle Infektion	HRV
PA-/RV+(UV-inaktiviert)	keine bakterielle Infektion	UV inaktivierte HRV
NM+/RV+	Nicht mukoides klinisches Isolat	HRV
M+/RV+	Mukoides klinisches Isolat	HRV

Tabelle 2: Abkürzungen Infektionsbedingungen

Nach Differenzierung der Zellen wurden die Infektionsexperimente wie in 3.4 beschrieben durchgeführt. Eine lichtmikroskopische Beurteilung der Infektionen erfolgte 48h nach Virusinfektion, unmittelbar vor Durchführung der RNA-Lyse und Abnahme des Mediums. Die alleinige Infektion mit antibiotika-inhibiertem *P. aeruginosa* führte zu keiner Schädigung der Zellschicht (Abbildung 10 A-C). Die Bewegungen der Zilien führten wie in den nicht-infizierten Kontrollen zu einem koordinierten, kreisförmigen Transport der apikalen Flüssigkeit sowie des darin enthaltenen Debris. Eine Infektion mit humanen Rhinoviren HRV-16 oder HRV-1B führte zu abgeschwächten und unkoordinierten, teilweise sogar vollständig aufgehobenen Zilienbewegungen. Es zeigte sich ein geringer zytopathischer Effekt, vereinzelte abgelöste Zellen und konsekutiv vermehrt Zelldebris (Abbildung 10 D). Bakteriell-virale Coinfektionen mit einem mukoiden *P. aeruginosa*- Isolat zeigten ein Schädigungsmuster, welches mit dem der alleinigen Virusinfektion vergleichbar war (Abbildung 10 F). Coinfektionen mit einem nicht-mukoiden *P. aeruginosa*- Isolat führten hingegen zu einer deutlichen Zunahme des cytopathischen Effektes mit großflächiger Loslösung der Zellen aus dem Zellverband (Abbildung 10 E). Teilweise war die Ablösung der Zellen so ausgeprägt, dass die PE-Membran der ALI-Inserts sichtbar wurde.



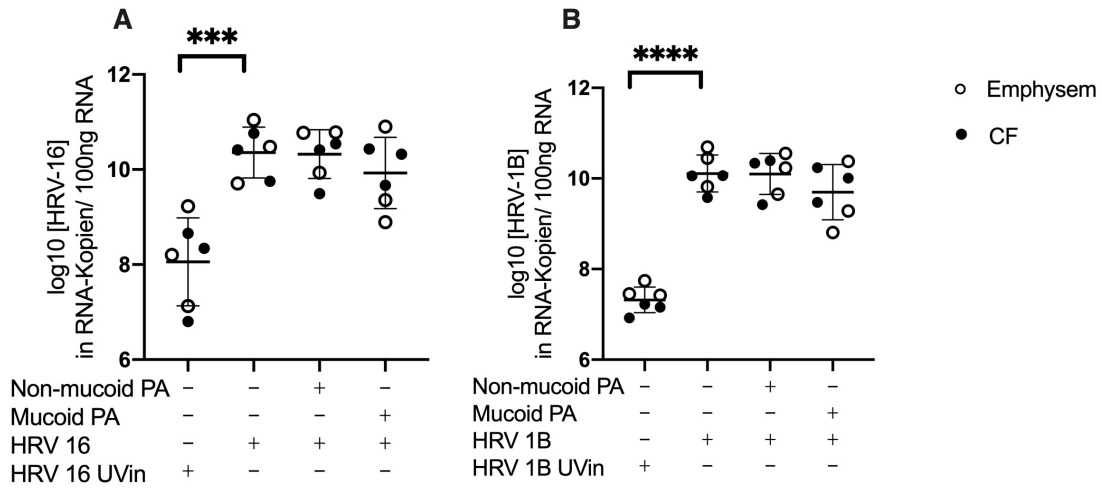
**Abbildung 10: Histologische Beurteilung der Infektionsexperimente**

Differenzierte bronchiale Epithelialzellen wurden für 16 Tage repetitiv mit *P. aeruginosa* und anschließend für 48 Stunden mit Rhinovirus infiziert. Ansicht von apikal, 10-fache Vergrößerung. A: PA-/RV-, B: NM+/RV-, C: M+/RV-, D: PA-/RV+, E: NM+/RV+, F: M+/RV+

#### 4.4 Viruslast

Die Viruslast wurde mittels RT-qPCR wie in 3.6.7 beschrieben ermittelt. Nicht-virusinfizierte Proben blieben stets negativ (nicht dargestellt). Zugabe von UV-inaktivierten Viren führte zu einem Nachweis von Virus-RNA, welcher jedoch statistisch signifikant niedriger war als bei nicht-inaktivierten Viren (Durchschnitt  $\pm$  Standardabweichung: HRV-16: PA-/RV+(UV-inaktiviert)  $8,29 \pm 9,81 \times 10^8$  HRV-RNA-Kopien/100ng RNA vs. PA-/RV+  $3,95 \pm 4,02 \times 10^{10}$  HRV-RNA-Kopien/100ng RNA ( $p < 0,001$ ); HRV-1B: PA-/RV+(UV-inaktiviert)  $2,50 \pm 1,65 \times 10^7$  HRV-RNA-Kopien/100ng RNA vs. PA-/RV+  $1,85 \pm 1,73 \times 10^{10}$  HRV-RNA-Kopien/100ng RNA ( $p < 0,0001$ )) (Abbildung 11). Es gab sowohl bei Infektionen mit HRV-16 (Abbildung 11 A), als auch mit HRV-1B (Abbildung 11 B) keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Viruslast zwischen alleiniger Virusinfektionen und bakteriell-viralen Coinfektionen (HRV-16: PA-/RV+ vs. NM+/RV+ ( $3,45 \pm 2,79 \times 10^{10}$  HRV-RNA-Kopien/100ng RNA), ( $p = 0,999$ ) bzw. M+/RV+ ( $2,35 \pm 3,14 \times 10^{10}$  HRV-RNA-Kopien/100ng RNA), ( $p = 0,764$ ); HRV-1B: PA-/RV+ vs. NM+/RV+ ( $1,79 \pm 1,27 \times 10^{10}$  HRV-RNA-Kopien/100ng RNA), ( $p = 0,999$ ) bzw. M+/RV+ ( $1,18 \pm 1,40 \times 10^{10}$  HRV-RNA-Kopien/100ng RNA), ( $p = 0,419$ )).

Es zeigte sich außerdem kein Unterschied in der Viruslast zwischen Infektionen mit dem humanen Rhinovirus HRV-16 und dem Minorgruppen humanen Rhinovirus HRV-1B. Außerdem fanden sich keine Unterschiede in der Viruslast zwischen virus-infizierten Zellen aus CF- und Emphysem-Explantaten.



**Abbildung 11: Viruslast Infektionsexperimente**

Differenzierte bronchiale Epithelialzellen wurden für 16 Tage repetitiv mit *P. aeruginosa* und anschließend für 48 Stunden mit Rhinovirus infiziert (n=6). Viruslast ermittelt mittels qPCR. A: Infektionen mit HRV-16, B: Infektionen mit HRV-1B. Signifikanzniveau: \*\*\*: p ≤ 0,001, \*\*\*\*: p ≤ 0,0001.

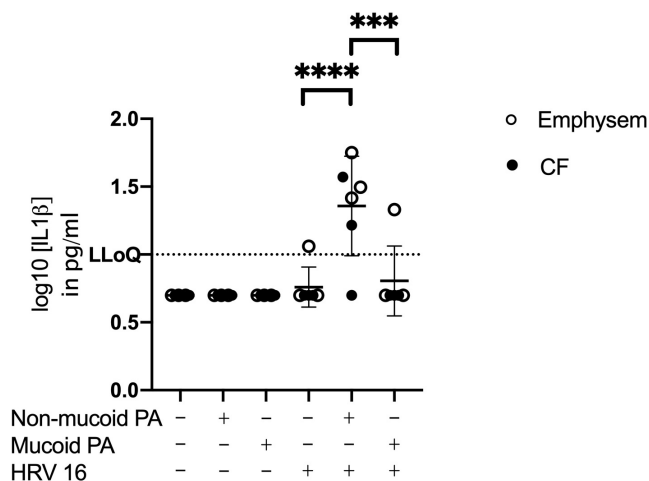
## 4.5 Ergebnisse der Zytokinmessungen mittels Cytometric Bead Array

### 4.5.1 Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )

Die IL-1 $\beta$ -Konzentrationen im basalen Medium nicht virus-infizierter Zellen waren stets unter der quantitativen Nachweisgrenze von 10 pg/ml (lower limit of quantification, LLoQ), während Virusinfektionen mit HRV-16 alleine, sowie eine Coinfektion zusammen mit dem mukoiden klinischen PA-Isolat nur in einem Experiment IL-1 $\beta$  Spiegel oberhalb des LLoQ und somit insgesamt keinen statistisch signifikanten Unterschied aufwiesen (PA-/RV- vs. PA-/RV+ ( $p=0,999$ ); PA-/RV- vs. M+/RV+ ( $p=0,968$ )).

Bei Coinfektionen mit dem nicht-mukoiden PA-Stamm kam es jedoch zu einem signifikanten Anstieg von IL-1 $\beta$  im Vergleich zu Virusinfektion allein, als auch im Vergleich zu rein bakterieller Infektion und nicht infizierter Kontrolle (Durchschnitt  $\pm$  Standardabweichung: NM+/RV+ 33,32 pg/ml  $\pm$  13,29 vs. PA-/RV+ ( $p < 0,0001$ ); vs. NM+/RV- ( $p < 0,0001$ ); vs. Ctrl PA-/RV- ( $p < 0,0001$ )).

Es war kein Unterschied in der IL-1 $\beta$  Antwort zwischen Zellen von Emphysem- und CF-Spendern feststellbar.



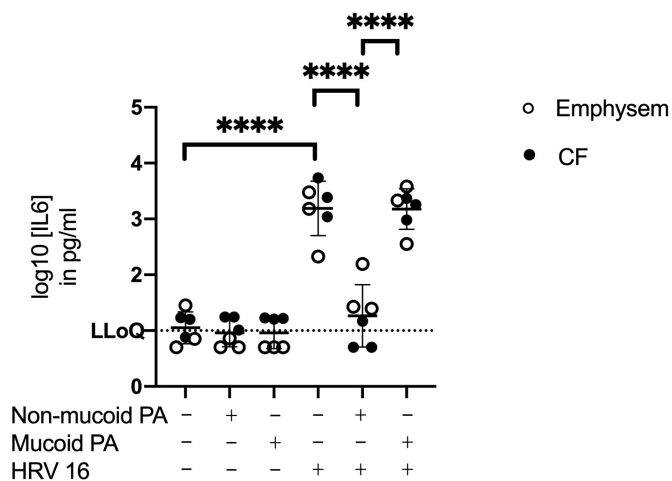
**Abbildung 12: IL-1 $\beta$  Konzentration**

Differenzierte bronchiale Epithelialzellen wurden für 16 Tage repetitiv mit *P. aeruginosa* und anschließend für 48 Stunden mit Rhinovirus infiziert ( $n=6$ ). IL-1 $\beta$  Proteinkonzentration gemessen mittels CBA. LLoQ = lower limit of quantification. Signifikanzniveau: \*\*\*:  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ .

#### 4.5.2 Interleukin-6 (IL-6)

Bei rein bakteriellen Infektionen kam es zu keinem Anstieg von IL-6 im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollen (PA-/RV-  $14,60 \pm 13,56$  pg/ml vs. NM+/RV-  $10,17 \pm 6,31$  pg/ml ( $p > 0,999$ ), bzw. M+/RV-  $10,96 \pm 6,54$  pg/ml ( $p > 0,999$ )).

Eine Infektion mit HRV-16 führte hingegen zu einem deutlichen Anstieg von IL-6. Während eine Coinfektion mit dem mukoiden PA-Isolat in einem vergleichbaren Anstieg von IL-6 resultierte wie die alleinige Virusinfektion, war die IL-6 Antwort bei Coinfektionen mit dem nicht-mukoiden PA-Isolat jedoch fast vollständig aufgehoben (PA-/RV+  $2301,33 \pm 1873,12$  pg/ml vs. PA-/RV- ( $p < 0,0001$ ), vs. M+/RV+  $2301,33 \pm 1873,12$  pg/ml ( $p > 0,999$ ), vs. NM+/RV+  $53,28 \pm 58,81$  pg/ml ( $p < 0,0001$ )).



**Abbildung 13: IL-6 Konzentration**

Differenzierte bronchiale Epithelialzellen wurden für 16 Tage repetitiv mit *P. aeruginosa* und anschließend für 48 Stunden mit Rhinovirus infiziert (n=6). IL-6 Proteinkonzentration gemessen mittels CBA, LLoQ = lower limit of quantification. Signifikanzniveau: \*\*\*:  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ .

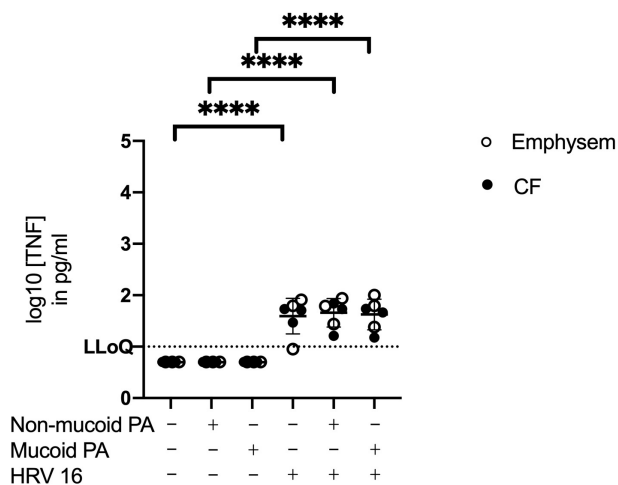


### 4.5.3 Tumornekrosefaktor $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

Uninfizierte Kontrollen zeigten keinen Anstieg der TNF- $\alpha$  Konzentration.

Bakterielle Infektionen mit *P. aeruginosa* ohne virale Coinfektion führten ebenfalls nicht zu einem Anstieg der TNF- $\alpha$  Konzentration über das untere Quantifikationslimit. Infektionen mit HRV-16 führten zu einer statistisch signifikanten Erhöhung. Bakteriell-virale Coinfektionen zeigten ein vergleichbares Maß an TNF- $\alpha$  Konzentrationen im basalen Medium wie rein virale Infektionen. (PA-/RV+  $48,59 \pm 24,92$  pg/ml vs. PA-/RV- ( $p < 0,0001$ ), vs. NM+/RV+  $53,44 \pm 27,21$  pg/ml ( $p = 0,990$ ), vs. M+/RV+  $53,44 \pm 27,21$  pg/ml ( $p = 0,996$ )).

Ein statistisch signifikanter Unterschied in den TNF- $\alpha$  Konzentrationen zwischen Zellen von Emphysem und CF-Spendern war nicht zu verzeichnen.



**Abbildung 14: TNF- $\alpha$  Konzentration**

Differenzierte bronchiale Epithelialzellen wurden für 16 Tage repetitiv mit *P. aeruginosa* und anschließend für 48 Stunden mit Rhinovirus infiziert ( $n=6$ ). TNF- $\alpha$  Proteinkonzentration, gemessen mittels CBA, LLoQ = lower limit of quantification. Signifikanzniveau: \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$

#### 4.5.4 Transforming growth factor $\beta$ (TGF- $\beta$ )

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle kam es weder bei rein bakteriellen Infektionen, noch bei rein viralen Infektionen oder Coinfektion mit dem mukoiden PA-Isolat zu einer signifikanten Änderung der TGF- $\beta$  Konzentration (PA-/RV-  $50,54 \pm 75,07$  pg/ml vs. NM+/RV-  $32,44 \pm 39,01$  pg/ml ( $p=0,999$ ), vs. M+/RV-  $77,56 \pm 117,03$  pg/ml ( $p=0,998$ ), vs. PA-/RV+  $76,31 \pm 111,03$  pg/ml ( $p=0,999$ ), vs. (M+/RV+  $25,35 \pm 17,29$  pg/ml ( $p=0,998$ )).

In Coinfektionen mit dem nicht-mukoiden *P. aeruginosa*-Isolat kam es jedoch zu einem signifikant höheren TGF- $\beta$  Spiegel, auch im Vergleich zu rein bakteriellen Infektionen, während der Unterschied zu rein viralen Infektionen knapp die statistische Signifikanz verfehlte (NM+/RV+  $299,42 \pm 262,21$  pg/ml; vs. NM+/RV- ( $p= 0,0006$ ); vs PA-/RV+ ( $p= 0,0059$ )).

Ein Unterschied in den TGF- $\beta$  Konzentrationen zwischen CF- und Nicht-CF-Zellen war in keiner experimentellen Bedingung nachweisbar.

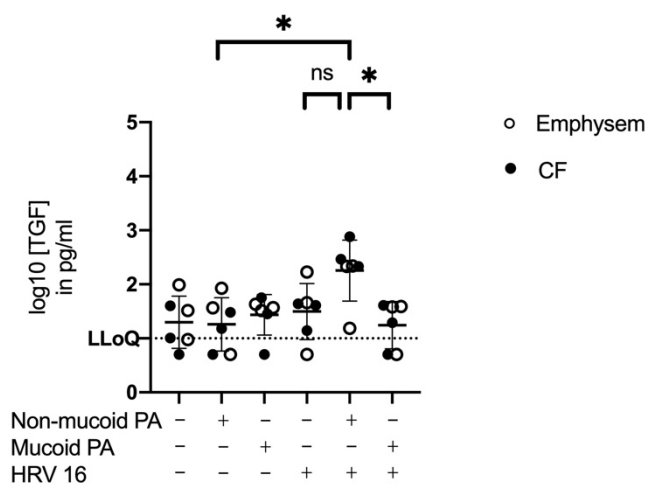


Abbildung 15: TGF- $\beta$  Konzentration

Differenzierte bronchiale Epithelialzellen wurden für 16 Tage repetitiv mit *P. aeruginosa* und anschließend für 48 Stunden mit Rhinovirus infiziert ( $n=6$ ). TGF- $\beta$  Proteinkonzentration, gemessen mittels CBA, LLoQ = lower limit of quantification. Signifikanzniveau: \*:  $p \leq 0,05$ , ns = nicht signifikant

#### 4.5.5 C-X-C motif chemokine 10

Bakterielle Infektionen alleine hatten keinen Anstieg von CXCL-10 zur Folge im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollen. HRV-16 Infektionen führten bereits alleine zu einer signifikanten Zunahme von CXCL-10. (PA-/RV-  $153,44 \pm 68,33$  pg/ml vs. NM+/RV-  $174,17 \pm 84,49$  pg/ml ( $p > 0,999$ ), vs. M+, RV-  $175,71 \pm 147,47$  pg/ml ( $p > 0,999$ ), vs. PA-/RV+  $3,01 \pm 0,24$  ng/ml, ( $p < 0,0001$ ))

Bakteriell-virale Coinfektionen zeigten eine vergleichbare Zunahme wie rein virale Infektionen, jedoch keinen darüber hinaus gehenden Effekt (PA-/RV+ vs. NM+/RV+  $3,02 \pm 1,51$  ng/ml ( $p > 0,999$ ), vs. M+/RV+  $3,30 \pm 0,29$  ng/ml ( $p = 0,849$ )).

Kein Unterschied fand sich zwischen den CXCL-10 Spiegeln der Zellen von CF- und Nicht-CF Spendern.

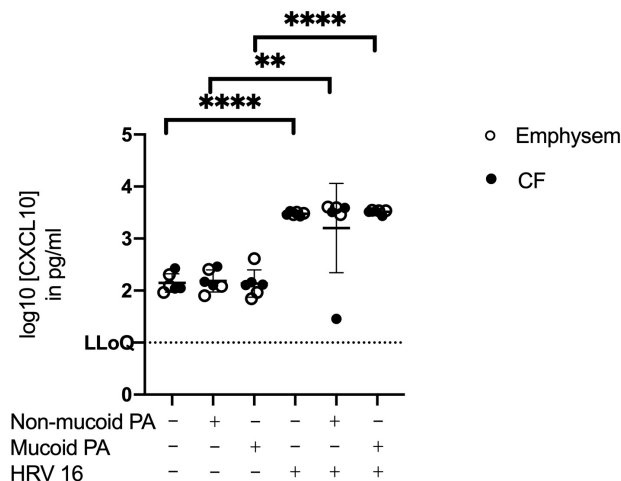


Abbildung 16: CXCL-10 Konzentration

Differenzierte bronchiale Epithelialzellen wurden für 16 Tage repetitiv mit *P. aeruginosa* und anschließend für 48 Stunden mit Rhinovirus infiziert (n=6). CXCL-10 Proteinkonzentration, gemessen mittels CBA, LLoQ = lower limit of quantification. Signifikanzniveau: \*\*:  $p \leq 0,01$ , \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ .

#### 4.5.6 IL-10 und IFN- $\gamma$

Alle Werte der IL-10 und IFN- $\gamma$  Messungen blieben unterhalb des unteren Quantifikationslimits von 10 pg/ml.

#### 4.5.7 C-X-C motif chemokine 8 (IL-8)

Eine rein bakterielle Infektion führte nicht zu einem signifikanten Anstieg von IL-8, während eine alleinige Virusinfektion zu einem signifikanten Anstieg führte.

(PA-/RV-  $3,16 \pm 1,29$  ng/ml vs. NM+/RV-  $4,31 \pm 2,71$  ( $p= 0,971$ ), vs. M+/RV-  $2,38 \pm 1,08$  ( $p= 0,999$ ), vs. PA-/RV+  $8,19 \pm 5,56$  ng/ml; ( $p= 0,046$ ))

Die bakteriell-viralen Coinfektionen lösten einen vergleichbaren Anstieg wie die alleinige Virusinfektion aus. (PA-/RV+ vs. NM+/RV+  $8,26 \pm 2,81$  ng/ml ( $p= 0,997$ ), vs. M+/RV+  $8,26 \pm 2,81$  ng/ml ( $p= 0,999$ ))

Es war kein statistisch signifikanter Unterschied in den IL-8 Spiegeln zwischen Zellen von Emphysem und CF-Spendern feststellbar.

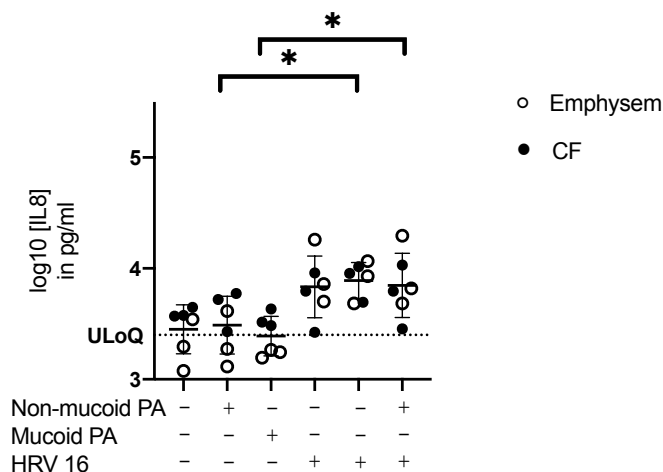


Abbildung 17: IL-8 Konzentration

Differenzierte bronchiale Epithelialzellen wurden für 16 Tage repetitiv mit *P. aeruginosa* und anschließend für 48 Stunden mit Rhinovirus infiziert ( $n=6$ ). IL-8 Proteinkonzentration gemessen mittels CBA. ULQ = upper limit of quantification. Signifikanzniveau: \*:  $p \leq 0,05$

#### 4.6 Ergebnisse der Zytokinmessungen mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Die Ergebnisse der IL-8 Messungen im CBA lagen jedoch größtenteils oberhalb des höchsten Standardwertes von 2,5 ng/ml. Um den Verlust der Trennschärfe im extrapolierten Bereich oberhalb des Messlimits zu eliminieren wurden Bestätigungstests mittels ELISA mit verdünnten Proben durchgeführt.

Ebenfalls sollte die im CBA gemessene deutliche Abnahme der IL-6 Konzentration mit einem zweiten Verfahren validiert werden. Außerdem wurde untersucht, ob die Produktion dieser Schlüsselzytokine sich zwischen Infektionen mit HRV-16 und HRV-1B unterschied. Es wurden außerdem zusätzlich UV-inaktivierte Viruskontrollen untersucht.

#### **4.6.1 Interleukin-8 Konzentration**

Im Vergleich zu den CBA-Messungen konnten durch Verdünnung der Proben (1:2000) insgesamt höhere IL-8 Konzentrationen gemessen werden.

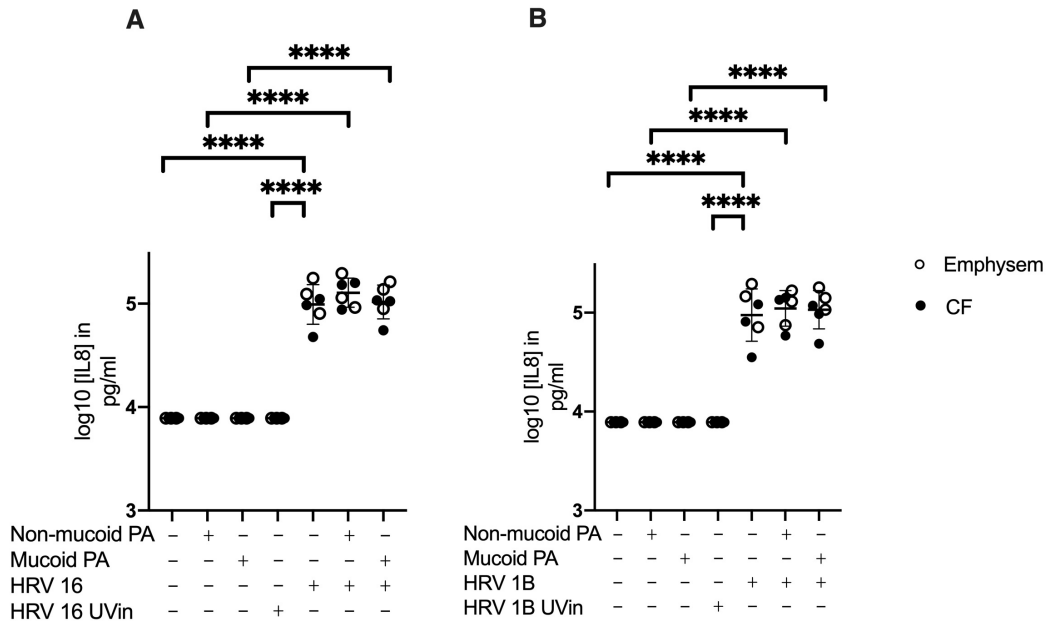
Während eine alleinige Infektion mit Tobramycin-gehemmten *P. aeruginosa* keinen Anstieg der IL-8 Konzentration zur Folge hatte, führte eine alleinige Virusinfektion sowohl mit HRV-16, als auch mit HRV-1B zu einem signifikanten Anstieg. Eine Infektion mit UV-inaktivierten HRV führte zu keiner IL-8 Reaktion.

(HRV-16: PA-/RV- 7,8 ng/ml vs. PA-/RV+  $106,40 \pm 43,41$  ng/ml ( $p < 0,0001$ ); HRV-1B: PA-/RV- vs. PA-/RV+  $108,67 \pm 57,67$  ng/ml ( $p < 0,0001$ )).

Bakteriell-virale Coinfektionen zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied zu alleinigen Virusinfektionen

(HRV-16: PA-/RV+ vs. NM+/RV+  $134,38 \pm 41,96$  ng/ml ( $p = 0,936$ ), vs. M+/RV+  $111,26 \pm 37,79$  ng/ml ( $p > 0,999$ ); HRV-1B: PA-/RV+ vs. NM+/RV+  $119,65 \pm 40,25$  ng/ml ( $p > 0,999$ ), vs. M+/RV+  $115,00 \pm 44,49$  ng/ml ( $p > 0,999$ )).

Außerdem war kein signifikanter Unterschied zwischen Infektionen mit dem Hauptgruppen Rhinovirus HRV-16 und dem Nebengruppen Rhinovirus HRV-1B messbar.



**Abbildung 18: IL-8 Konzentration (Elisa)**

Differenzierte bronchiale Epithelialzellen wurden für 16 Tage repetitiv mit *P. aeruginosa* und anschließend für 48 Stunden mit Rhinovirus infiziert (n=6). IL-8 Proteinkonzentration gemessen mittels ELISA. A: HRV 16, B: HRV-1B. Signifikanzniveau: \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$

## 4.6.2 Interleukin-6 Konzentration

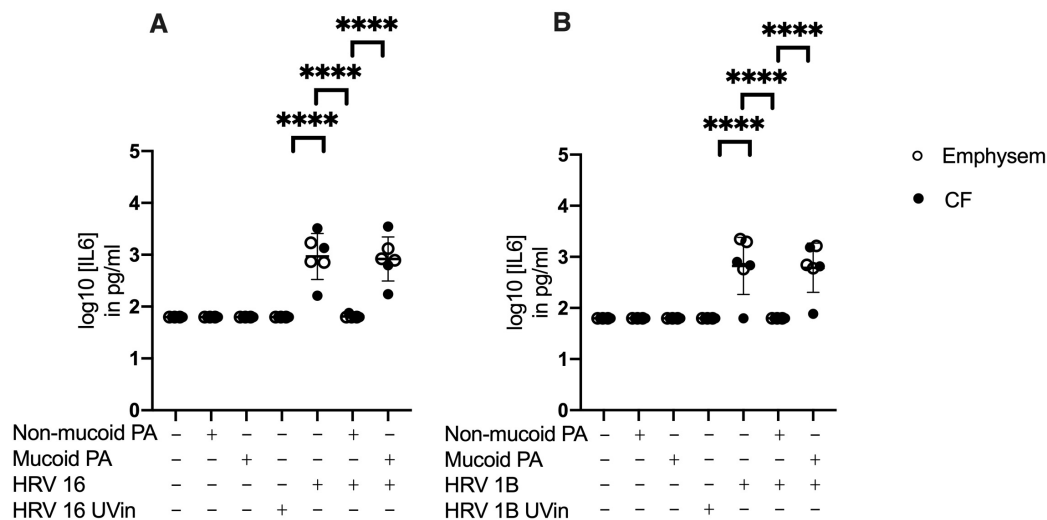
Die Ergebnisse des IL-6 ELISA waren deckungsgleich mit den Ergebnissen des CBA. Es zeigte sich kein Unterschied in der IL-6 Konzentration zwischen unbehandelten Kontrollen und rein bakteriell infizierten Zellen. Eine Virusinfektion mit HRV-16 oder HRV-1B führte zu einem signifikanten Anstieg der IL-6 Konzentration im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen oder der Behandlung mit UV-inaktivierten Viren.

(HRV-16: PA-/RV- <62,5 pg/ml vs. PA-/RV+ 1321,36 ± 1086,22 pg/ml, (p<0,0001), HRV-1B: PA-/RV- vs. PA-/RV+ 1058,03 ± 855,67 pg/ml, (p<0,0001))

Die Reaktion auf eine Coinfektion mit einem mukoiden *P. aeruginosa* Isolat war vergleichbar mit der auf eine alleinige Virusinfektion mit HRV.

Bei Coinfektionen mit einem nicht-mukoiden *P. aeruginosa* Isolat und HRV zeigte sich ein Ausbleiben eines IL-6 Anstiegs über die untere Nachweisgrenze.

(HRV-16: PA-/RV+ vs. M+/RV+ 1224,08 ± 1175,98 pg/ml, (p = 0,999), vs. NM+/RV+ 66,84 ± 10,64 (p<0,0001); HRV-1B: PA-/RV+ vs. M+/RV+ 927,01 ± 679,10 pg/ml, (p= 0,997), vs. NM+/RV+ <62,5 (p<0,0001)).



**Abbildung 19: IL-6 Konzentration (Elisa)**

Differenzierte bronchiale Epithelialzellen wurden für 16 Tage repetitiv mit *P. aeruginosa* und anschließend für 48 Stunden mit Rhinovirus infiziert (n=6). IL-6 Proteinkonzentration gemessen mittels ELISA. A: HRV 16, B: HRV-1B. Signifikanzniveau: \*\*\*\*: p≤ 0,0001.

## 4.7 mRNA-Expression der Schlüsselzytokine

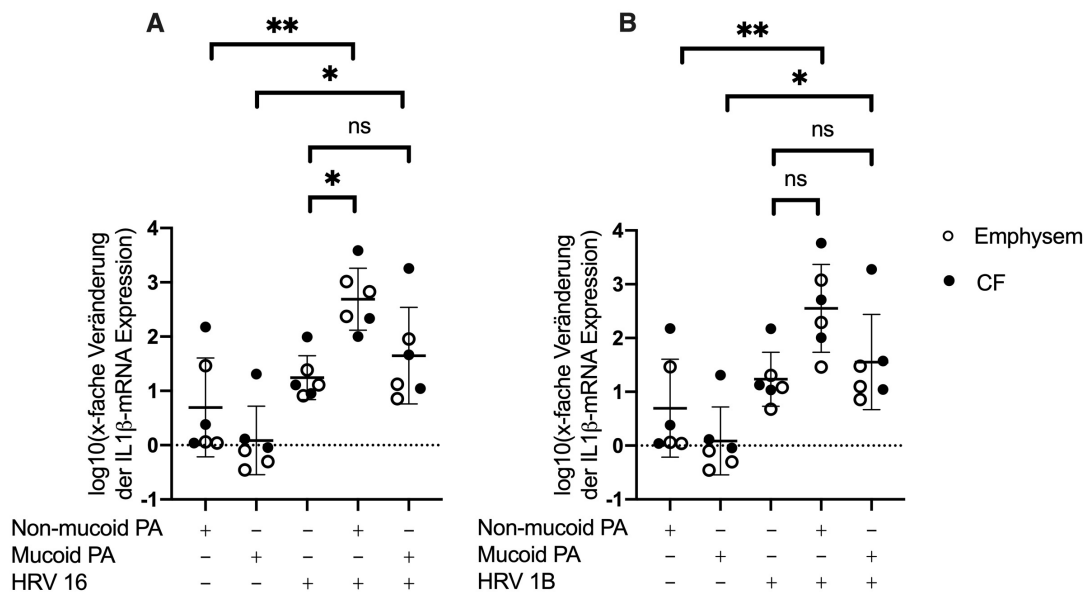
Wie in 3.6.6 beschrieben erfolgte mittels quantitativer Echtzeit-PCR die Bestimmung der mRNA-Level von IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8. Insbesondere sollte ermittelt werden ob der in CBA und ELISA auf Proteinebene nachgewiesene Anstieg von IL-1 $\beta$  und das Ausbleiben eines IL-6 Anstieges in Coinfektionen mit HRV und einem nicht-mukoiden *P. aeruginosa* Isolat bereits auf Transkriptionsebene nachweisbar war.

### 4.7.1 IL-1 $\beta$ mRNA Expression

Bakteriell-virale Coinfektionen führten zu einer signifikant höheren IL-1 $\beta$  mRNA Expression als rein bakterielle Infektionen (HRV-16: NM+/RV+ 1019  $\pm$  1430 vs. NM+/RV- 31  $\pm$  60fache Erhöhung gegenüber uninfizierten Kontrollzellen ( $p=0,0011$ ), M+/RV+ 329  $\pm$  724 vs. M+/RV- 4  $\pm$  8 ( $p=0,0112$ ); HRV-1B: NM+/RV+ 1310  $\pm$  2250 vs. NM+/RV- ( $p=0,0038$ ), M+/RV+ 331  $\pm$  763 vs. M+/RV- ( $p=0,0267$ )).

Der Anstieg der IL-1 $\beta$  mRNA Expression in Coinfektionen mit dem nicht-mukoiden Isolat zusammen mit Hauptgruppen Rhinovirus HRV-16 war zudem signifikant höher als bei rein viraler Infektion, während in Kombination mit Rhinoviren der Minorgruppe die statistische Signifikanz knapp verfehlt wurde. In Coinfektionen mit dem mukoiden Isolat kam es nicht zu einer verstärkten IL-1 $\beta$  Expression im Vergleich zur viralen Infektion alleine (HRV-16: PA-/RV+ vs. NM+/RV+ ( $p=0,0204$ ), vs. M+/RV+ ( $p=0,870$ ); HRV-1B: PA-/RV+ vs. NM+/RV+ ( $p=0,053$ ), vs. M+/RV+ ( $p=0,949$ )).





**Abbildung 20: IL-1β mRNA-Expression**

Differenzierte bronchiale Epithelialzellen wurden für 16 Tage repetitiv mit *P. aeruginosa* und anschließend für 48 Stunden mit Rhinovirus infiziert (n=6). Relative Veränderungen gegenüber nicht infizierten Zellen, gemessen mittels qPCR und normalisiert gegen GAPDH mittels  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode. A: Infektionen mit Hauptgruppen Rhinovirus HRV-16, B: Infektionen mit Nebengruppen Rhinovirus HRV-1B. Signifikanzniveau: \*:  $p \leq 0,05$ , \*\*:  $p \leq 0,01$ , ns: nicht signifikant

#### 4.7.2 IL-6 mRNA Expression

Bei rein bakteriell infizierten Zellen war die IL-6 Expression nur bei nicht-mukoiden *P. aeruginosa* Isolaten erhöht, bei rein viral infizierten Zellen war die IL-6 Transkription unabhängig vom Subtyp erhöht.

(NM+/RV-  $100 \pm 148$ fache Erhöhung gegenüber uninfizierten Kontrollzellen, M+/RV-  $3 \pm 2$ , HRV-16: PA-/RV+  $96 \pm 127$ , HRV-1B: PA-/RV+  $78 \pm 105$ )

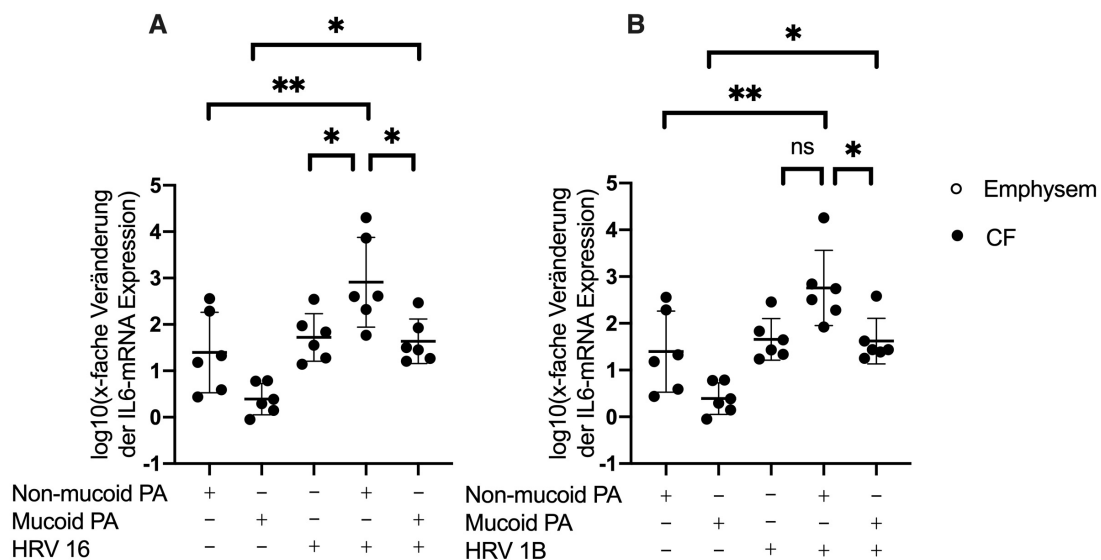
Bakteriell-virale Coinfektionen führten zu einer signifikant höheren Expression als rein bakterielle Infektionen (HRV-16: NM+/RV+  $4742 \pm 8020$  vs. NM+/RV- ( $p = 0,0021$ ), M+/RV+  $79 \pm 108$  vs. M+/RV- ( $p = 0,0139$ ); HRV-1B: NM+/RV+  $3310 \pm 7209$  vs. NM+/RV- ( $p = 0,0021$ ), M+/RV+  $87 \pm 145$  vs. M+/RV- ( $p = 0,0139$ )).

Coinfektionen mit einem nicht-mukoiden *P. aeruginosa* Isolat führten darüber hinaus zu einem statistisch signifikanten Anstieg im Vergleich zu Coinfektionen mit einem mukoiden *P. aeruginosa* Isolat. Der Anstieg der IL-6 mRNA Expression in Coinfektionen mit dem nicht-mukoiden Isolat zusammen mit HRV-16 war

zudem signifikant höher als bei rein viraler Infektion, nicht jedoch in Kombination mit Rhinoviren der Nebengruppe.

(HRV-16: NM+RV+ vs. M+RV- ( $p= 0,0115$ ), vs. PA-RV+ ( $p= 0,0203$ ); HRV-1B: NM+RV+ vs. M+RV- ( $p= 0,0466$ ), vs. PA-RV+ ( $p= 0,0570$ )).

Entgegengesetzt zu dem ausbleibenden Anstieg von IL-6 in Coinfektionen mit einem nicht-mukoiden *P. aeruginosa* -Isolat auf Proteinebene, zeigte sich somit ein signifikanter Anstieg von IL-6 mRNA auf Transkriptionsebene. Dies erfolgte sogar über das Maß einer rein viralen oder Coinfektion mit einem mukoiden *P. aeruginosa* Isolat hinaus.



**Abbildung 21: IL-6 mRNA-Expression**

Differenzierte bronchiale Epithelialzellen wurden für 16 Tage repetitiv mit *P. aeruginosa* und anschließend für 48 Stunden mit Rhinovirus infiziert ( $n=6$ ). Relative Veränderungen gegenüber nicht infizierten Zellen, gemessen mittels qPCR und normalisiert gegen GAPDH mittels  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode. A: Infektionen mit Hauptgruppen Rhinovirus HRV-16, B: Infektionen mit Nebengruppen Rhinovirus HRV-1B. Signifikanzniveau: \*:  $p \leq 0,05$ , \*\*:  $p \leq 0,01$ , ns: nicht signifikant

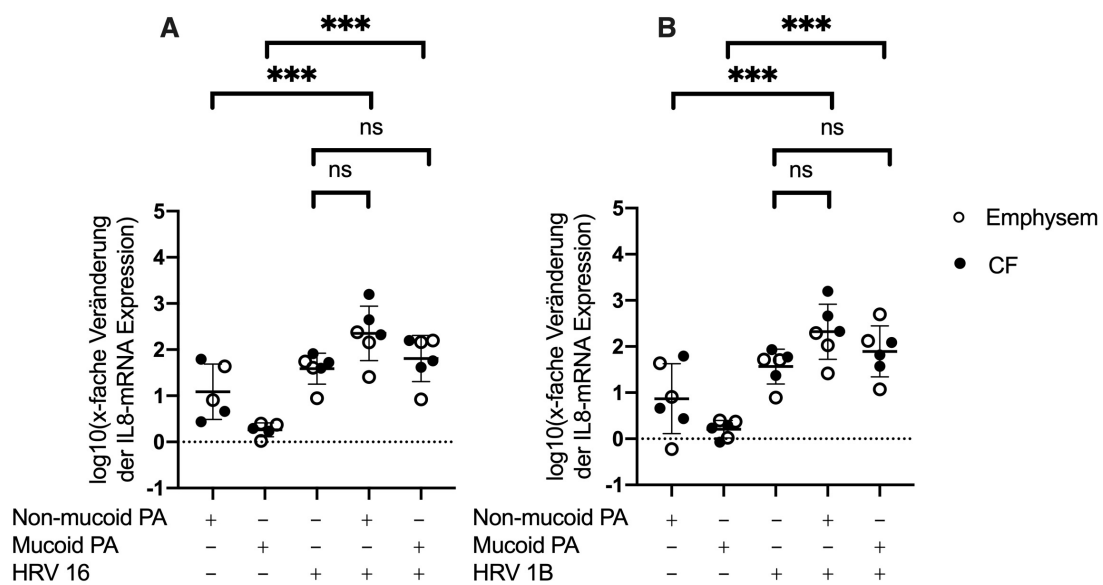
#### 4.7.3 IL-8 mRNA Expression

Es konnte ein Anstieg der IL-8 mRNA Expression sowohl bei rein bakteriellen Infektionen mit dem nicht mukoiden *P. aeruginosa* Isolat, als auch bei rein viralen HRV Infektionen nachgewiesen werden.

(NM+/RV-  $20 \pm 26$ fache Erhöhung gegenüber uninfizierten Kontrollzellen, M+/RV-  $2 \pm 1$ , HRV-16: PA-/RV+  $46 \pm 24$ , HRV-1B: PA-/RV+  $47 \pm 28$ )

Coinfektionen führten zu einem signifikant größeren Anstieg der IL-8 mRNA Expression als alleinige bakterielle Infektionen. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen Coinfektionen und alleiniger viraler Infektion nachgewiesen werden.

(HRV-16: NM+/RV+  $441 \pm 576$  vs. NM+RV- ( $p= 0,0008$ ), vs. PA-/RV+ ( $p= 0,127$ ); M+/RV+  $94 \pm 66$  vs. M+/RV- ( $p= 0,0003$ ), vs. PA-/RV+ ( $p= 0,948$ ); HRV-1B: NM+/RV+  $430 \pm 583$  vs. NM+/RV- ( $p=0,0013$ ), vs. PA-/RV+ ( $p= 0,153$ ); M+/RV+  $145 \pm 179$  vs. M+/RV- ( $p=0,0002$ ), vs. PA-/RV+ ( $p= 0,828$ )).



**Abbildung 22: IL-8 mRNA-Expression**

Differenzierte bronchiale Epithelialzellen wurden für 16 Tage repetitiv mit *P. aeruginosa* und anschließend für 48 Stunden mit Rhinovirus infiziert (n=6). Relative Veränderungen gegenüber nicht infizierten Zellen, gemessen mittels qPCR und normalisiert gegen GAPDH mittels  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode. A: Infektionen mit Hauptgruppen Rhinovirus HRV-16, B: Infektionen mit Nebengruppen Rhinovirus HRV-1B. Signifikanzniveau: \*\*\*:  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ .

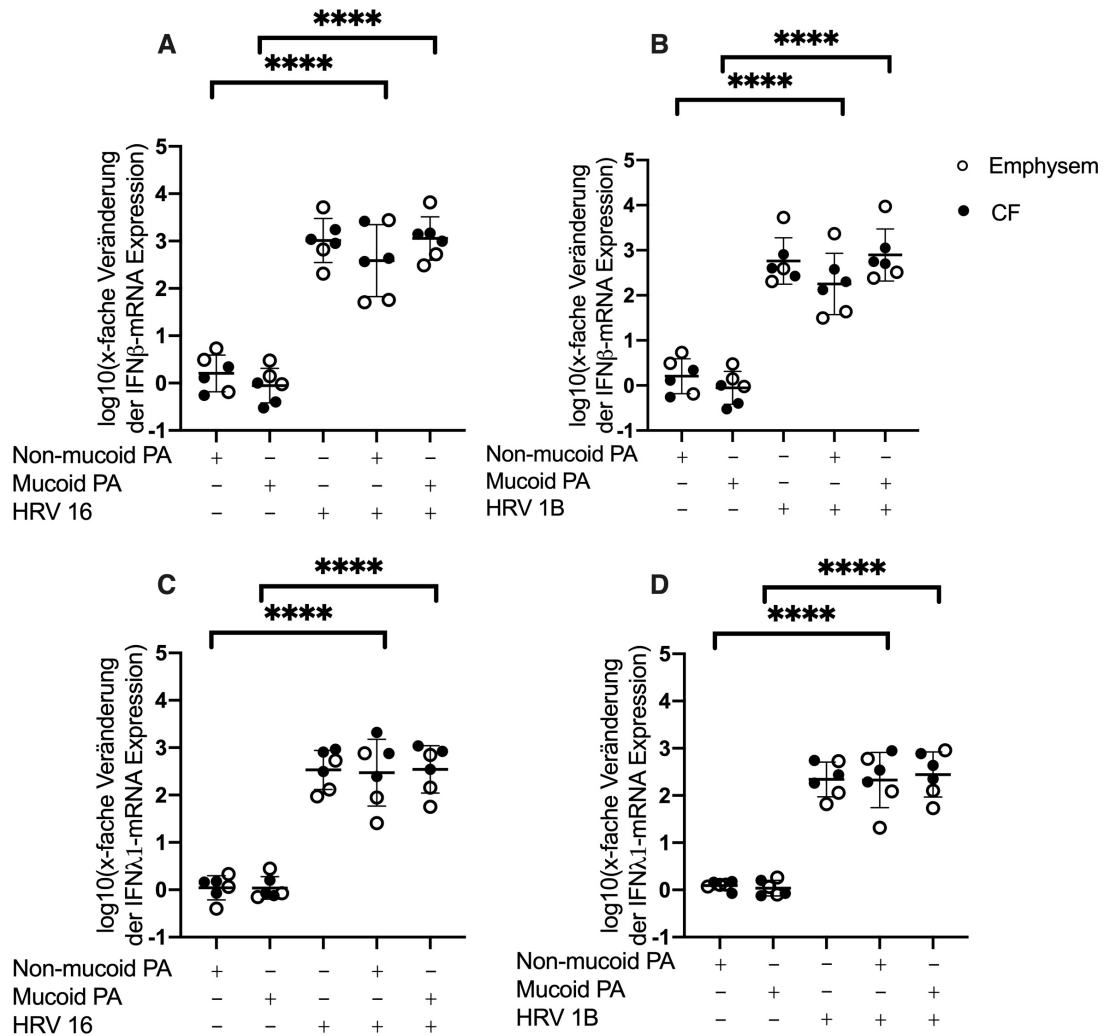
#### 4.7.4 Bestimmung der mRNA-Expression von Interferon (IFN)- $\beta$ und IFN- $\lambda$ 1

Die Bestimmung der mRNA Expression von IFN- $\beta$  und IFN- $\lambda$ 1 erfolgte wie in 3.6.6 beschrieben.

Während rein bakterielle Infektionen keinen Anstieg der IFN-Expression zur Folge hatten führte eine HRV Infektion zu erhöhten IFN- $\beta$  und IFN- $\lambda$ 1 mRNA-Spiegeln. Der Anstieg war für HRV-16 und HRV-1B vergleichbar.

(HRV-16: PA-/RV+ 1629  $\pm$  1810 IFN- $\beta$  und 468  $\pm$  348 IFN- $\lambda$ 1 mRNA Expression, HRV-1B: PA-/RV+ 1232  $\pm$  2013 IFN- $\beta$  und 287  $\pm$  210 IFN- $\lambda$ 1 mRNA Expression). Coinfektionen, mit mukoiden oder nicht-mukoiden *P. aeruginosa* und Rhinoviren zeigten keine signifikant vom Effekt einer reinen Virusinfektion abweichende Interferon - $\beta$  und - $\lambda$ 1 Transkription.

(HRV-16: NM+/RV+ 1049  $\pm$  1284 IFN- $\beta$  und 664  $\pm$  775 IFN- $\lambda$ 1 Erhöhung der mRNA Expression, M+/RV+ 1874  $\pm$  2337 IFN- $\beta$  und 529  $\pm$  410 IFN- $\lambda$ 1 mRNA Expression; HRV-1B: NM+/RV+ 517  $\pm$  892 IFN- $\beta$  und 363  $\pm$  328 IFN- $\lambda$ 1 mRNA Expression, M+/RV+ 2028  $\pm$  3628 IFN- $\beta$  und 420  $\pm$  353 IFN- $\lambda$ 1 mRNA Expression)



**Abbildung 23: Interferon mRNA-Expression**

Differenzierte bronchiale Epithelialzellen wurden für 16 Tage repetitiv mit *P. aeruginosa* und anschließend für 48 Stunden mit Rhinovirus infiziert (n=6). IFN- $\beta$  und - $\lambda$ 1 mRNA-Expression; relative Veränderungen gegenüber nicht infizierten Zellen, gemessen mittels qPCR und normalisiert gegen GAPDH mittels  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode. A: IFN- $\beta$  Expression bei Infektionen mit Hauptgruppen Rhinovirus HRV-16, B: IFN- $\beta$  Expression bei Infektionen mit Nebengruppen Rhinovirus HRV-1B, C: IFN- $\lambda$ 1 Expression bei Infektionen mit Hauptgruppen Rhinovirus HRV-16, D: IFN- $\lambda$ 1 Expression bei Infektionen mit Nebengruppen Rhinovirus HRV-1B. Signifikanzniveau: \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ .

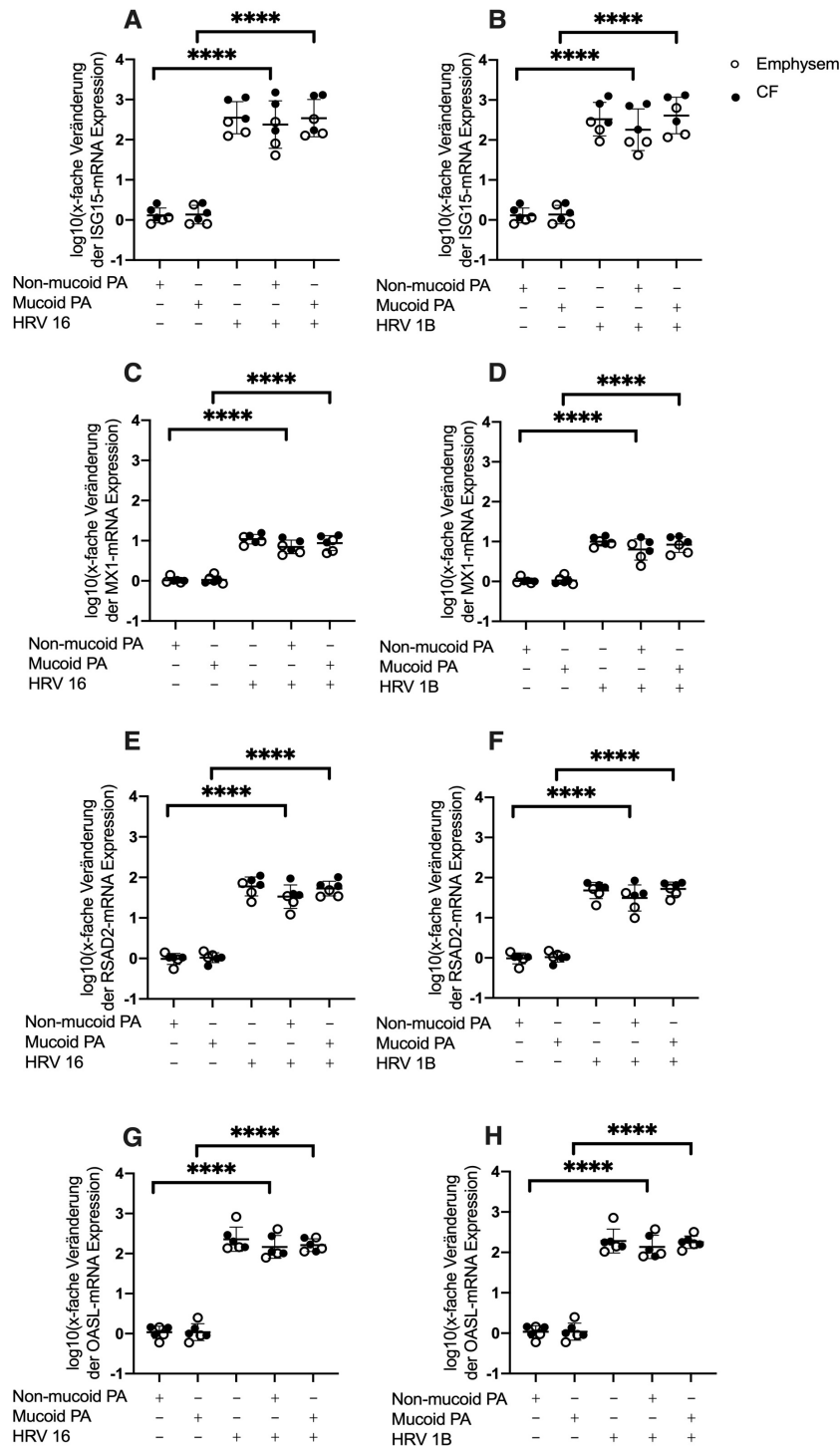
#### 4.7.5 Bestimmung der mRNA-Expression der Interferon-stimulierten Gene ISG15, MX1, RSAD2 und OASL

Die Bestimmung der mRNA Expression der ISGs erfolgte wie in 3.6.6 beschrieben.

Bakterielle Infektionen alleine hatten keinen Anstieg der ISGs zur Folge. Virale Infektionen führten zu einem Anstieg aller gemessener ISGs, vergleichbar bei Infektionen mit HRV-16 und HRV-1B (PA-/RV+: HRV-16: ISG15  $500 \pm 439$ , MX1  $11 \pm 3$ , RSAD2  $67 \pm 30$ , OASL  $292 \pm 271$ ; HRV-1B: ISG15  $483 \pm 455$ , MX1  $10 \pm 3$ , RSAD2  $51 \pm 19$ , OASL  $245 \pm 235$ ).

Bakteriell-virale Coinfektionen führten zwar zu einem signifikant höheren Anstieg aller gemessener ISGs als rein bakterielle Infektionen, es konnte jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied zu rein viralen Infektionen detektiert werden.

(HRV 16: ISG15: NM+/RV+  $476,10 \pm 572,51$  vs. NM+/RV- ( $p < 0,0001$ ), vs. PA-/RV+ ( $p = 0,875$ ), M+/RV+  $554,0 \pm 565,0$  vs. M+/RV- ( $p < 0,0001$ ), vs. PA-/RV+ ( $p > 0,999$ ); MX1: NM+/RV+  $7,47 \pm 2,95$  vs. NM+/RV- ( $p < 0,0001$ ), vs. PA-/RV+ ( $p = 0,062$ ), M+/RV+  $9,37 \pm 3,63$  vs. M+/RV- ( $p < 0,0001$ ), vs. PA-/RV+ ( $p = 0,596$ ); RSAD2: NM+/RV+  $40,27 \pm 28,23$  vs. NM+/RV- ( $p < 0,0001$ ), vs. PA-/RV+ ( $p = 0,084$ ), M+/RV+  $57,28 \pm 25,25$  vs. M+/RV- ( $p < 0,0001$ ), vs. PA-/RV+ ( $p = 0,978$ ); OASL: NM+/RV+  $179,06 \pm 133,20$  vs. NM+/RV- ( $p < 0,0001$ ), vs. PA-/RV+ ( $p = 0,693$ ), M+/RV+  $171,46 \pm 63,89$  vs. M+/RV- ( $p < 0,0001$ ), vs. PA-/RV+ ( $p = 0,848$ ); für HRV-1B äquivalent)



**Abbildung 24: ISGs mRNA Expression**

Differenzierte bronchiale Epithelialzellen wurden für 16 Tage repetitiv mit *P. aeruginosa* und anschließend für 48 Stunden mit Rhinovirus infiziert (n=6). ISG15, MX1, RSAD2, OASL- mRNA-Expression; relative Veränderungen gegenüber nicht infizierten Zellen, gemessen mittels qPCR und normalisiert gegen GAPDH mittels  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode. A: ISG15 Expression bei Infektionen mit Hauptgruppen Rhinovirus HRV-16, B: ISG15 Expression bei Infektionen mit Nebengruppen Rhinovirus HRV-1B, C: MX1 Expression bei Infektionen mit Hauptgruppen Rhinovirus HRV-16, D: MX1 Expression bei Infektionen mit Nebengruppen Rhinovirus HRV-1B, E: RSAD2 Expression bei Infektionen mit Hauptgruppen Rhinovirus HRV-16, F: RSAD2 Expression bei Infektionen mit Nebengruppen Rhinovirus HRV-1B, G: OASL Expression bei Infektionen mit Hauptgruppen Rhinovirus HRV-16, H: OASL Expression bei Infektionen mit Nebengruppen Rhinovirus HRV-1B. Signifikanzniveau: \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ .

## 4.8 Mischexperimente

Coinfektionen mit HRV und einem nicht-mukoiden klinischen *P. aeruginosa*-Isolat führten trotz statistisch signifikant erhöhter IL-6 mRNA Expression zu einem fast vollständigen Fehlen von IL-6 auf Proteinebene. Um dieses Phänomen weiter zu untersuchen wurden wie in 4.8 beschrieben Mischexperimente mit rekombinatem IL-6 durchgeführt.

In den Kontrollen, für die rekombinantes IL-6 mit Wasser gemischt wurden, war IL-6 nach Übernachtinkubation weiterhin im ELISA nachweisbar.

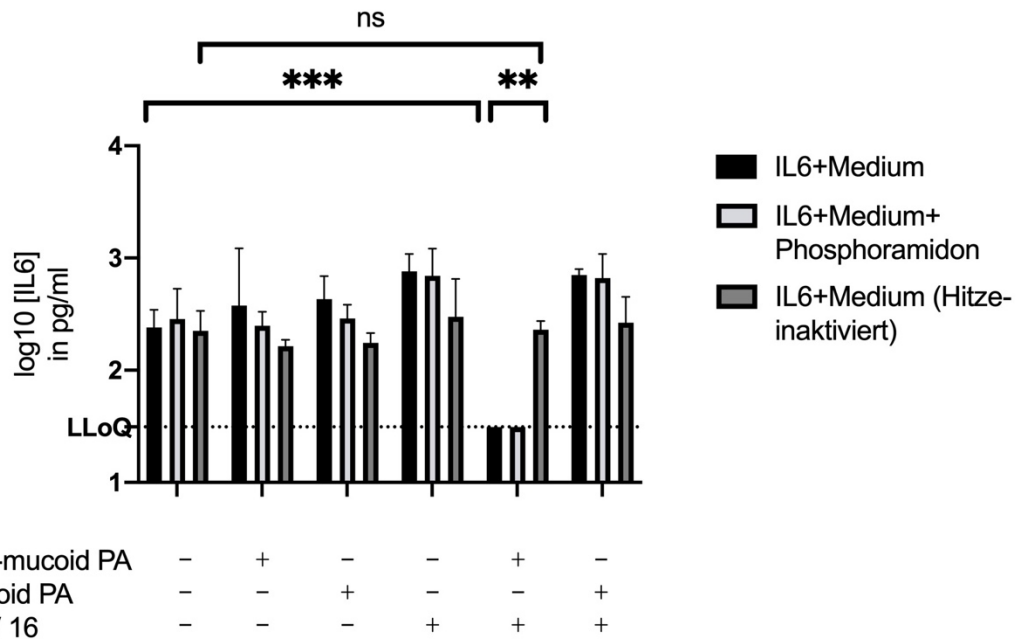
Gemeinsame Inkubation mit Zellkulturmedien von jeweils nicht infizierten Zellen, rein viral-infizierten, rein bakteriell-infizierten oder von Coinfektionen eines mukoiden klinischen *P. aeruginosa*-Isolates führten ebenfalls zu keiner signifikanten Reduktion des rekombinanten IL-6.

Inkubation gemeinsam mit Zellkulturmedium von Zellen, die einer Coinfektion von HRV und einem nicht-mukoiden klinischen *P. aeruginosa*-Isolat ausgesetzt waren, führte jedoch zu einer statistisch signifikanten Reduktion des zugegebenen exogenen IL-6.

Um zu überprüfen ob diese Reduktion durch eine Metalloprotease verursacht worden war, erfolgte die Zugabe des Metalloproteaseinhibitors Phosphoramidon. Hierdurch wurde jedoch keine Inhibition der IL-6 Reduktion erzielt.

Eine Vorbehandlung des Zellkulturmediums mit Hitze (95 °C, 5 min) führte allerdings zur Aufhebung der IL-6 Reduktion.





**Abbildung 25: Ergebnisse Mischexperimente**

Zelkulturmedien der vorangegangenen Infektionen wurde mit rekombinantem IL-6 Standard gemischt und Übernacht inkubiert (n=3). IL-6 Proteinkonzentration gemessen mittels ELISA, LLoQ: *lower limit of quantification*. Signifikanzniveau: \*\*:  $p \leq 0,01$ , \*\*\*:  $p \leq 0,001$ , ns: nicht signifikant

## 5 Diskussion

### 5.1 Diskussion der Methoden

Für die Versuche dieser Arbeit wurde ein spezielles Zellkulturmodell benutzt, bei welchem pBECs über einen Zeitraum von vier Wochen zu einem mehrreihigen Flimmerepithel differenzierten. Differenzierte Epithelzellen repräsentieren die *in-vivo* Lungenbedingungen besser als nicht-differenzierte Zellen.<sup>157</sup>

Die Validierung der Differenzierung erfolgte durch etablierte Verfahren – die Ausbildung von *tight junctions* und der damit einhergehende Anstieg des interzellulären Zusammenhalts mittels Messung des transepithelialen Widerstandes (TEER) und Nachweis der Mukusbildung durch Anti-Mucin5AC-Antikörper.<sup>158</sup> Die gemessenen TEER-Werte entsprechen denen publizierter vergleichbarer Arbeiten. Niedrigere TEER-Werte bei Zellen von COPD-Patienten sind beschrieben, was auch die niedrigeren Widerstände im Vergleich zu Zellen von CF-Spendern in dieser Arbeit erklären könnte.<sup>111,150,159-161</sup>

Zilien-tragende Zellen wurden direkt durch mikroskopische Kontrolle nachgewiesen. Ein Nachweis der Zilien an der Apikalseite der Zellen durch Immunfluoreszenzfärbung auf  $\beta$ -Tubulin IV ist beschrieben<sup>158</sup>, wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Andere *in-vitro* Modelle der Lunge greifen auf Zelllinien zurück. Aus Tumorzellen abgeleitete Zelllinien, beispielsweise Calu-3, bilden polarisierte Einzelzellschichten aus, zeigen einen Anstieg des transepithelialen Widerstandes und sekretieren Mukoproteine, zeigen jedoch keine Pseudostratifizierung und bilden keine Zilien aus.<sup>159,162-164</sup> Virus-transformierte Zelllinien, zum Beispiel 16HBE14o, bei denen bronchiale Epithelzellen durch SV40 Plasmid immortalisiert wurden, bilden mehrschichtige Zelllayer und unter *Air-Liquid-Interface* Bedingungen auch Zilien aus, produzieren aber keinen Mukus.<sup>162,164,165</sup> Die Verwendung primärer bronchialer Epithelzellen bildet somit im Gegensatz dazu die echten *in-vivo* Verhältnisse besser ab.<sup>163</sup> Außerdem ermöglicht die Verwendung Zellen verschiedener Spender die Berücksichtigung interindividueller Unterschiede. Dies ist ein weiterer wesentlicher Vorteil im Vergleich zur Verwendung einer Zelllinie. Die vierwöchigen Differenzierungsphasen der Zellkulturen sind jedoch zeitlich deutlich aufwendiger

als bei Verwendung zweidimensionaler Zellkultursysteme. Die Differenzierungszeit der Air-Liquid-Interface-Kulturen der vorliegenden Arbeit entspricht den Angaben anderer Arbeitsgruppen.<sup>157,160</sup>

Der erhöhte zeitliche Aufwand und das eingeschränkt zur Verfügung stehende Ausgangsmaterial begrenzte die Anzahl der durchführbaren Experimente. Es wurden Zellen aus Lungenexplantaten von drei Patienten mit CF und drei Patienten mit Lungenemphysem isoliert und verwendet.

Nachteilig war, dass zum Vergleich Zellen benutzt werden mussten, die aus explantierten Emphysem Lungen stammten, da kein Ausgangsgewebe von Lungengesunden zur Verfügung stand. Das Durchschnittsalter der CF-Spender war mit 35,3 Jahren niedriger als das Durchschnittsalter der Nicht-CF-Spender (54,7 Jahre). Die Geschlechtsverteilung war ungleich (CF 1/3 weiblich, 2/3 männlich, Nicht-CF invers). Es ist möglich, dass fehlende Unterschiede zwischen CF und Nicht-CF Kontrollen auf diese Umstände teilweise zurück zu führen sind. Eine Möglichkeit wäre die Nutzung kommerzieller Anbieter zur Erlangung pBECs gesunder Spender gewesen.

Zur Untersuchung des Einflusses einer chronischen Infektion mit *P. aeruginosa* auf die Reaktion des Atemwegsepithels auf virale Infektionen war die Entwicklung eines neuen Infektionsmodells notwendiger Bestandteil dieser Arbeit. Vorarbeiten meiner Arbeitsgruppe und anderer Gruppen führten Coinfektionen in engem zeitlichen Abstand voneinander durch. *Chattoraj et al.* infizierten vor einer viralen Sekundärinfektion für 24 Stunden mit *P. aeruginosa*.<sup>143</sup> *Gulraiz et al.* inkubierten vor viralen Infektionen mit *H. influenzae* ebenfalls für 24 Stunden.<sup>139</sup> *Bellinghausen et al.* prä-inkubierten mit *H. influenzae*, *P. aeruginosa* und *S. pneumoniae* für vier und 24 Stunden vor viralen Infektionen.<sup>141</sup>

Das Infektionsmodell dieser Arbeit, durch repetitive Zugabe von Bakterien über einen Zeitraum von 16 Tagen vor der Virusinfektion, sollte die chronische Infektion in der CF-Lunge besser abbilden. Hierdurch konnte es zur Ausbildung zellulärer Anpassungsreaktionen an die bakterielle Infektion kommen, beispielsweise auch epigenetischen Veränderungen.

Bei den Bakterien handelt es sich um klinische Isolate eines einzelnen CF-Patienten. Dies sollte die *in-vivo* Situation bei CF-Patienten besser widerspiegeln als es bei Verwendung von Laborstämmen wie PAO1 möglich gewesen wäre. Da

*P. aeruginosa* in der CF-Lunge eine rasche Mikroevolution durchlebt unterscheiden sich klinische Isolate untereinander teilweise deutlich voneinander.<sup>166,167</sup> Es ist somit nicht auszuschließen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit nur spezifisch für die beiden eingesetzten klinischen *Pseudomonas*-Isolate sind. Um dies auszuschließen sollten in weiterführenden Untersuchungen die Experimente mit anderen klinischen Isolaten wiederholt werden.

Die eingesetzte bakterielle MOI von 0,0005 wurde im Vergleich mit anderen Arbeiten eher gering gewählt<sup>131,143</sup>, um eine Infektion über einen langen Zeitraum ohne Überwucherung gewährleisten zu können.

Zusätzlich wurde das Bakterienwachstum mittels Zugabe von Tobramycin 25 µg/ml gehemmt um eine rasche Überwucherung der Zellkulturen zu vermeiden. Eine solche Inhibition ist auch in der Literatur beschrieben, beispielsweise mittels Gentamicin 50 µg/ml.<sup>143</sup> Tobramycin wurde in den Experimenten in der vorliegenden Arbeit benutzt, da es eines der am häufigsten gegen *P. aeruginosa* eingesetzten Antibiotika bei CF-Patienten ist und somit die klinische Situation am besten simuliert.<sup>168-171</sup> Eine antibiotische Inhibition von *P. aeruginosa* in diesem Zellkulturmodell war zwar notwendig, ist jedoch nicht ohne Probleme. So zeigten *Koeppe et al.*, dass eine Tobramycin Behandlung Virulenzfaktoren in *outer membrane vesicles* von *P. aeruginosa* reduzieren kann, insbesondere die alkalische Protease AprA.<sup>172</sup> AprA hat neben seiner einschränkenden Wirkung auf die CFTR Cl<sup>-</sup>-Sekretion<sup>172</sup> die Fähigkeit aus Wirtsepithel stammendes IFN-λ zu degradieren und so die antivirale Antwort zu reduzieren.<sup>173</sup> Dies könnte somit fehlende Unterschiede in der IFN-λ Antwort und der Viruslast zwischen Coinfektionen und rein viralen Infektionen in der vorliegenden Arbeit erklären.

Im Sinne des 3R-Prinzips (*Replace, Reduce, Refine*) ist es bioethisch sinnvoll Tierversuche zu vermeiden, wenn dies möglich ist. *In-vivo* Infektionsmodelle hätten im Gegensatz zum hier eingesetzten Zellkulturmodell jedoch den Vorteil den systemischen Kontext der Infektion mit abzubilden. Alle bisherigen murinen Modelle zeigten jedoch keine gut mit der menschlichen CF-Lunge vergleichbare Lungenerkrankung und insbesondere Lungeninfektionen.

Größere Gemeinsamkeiten zur humanen *in-vivo* Situation gibt es bei verschiedenen CF-Frettchen und CF-Schweinmodellen. Zum einen ist die Lungenarchitektur und Funktion der menschlichen Lunge bei diesen ähnlicher,

zum anderen entwickeln sie spontan Entzündungen, Atemwegsveränderungen mit Mukusakkumulation und Infektionen die der CF-Lunge ähneln.<sup>174,175</sup> Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse könnten daher in Zukunft zum Beispiel an solchen Tiermodellen überprüft werden.

## 5.2 Viruslast und Interferonantwort

Im Infektionsmodell dieser Arbeit wurden keine Unterschiede in der Viruslast zwischen CF- und Nicht-CF Zellen nachgewiesen. Dem gegenüber stehen die Untersuchungen von *Sutanto et al.*, der neben einer veränderten inflammatorischen Antwort in primären bronchialen Epithelzellen von pädiatrischen CF-Patienten auch eine verstärkte Virusreplikation nachweisen konnte.<sup>176</sup> Im Gegensatz zu den Versuchen dieser Arbeit wurden als Kontrollen Zellen gesunder Spender verwendet. Ein weiterer wesentlicher Unterschied war, dass in ihren Versuchen keine differenzierten Zellen verwendet wurden was die Empfindlichkeit gegenüber Virusinfektionen ebenfalls beeinträchtigen kann.

In der vorliegenden Arbeit gab es keinen signifikanten Unterschied in der Viruslast zwischen rein viralen HRV-Infektionen und bakteriell-viralen Coinfektionen zusammen mit *P. aeruginosa*.

Entgegen diesen Ergebnissen beobachteten *Chattoraj et al.* bei vorangegangener Infektion mit einem mukoiden *P. aeruginosa*- Isolat und anschließender Infektion mit HRV-39 eine Zunahme der Viruslast in primären bronchialen CF-Zellen aber nicht in Nicht-CF-Zellen.<sup>143</sup> In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit konnten *Sörensen et al.* nach Behandlung von Zellen der Epithelzelllinie BEAS-2B mit *P. aeruginosa*- vorbehandeltem Medium keinen Unterschied in der Viruslast nach HRV- oder RSV- Infektion detektieren. Sie zeigten aber, dass der Überstand dieser so infizierten Zellen in neuen (unbehandelten) BEAS-2B zu einem größeren Anstieg der Virus RNA und vermehrtem zytopathischen Effekt führte. Dieser Effekt war abhängig vom verwendeten Bakterienstamm. Sie konnten zeigen, dass *P. aeruginosa* in der Lage ist die antivirale Zellantwort zu modulieren, indem die bakterielle Protease AprA zu einer direkten Degradierung von IFN- $\lambda$  führte. Die initiale Induktion von IFN- $\lambda$  blieb unverändert. Durch den Abbau auf Proteinebene kam es jedoch einerseits zu einem fehlenden positiven Rückkopplungsmechanismus und somit

signifikant abfallender Expression im weiteren Verlauf. Außerdem war auch die Induktion der ISGs Interferon-induziertes GTP-bindendes Protein MX1 (MX1) und Oligoadenylatsynthetase 1 (OAS1) vermindert.<sup>173</sup>

In der vorliegenden Arbeit führten rein bakterielle Infektionen mit mukoidem oder nicht-mukoidem *P. aeruginosa* nicht zu einer IFN- $\beta$  oder IFN- $\lambda$ 1 Induktion, jedoch kam es durch Virusinfektionen zu einer signifikanten Zunahme der Interferonantwort. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der IFN-Antwort auf rein virale Infektionen und Coinfektionen.

Auf die Messung von IFN- $\lambda$ 1 auf Proteinebene wurde verzichtet. Allerdings wären bei Veränderungen der Interferone auf Proteinebene auch Unterschiede in der ISG-Expression zu erwarten gewesen. Dies war jedoch nicht der Fall.

Es bestehen wesentliche Unterschiede in der Studie von *Sörensen* und den hier vorliegenden Experimenten. Die Kulturbedingungen der Bakterien unterschieden sich. Während in den Coinfektionen dieser Arbeit eine relativ kleine Menge im Wachstum gehemmter Bakterien eingesetzt wurde simulierten *Sörensen et al.* die bakterielle Infektion durch Zugabe von konditioniertem Medium für welches *Pseudomonas* 5 Tage in einer Schüttelkultur angezüchtet wurde. Hierdurch kam es zu einer Vermehrung der Bakterien bis zur Plateauphase und zur Aktivierung deren *Quorum-sensing* Systems und damit verstärkten Sekretion verschiedener löslicher Virulenzfaktoren. Da auch die für die IFN- $\lambda$  Degradierung verantwortliche Protease AprA *Quorum-sensing* abhängig gebildet wird, erscheint es plausibel, dass in meinen Versuchen keine ausreichende Produktion dieser Protease bestand um einen signifikanten Effekt auf IFN- $\lambda$  zu beobachten. Die Ausbildung von AprA war auch unter den oben beschriebenen Bedingungen abhängig vom Bakterienstamm. Die größte Aktivität und damit den stärksten Abbau von IFN- $\lambda$  zeigte sich in der Studie von *Sörensen et al.* bei dem Laborstamm PAO1 und in Isolaten von CF-Patienten zu einem frühen Besiedelungszeitpunkt. Waren unterschiedliche *Pseudomonas* Isolate eines Patienten vorhanden, so zeigte sich eine abnehmende AprA Proteaseaktivität mit der Zeit nach Erstinfektion. Im klinischen Studienteil von *Sörensen et al.* wurde gezeigt, dass intermittierend mit *P. aeruginosa*- Infizierte, nicht jedoch chronisch Infizierte ein höheres Risiko für HRV-Infektionen und eine höhere Viruslast im Sputum hatten als nicht Infizierte. Die für meine Arbeit verwendeten klinischen

Isolate stammten von einem CF-Patienten. Auch wenn die Zeitdauer der Besiedelung mit *P. aeruginosa* unbekannt war erscheint eine länger andauernde Infektionsdauer plausibel.

Außerdem unterschieden sich die Zeitpunkte der IFN- und ISG-Expressionsmessungen der Experimente von den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit, was aufgrund der zeitabhängigen Aktivierung spezifischer ISGs durch die verschiedenen Interferone ebenfalls Unterschiede verursachen könnte.<sup>177,178</sup>

In den Untersuchungen von *Chattoraj et al.*<sup>143</sup> zeigte sich ebenfalls eine Modulation der IFN-Antwort auf eine HRV-Infektion, bei vorangegangener Infektion mit einem klinischen, mukoiden *Pseudomonas*-Isolat eines CF-Patienten. Interessanterweise war diese Modulation jedoch abhängig vom Zellspender. Während es in Coinfektionen bei CF-Zellen zu einer verminderten IFN- $\beta$ ,  $\lambda$ 1+2 und ISG -Expression kam, führten sie in Nicht-CF-Zellen sogar zu einer verstärkten IFN-Antwort im Vergleich zu rein viralen Infektionen. Dies konnten die Autoren auf unterschiedliche zelluläre Reaktionen Upstream der IFN-Expression zurückführen, das heißt die Unterschiede waren im Gegensatz zu *Sörensen et al.* also bereits auf mRNA Ebene nachweisbar. Es bestand in den Untersuchungen meiner Arbeit kein Unterschied in der IFN-Expression zwischen CF- und NichtCF-Zellen.

Majorgruppen Rhinoviren verwenden als Eintrittsrezeptor in die Wirtszelle ICAM-1, während Minorgruppen Rhinoviren LDLR verwenden.<sup>179,180</sup>

In den Untersuchungen dieser Arbeit gab es keinen signifikanten Unterschied in der Viruslast zwischen dem Majorgruppen Rhinovirus HRV-16 und dem Minorgruppen Rhinovirus HRV-1B in rein viralen Infektionen oder bakteriell-viralen Coinfektionen. Es erscheint somit unwahrscheinlich, dass in den durchgeführten Experimenten eine chronische Infektion mit *P. aeruginosa* die Ausbildung von viralen Eintrittsrezeptoren für HRV wesentlich modulierte.

Im Gegensatz dazu zeigten jedoch *Look et al.*, dass der *P. aeruginosa* Virulenzfaktor Pyocyanin zu einer Hochregulation von ICAM-1 führt.<sup>181</sup> *Madjdpour et al.* konnten nachweisen, dass auch LPS von *P. aeruginosa* eine Induktion der ICAM-1 Expression in alveolären Epithelialzellen von Ratten zur Folge haben kann.<sup>182</sup> Auch für *H. influenzae* ist dieser Zusammenhang

beschrieben, denn durch *Frick et al.* wurde gezeigt, dass *H. influenzae* eine Hochregulation der ICAM-1 Expression induzieren kann<sup>183</sup> und *Gulraiz et al.* konnten nachweisen, dass dies *in-vitro* auch zu einer erhöhten Viruslast in Coinfektionen mit Majorgruppen Rhinoviren führte.<sup>139</sup>

Möglicherweise war die Modulation des viralen Eintrittsrezeptors ICAM-1 in dem Infektionsmodell dieser Arbeit schlichtweg nicht ausreichend, um für eine erhöhte Viruslast im Vergleich zu Minorgruppen Rhinoviren zu sorgen. Denkbar ist, dass die Bakterien durch die zugegebene Menge Tobramycin nicht absterben und somit nicht ausreichen LPS freigesetzt wird. Die Bildung von Pyocyanin ist darüber hinaus streng reguliert, beispielsweise ebenfalls wie AprA durch das *Quorum-sensing* System und es ist möglich, dass die verwendeten Stämme unter den Bedingungen des Infektionsmodells dieser Arbeit nicht ausreichend Pyocyanin ausbildeten, um den in der Literatur beschriebenen Effekt zu beobachten. Letztlich erscheinen jedoch die hier verwendeten Infektionsbedingungen physiologischer als die ungehemmte Anzucht der Bakterien bis zur Plateauphase in Schüttelkultur.

### 5.3 Interleukin-1 $\beta$

Zytokine der IL-1 Familie werden in frühen Phasen der Inflammationskaskade nach Rhinovirusinfektion durch primäre bronchiale Epithelzellen freigesetzt. Die Produktion von IL-1 ist ein zweistufiger Prozess.

Die mRNA-Induktion von IL-1 erfolgt vor allem nach Aktivierung von Toll-like Rezeptoren (TLRs) was zur Produktion von inaktivem pro-IL-1 $\beta$  führt. Pro-IL-1 $\beta$  wird durch Caspase-1 zu aktivem IL-1 $\beta$  gespalten. Die Aktivierung von Caspase-1 ist abhängig von einer multiple Untereinheiten umfassenden Proteinplattform, dem sogenannten Inflammasom, welches durch Bindung von mikrobiellen Komponenten an NOD-like Rezeptoren (NLRs) aktiviert wird.<sup>184,185</sup>

In den hier durchgeführten Experimenten führte eine Coinfektion mit HRV-16 und einem nicht-mukoiden *P. aeruginosa* Isolat zu einer signifikant erhöhten Induktion der IL-1 $\beta$  mRNA Expression im Vergleich zu rein viralen Infektionen, während dies bei einer Coinfektion mit dem mukoiden Isolat nicht der Fall war. Dies spiegelt sich auch auf Proteinebene wider. Während bei rein viralen Infektionen



und Coinfektionen mit dem mukoiden Isolat die IL-1 $\beta$  Proteinkonzentration unterhalb der unteren Nachweisgrenze des CBA blieb, war ein signifikanter Anstieg bei Coinfektionen mit dem nicht-mukoiden *P. aeruginosa* Isolat messbar.

*Triantafidou et al.* und *Han et al.* konnten zeigen, dass HRV die Produktion von pro-IL-1 $\beta$  induziert, auch wenn der exakte Mechanismus hierfür bisher nicht aufgeklärt wurde.<sup>186,187</sup> Die Aktivierung des Inflammasoms wurde durch einen durch das virale Kanalprotein 2B Viroporin verursachten Kalziumeinstrom ausgelöst. Dies führte zu einer Aktivierung von NLRP3 und NLRC5 und konsekutiver Aktivierung von Caspase-1.<sup>186</sup> *P. aeruginosa* kann ebenfalls zur Aktivierung des Inflammasom führen durch Bindung der Virulenzfaktoren Flagellin, Pilin oder dem Typ-III-Sekretionsprotein PrgJ an NLRC4.<sup>188</sup>

Prinzipiell könnten also sowohl *Pseudomonas* als auch HRV unabhängig voneinander eine IL-1 $\beta$  Antwort hervorbringen. In meinen Untersuchungen zeigte sich ein synergistischer Effekt in Coinfektionen mit dem nicht-mukoiden *P. aeruginosa*-Isolat bereits in der Induktion der mRNA, also Schritt eins der IL-1 $\beta$  Synthese. Noch ausgeprägter waren die Unterschiede jedoch auf Proteinebene. Die Daten von *Han et al.* legen nahe, dass es *in-vivo* im Mausmodell durch die Virusinfektion zu einem weitaus größeren Anstieg von pro-IL-1 $\beta$  kam als von IL-1 $\beta$ .<sup>187</sup> Denkbar ist, dass durch die vorangegangenen bakteriellen Infektionen in meinem Infektionsmodell bereits Schritt zwei, also die Aktivierung des Inflammasom vorbereitet wurde und es deshalb zu einer effektiveren Spaltung zu aktivem IL-1 $\beta$  kommen konnte.

Die Inflammasom-aktivierenden Virulenzfaktoren sind in mukoiden *P. aeruginosa*-Stämmen oftmals herunterreguliert, was die geringere IL-1 Antwort in Coinfektionen mit diesem Isolat erklären würde.<sup>59,189,190</sup> *Huus et al.* bestätigten, dass klinische *P. aeruginosa*- Isolate aus chronisch-infizierten CF-Patienten keine Inflammasom- und IL-1 $\beta$ - Aktivierung zeigten.<sup>191</sup>

Eine verstärkte IL-1 $\beta$  Antwort kann wichtige Auswirkungen haben.

*Piper et al.* konnten mittels Blockade des IL-1-Rezeptors durch Anakinra zeigen, dass IL-1 $\beta$  zwar keine Auswirkungen auf die Viruslast und Virus-vermittelte IFN-Antwort primärer bronchialer Epithelzellen hat, jedoch aufgrund dessen auto- und parakriner Aktivität die durch Virusinfektion ausgelöste IL-6 und IL-8 Sekretion

entscheidend beeinflusst wird.<sup>192</sup> IL-1 ist somit auch verantwortlich für die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten nach Virusinfektion, insbesondere durch Kontrolle der Freisetzung von IL-8.<sup>193,194</sup> *Fujisawa et al.* sowie *Chen et al.* stellten fest, dass IL-1 $\beta$  *in-vitro* NF- $\kappa$ B-abhängig die MUC5AC und MUC5B Genexpression induziert.<sup>195,196</sup> Dies führte zu einer vermehrten Produktion dieser Glykoproteine und damit zu einer Mukus Überproduktion. Dies ist ein typisches Kennzeichen einer CF-Exazerbation.<sup>197</sup>

*Montgomery et al.* beobachteten kürzlich, dass in primären Atemwegsepithelzellen von pädiatrischen CF-Patienten die HRV-induzierte IL-1 $\beta$  Antwort stark mit dem Ausmaß der Nekrose dieser Zellen korreliert.<sup>198</sup> *Cohen et al.* und *Schultz et al.* zeigten an Mausmodellen, dass in akuten *P. aeruginosa* Pneumonien die Aktivierung des Inflammasoms zu einer verstärkten Apoptose und Nekrose der Atemwegszellen und zu einer erhöhten Mortalität der Mäuse führte. Eine Inhibition durch Deletion von NLRC4, Reduktion der IL-1 $\beta$  Produktion, Inhibition von Caspase-1 oder Inhibition der anschließenden Signalwege durch IL-1R-Antagonisierung verbesserte die bakterielle Clearance und reduzierte die Lungenpathologie.<sup>199,200</sup>

Interessanterweise zeigte sich auch bei der vorliegenden Arbeit ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Zellschädigung und einem Anstieg von IL-1 $\beta$ .

#### **5.4 Interleukin-8**

IL-8 ist das zentrale Chemokin zur Rekrutierung und Aktivierung neutrophiler Granulozyten und spielt damit in der Inflammation der CF-Lungenerkrankung eine wichtige Rolle. *In-vivo* setzen neben neutrophilen Granulozyten und Makrophagen auch bronchiale Epithelzellen IL-8 frei.<sup>201</sup> IL-8 wird als Reaktion auf *P. aeruginosa* und sezernierte bakterielle Proteine, aber auch auf virale Infektionen gebildet.<sup>201-205</sup> Die Akkumulation von Neutrophilen in den Atemwegen stellt eine notwendige Komponente der Abwehr gegen Infektionen dar. Patienten mit eingeschränkter Funktion der neutrophilen Granulozyten oder Neutropenie sind sowohl gegenüber *P. aeruginosa* als auch gegenüber Rhinoviren anfälliger.<sup>206-208</sup> Eine dysregulierte IL-8 Antwort und in Folge auch

überschießende Einstrom neutrophiler Granulozyten ist allerdings mit schwerwiegenden negativen Folgen verbunden und charakteristisch für die andauernde Inflammation in der CF-Lunge.<sup>209 210</sup>

In CF-Atemwegen finden sich erhöhte IL-8 Konzentrationen und *Kim et al.* sowie *Mayer-Hamblett et al.* konnten zeigen, dass die IL-8 Konzentrationen im Sputum von CF-Patienten auch mit dem Ausmaß des Lungenschadens korrelierten.<sup>211-213</sup> *Bodini et al.* konnten mittels *Exhaled breath condensate* – Messungen zeigen, dass bereits Kinder mit CF ohne pathogene bakterielle Kolonisation höhere IL-8 Level aufwiesen als gesunde Kontrollen.<sup>205</sup>

In den Untersuchungen dieser Arbeit fand sich jedoch kein Unterschied in den IL-8 Konzentrationen zwischen CF- und NichtCF- Spendern, unabhängig von der jeweiligen Infektionsbedingung. Dies ist eine Diskrepanz zwischen der bestehenden Literatur und den hier vorliegenden Untersuchungen, die möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass die Kontrollen nicht von Lungengesunden stammten. So zeigten bronchiale Epithelialzellen von COPD-Patienten in bereits veröffentlichten Studien ebenfalls bereits basal erhöhte IL-8 Werte.<sup>214</sup>

IL-1 $\beta$  induziert NF- $\kappa$ B-abhängig ebenfalls die IL-8 Genexpression. Da es wie zuvor beschrieben Unterschiede in der IL-1 Antwort zwischen Coinfektionen und rein viralen Infektion gab wären deshalb möglicherweise Unterschiede in der IL-8 Antwort zu erwarten gewesen.<sup>215-217</sup> Es war allerdings kein Unterschied in der Expression von IL-8 auf mRNA Ebene oder in der Konzentration von IL-8 auf Proteinebene zwischen Coinfektionen und rein viralen Infektionen nachweisbar.

## 5.5 Interleukin-6

Eine Rhinovirus-Infektion stimuliert die Bildung von IL-6 *in-vitro* und *in-vivo*.<sup>218</sup>

Dies zeigte sich auch in der vorliegenden Arbeit. Virale Infektionen führten zu einem Anstieg der IL-6 mRNA Expression, bakteriell-virale Coinfektionen führten zu einer höheren Induktion als die jeweilige rein bakterielle Infektion. Darüber hinaus kam es in Coinfektionen mit HRV-16 und einem nicht-mukoiden *P. aeruginosa*- Isolat zu einer signifikant höheren IL-6 Induktion der mRNA-Expression als bei Virusinfektion allein oder in Coinfektion mit einem mukoiden *P. aeruginosa*- Isolat. Coinfektionen mit HRV-1B und dem nicht-mukoiden *P.*

*aeruginosa*- Isolat zeigten das gleiche Muster, blieben jedoch im Vergleich mit rein viralen HRV-1B Infektionen knapp unterhalb der statistischen Signifikanz.

Eine mögliche Erklärung für die höhere IL-6 Genexpression in Coinfektionen mit nicht-mukoiden PA könnte in der höheren Konzentration von IL-1 $\beta$  liegen, welches IL-6 induzieren kann.<sup>219,220</sup>

Im Gegensatz zu der Zunahme der IL-6 mRNA auf Transkriptionsebene bei Coinfektionen mit HRV und dem nicht-mukoiden *P. aeruginosa*- Isolat konnte ein fast vollständiger Abfall der IL-6 Konzentration auf Proteinebene im Vergleich zu rein viralen Infektionen oder Coinfektionen mit dem mukoiden *P. aeruginosa*- Isolat nachgewiesen werden. Dies wurde sowohl mittels CBA als auch mittels ELISA gemessen.

*Saint-Criq et al.* konnten zeigen, dass die von *Pseudomonas* sekretierte Protease LasB IL-6 degradieren kann.<sup>221</sup> LasB ist ein wichtiger Virulenzfaktor von *P. aeruginosa*, der durch das Typ II Sekretionssystem freigesetzt wird.

LasB ist eine Metalloprotease, deren Aktivität in den Untersuchungen von *Saint-Criq et al.* durch den Metalloproteaseinhibitor Phosphoramidon gehemmt werden konnte.

Um dies weiter zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Mischexperimente durchgeführt. Hierfür wurde basalem Zellkulturmedium aus den Infektionsexperimenten rekombinantes IL-6 zugegeben. Es konnte so gezeigt werden, dass auch zugefügtes exogenes IL-6 nach Übernachtinkubation mit Zellkulturüberstand der Coinfektionen mit dem nicht-mukoiden *P. aeruginosa*- Isolat nicht mehr nachweisbar war. Dieser Effekt konnte durch vorangegangene Hitzeinaktivierung des Zellkulturüberstandes unterbunden werden. Im Gegensatz zu den Experimenten von *Saint-Criq et al.* war die Degradierung von IL-6 jedoch nicht durch Phosphoramidon hemmbar.

Weder der Zellkulturüberstand rein viraler Infektionen, noch der Zellkulturüberstand rein bakterieller Infektionen oder bakteriell-viraler Coinfektionen mit dem mukoiden *P. aeruginosa*- Isolat zeigten einen Effekt auf exogenes IL-6.

Insgesamt implizieren diese Ergebnisse, dass IL-6 nicht weniger gebildet oder sezerniert, sondern entweder proteolytisch degradiert oder durch ein hitze-sensibles Molekül gebunden wurde und hierdurch der Detektion im ELISA und CBA entging.

Da der Effekt nicht durch Phosphoramidon aufhebbar war, spricht dies gegen LasB oder eine andere Metalloprotease als Ursache. Im Vergleich zu *Saint-Criq et al.* wurde sogar eine zehnfach höhere Konzentration des Proteaseinhibitors gewählt. Denkbar wären andere *Pseudomonas*- Proteasen, insbesondere da viele dieser Proteasen eine Modulation der Immunantwort verursachen.

Da eine bakterielle Infektion mit dem nicht-mukoiden Isolat allein jedoch zu keinem Abbau oder Bindung von IL-6 führte, müsste die Bildung dieses Faktors aber abhängig sein von der zusätzlichen viralen Infektion mit HRV. Möglich ist, dass die virale Infektion durch eine direkte bakteriell-virale Interaktion zur Ausbildung oder Sekretion dieses Faktors durch *P. aeruginosa* führte. Denkbar ist auch, dass durch die virale Infektion ausgelöste Immunantwort der bronchialen Epithelialzellen die Bedingungen für *P. aeruginosa* insofern veränderten, dass er zur Bildung des Faktors angeregt worden war.

Direkte bakterielle-virale Interaktionen zweier Lungenpathogene sind bislang nur wenig beschrieben. *Rowe et al.* beobachteten, dass es zwischen Influenza Viren und zahlreichen Bakterien (*S. pneumoniae*, *S. aureus*, *M. catarrhalis* und *H. influenzae*) zu einer direkten Interaktion kam, die zu einer verstärkten Adhärenz dieser Bakterien an bronchialen Epithelialzellen führte.<sup>222</sup> Ähnliches konnten van Ewijk et al. für RSV und *P. aeruginosa* beobachten.<sup>117</sup> Allerdings agieren die Atemwegsviren in diesen Fällen vermutlich eher als Kopplungsvermittler zwischen Bakterien und viralen Bindungsstellen der Epithelzellen. Eine direkte Beeinflussung des bakteriellen Transkriptoms und in Folge auch der Virulenz durch einen viralen Atemwegserreger konnten *Smith et al.* in der Interaktion zwischen Pneumococcen und RSV beobachten.<sup>223</sup>

Eine weitere Möglichkeit bestand darin, dass die Coinfektion, nicht aber die alleinige Infektion mit HRV oder nicht-mukoidem *P. aeruginosa* die Epithelzellen selbst zur Ausbildung einer endogenen Protease anregten oder die Bildung endogener Proteaseinhibitoren hemmte. *Repnik et al.* beschrieben die Aktivierung und Deaktivierung verschiedener Chemokine durch Spaltung durch Cathepsine.<sup>224</sup> *Van den Steen et al.* beobachteten, dass aus neutrophilen Granulozyten stammende Gelatinase B die Aktivität von IL-8 durch aminoterminales Schneiden deutlich verstärken konnte.<sup>225</sup> *Waern et al.* sowie *Zhao et al.* konnten zeigen, dass Proteasen aus Mastzellen IL-6 degradieren

können.<sup>226,227</sup> Es gibt bislang allerdings keine Berichte über endogene Proteasen aus bronchialen Epithelialzellen die IL-6 modulieren.

Die Wirkung von IL-6 während Infektionen der Atemwege und Lunge ist vielseitig. Insbesondere reguliert IL-6 den Übergang von angeborener zu adaptiver Immunantwort durch Aktivierung einer T-Zell-Antwort und Limitierung der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten.<sup>228-231</sup>

*Saint-Criq et al.* zeigten *in-vitro*, dass in Abwesenheit von IL-6 ein IL-6-JAK/STAT3-Signalweg gehemmt war, was zu einer Inhibition zellulärer Reparaturmechanismen führte. Am Mausmodell konnte gezeigt werden, dass dies zu einer Lungenschädigung und Inflammation führte. Außerdem wurde *in-vivo* beobachtet, dass Überexpression von IL-6 durch Hochregulation von IL-17 und IL-22 -abhängiger antimikrobieller und Reparatursignalwege vor Lungenschädigung durch *P. aeruginosa*- Infektion schützen kann.<sup>221</sup>

*Yang et al.* untersuchten *in-vivo* am Mausmodell die Rolle von IL-6 nach Influenza-induziertem Lungenschaden. Sie fanden heraus, dass IL-6 die Virus-induzierte Apoptose der bronchialen Epithelialzellen reduzierte und somit das Zellüberleben förderte, gleichzeitig die Progression einer Fibrose durch Zunahme der Apoptose in Fibroblasten verhinderte. IL-6-Defizienz führte zu Depletion von Alveolarmakrophagen und eingeschränkter Phagozytosefähigkeit der verbliebenen Makrophagen. IL-6 defiziente Mäuse zeigten eine höhere Viruslast und eine höhere Mortalität bei Influenzainfektion.<sup>232</sup>

*Lauder et al.* fanden heraus, dass IL-6-defiziente Mäuse bei viralen Lungeninfektionen zum einen Defizite in der antiviralen T-Zell Antwort aufwiesen und gleichzeitig eine eingeschränkte inflammatorische Resolution aufwiesen. Sie zeigten, dass IL-6 hierdurch eine zentrale Rolle in der anti-viralen Abwehr hatte und außerdem eine überschießenden inflammationsbedingten Gewebeschaden verhinderte.<sup>233</sup>

*Pyle et al.* betonten ebenfalls die zentrale Position von IL-6 in der Resolution der Inflammation nach RSV-Infektion.<sup>234</sup>

Unterschiede in der IL-6 Antwort auf virale Atemwegserreger sind auch *in-vivo* bei Menschen von Bedeutung. *Doyle et al.* konnten an gesunden Probanden sehen, dass ein Polymorphismus im IL-6 Promotor, der zu einer geringeren IL-6

Produktion führte, mit schwereren klinischen Symptomen während einer HRV-Infektion verbunden war.<sup>235</sup>

Die Untersuchungen von *Van der Poll et al.* lassen außerdem darauf schließen, dass IL-6 auch in der Abwehr bakterieller Atemwegserreger eine wichtige Rolle spielt. IL-6 defiziente Mäuse hatten eine eingeschränkte Abwehr gegen *S. pneumoniae* und starben signifikant früher an der hierdurch verursachten Lungenentzündung.<sup>236</sup> *Ladel et al.* zeigte, dass IL-6 defiziente Mäuse auch eine eingeschränkte Abwehr gegenüber *M. tuberculosis* hatten.<sup>237</sup>

Insbesondere Ergebnisse der *in-vivo* Experimente sind nicht vollständig auf die Untersuchungen dieser Arbeit übertragbar, da viele Zelltypen (Immunzellen, Fibroblasten) in dem hier verwendeten Modell nicht vorhanden waren. Dennoch bestätigten und ergänzten diese Arbeiten die Beobachtungen meiner Infektionsexperimente. IL-6 hat zentrale Funktionen in der Immunantwort auf eine Infektion der Atemwege und die Depletion von IL-6 in Coinfektionen von HRV mit dem nicht-mukoiden *P. aeruginosa*- Isolat könnte eine wichtige Ursache für die schwerwiegenderen zellulären Schädigungsmuster unter diesen Bedingungen darstellen.

## 5.6 Fazit

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass eine chronische Infektion mit *P. aeruginosa* die Immunantwort primärer bronchialer Epithelialzellen auf eine Rhinovirus Infektion modulieren kann. Es wurde außerdem beobachtet, dass auch der zytopathische Effekt der Virusinfektion durch die vorangegangene bakterielle Infektion beeinflusst werden kann: im Vergleich mit rein viralen Infektionen zeigte sich in Coinfektionen mit HRV und einem nicht-mukoiden *P. aeruginosa*- Isolat ein stärkeres Schädigungsmuster. Gleichzeitig konnte in Coinfektionen eine signifikante Induktion der IL-1 und IL-6 mRNA-Expression festgestellt werden. Auf Proteinebene fand sich unter diesen Bedingungen vermehrt IL-1 $\beta$ . Im Gegensatz hierzu konnte eine fast vollständige Depletion von IL-6 auf Proteinebene beobachtet werden. Das Fehlen von IL-6 konnte auf einen löslichen Faktor zurückgeführt werden, der nur unter den Bedingungen der beschriebenen Coinfektionen entweder durch *P. aeruginosa* oder pBECs freigesetzt wurde. Es wurde gezeigt, dass dieser Faktor auch extern zugeführtes

IL-6 degradierte oder band und das dieser Prozess durch Hitzeinaktivierung unterbunden werden konnte.

Zahlreiche Vorarbeiten betonen die zentrale Rolle von IL-6 in der anti-viralen Immunantwort, Resolution der Inflammation und Abwehr eines inflammationsbedingten Gewebeschadens. Die hier vorgestellten Ergebnisse sind demnach potentiell von großer Bedeutung und hoher klinischer Relevanz, da sie mit erklären können, warum virale Atemwegsinfektionen bei Patienten mit vorangegangenen *P. aeruginosa*- Infektionen einen schwereren Verlauf haben.

## **5.7 Ausblick und klinische Konsequenzen**

Die durch die Experimente dieser Arbeit gewonnen Ergebnisse werfen bereits weitere Fragen auf. Der für die IL-6 Degradierung oder Bindung verantwortliche Faktor sollte identifiziert werden. Durch Ausweitung der hier beschriebenen Inhibitionsexperimente auf weitere Proteaseinhibitor Klassen könnten Nicht-Metalloproteasen gehemmt und somit als Ursache erkannt werden. Eine Überprüfung könnte anschließend beispielsweise mittels *Pseudomonas*-Mutanten erfolgen. Inhibition dieses Faktors oder Ausschalten mittels Mutante während der Infektionsexperimente würde zudem das Verständnis über die biologische Relevanz der hier beschriebenen Immunmodulation verbessern.

Die gezeigte Modulation der inflammatorischen Antwort durch *P. aeruginosa* ist abhängig vom Bakterienstamm, was sich gut mit bereits publizierten Studien deckt.<sup>173,221</sup> In Zukunft sollten weitere klinische Isolate verglichen werden um Unterschiede und Gemeinsamkeiten beurteilen zu können.

Interessant wird ebenfalls sein, ob die gezeigten Veränderungen der Immunantwort spezifisch für Coinfektionen mit Rhinoviren sind oder auch bei anderen Atemwegsviren auftreten.

Das hier etablierte Infektionsmodell für chronische *Pseudomonas*-Infektionen wird helfen viele dieser Fragen zu beantworten. Ein Vergleich mit simultanen Coinfektionen ohne vorangegangene längere Phase bakterieller Infektion wird zudem zeigen können, welcher Anteil der gezeigten Veränderungen abhängig ist von länger andauernden Infektionen und damit beispielsweise auch einhergehenden epigenetischen Veränderungen.



Neben weiterführenden labor-experimentellen Untersuchungen können die gewonnen Erkenntnisse dieser Arbeit auch Ausgangspunkte für klinische Studien bieten. Die Ergebnisse sind kongruent mit zuvor genannten Untersuchungen und legen nahe, dass Patienten deren Lungen mit *P. aeruginosa* infiziert sind einen schwerwiegenderen Verlauf viraler Atemwegsinfektionen haben können.

Aufbauend auf der Studie von *Sorensen et al.* sollten weitergehende klinische Studien an CF-Patienten durchgeführt werden, um die Evidenz hierzu zu stärken. Die Diversität von *P. aeruginosa* und damit verbundenen Unterschiede in der Ausprägung der Virulenzfaktoren und letztlich auch Unterschiede der Immunmodulation könnten Anhaltspunkte zur verbesserten Behandlung der CF-Patienten bieten. Bei *P. aeruginosa*-freien Patienten und intermittierendem Nachweis werden aktuell sechs Proben gleichmäßig über das Jahr verteilt gewonnen. Bei chronischer Infektion, also  $\geq 50\%$  *P. aeruginosa*-positiver Proben bei mindestens sechs Probenahmen pro Jahr, erfolgen vier Probenentnahmen pro Jahr. Der Schwerpunkt der Routinetestung liegt aktuell vor allem auf der Antibiotikaresistenz und Phänotypisierung der Mukoidität.<sup>238</sup> Dies wird *P. aeruginosa* als sehr versatiles Bakterium jedoch nur unzureichend gerecht. Mit zunehmendem Wissensstand könnte es sinnvoll werden, die bakterielle Diagnostik auszuweiten. Die Immunmodulation ist besonders abhängig von der Ausprägung bakterieller Virulenzfaktoren, insbesondere verschiedenen bakteriellen Proteasen. Eine detailliertere Analyse dieser bakteriellen Eigenschaften könnte in der Zukunft Teil der personalisierten Medizin für CF-Patienten werden. Denkbar ist auch, dass diese bakteriellen Proteasen einen therapeutischen Angriffspunkt darstellen könnten.

Während sich infektiologische Untersuchungen lange Zeit auf einzelne Pathogene beschränkten, stützen die Ergebnisse dieser Arbeit die Vielzahl neuerer Literatur, die die große biologische Relevanz des Kontextes einer Infektion mitberücksichtigt. Die große Komplexität des Zusammenspiels bakterieller, viraler und fungaler Pathogene mit dem Wirt selbst und dessen Mikrobiom wird auch zukünftig ein spannendes Forschungsfeld bleiben.

## 6 Zusammenfassung

Chronische pulmonale Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa* (PA) betreffen die überwiegende Mehrheit der erwachsenen Mukoviszidose (Cystische Fibrose, CF) Patienten.

Diese Infektionen führen gesichert zu einer Abnahme der Lungenfunktion und Zunahme der Mortalität der Patienten. Atemwegsviren stehen im Verdacht pulmonale Exazerbationen bei CF-Patienten auszulösen. Unklar ist jedoch, welchen Einfluss eine chronische Infektion mit PA auf die Anfälligkeit und Reaktion des Atemwegsepithels auf virale Infektionen hat.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, die Interaktionen zwischen PA, humanen Rhinoviren (HRV) und primären bronchialen Epithelzellen zu untersuchen. Hierfür wurden Zellen von jeweils drei Patienten mit CF und mit Lungenemphysem aus Lungenexplantaten isoliert und in einem speziellen *Air-Liquid-Interface* Zellkulturmodell zu einem mukoziliär differenzierten mehrreihigen Flimmerepithel kultiviert. Chronische Infektionen wurden mit klinischen PA Isolaten für einen Gesamtzeitraum von 16 Tagen durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen mit HRV infiziert. Schlüsselzytokine, Interferone und virale RNA wurden mittels Cytometric bead array, ELISA und qPCR bestimmt.

Rein virale Infektionen mit HRV führten zu einem Anstieg von IL-1, -6, -8, TNF- $\alpha$ , IP10 und IFN- $\beta$ , IFN- $\lambda$ 1 sowie ISGs und in ähnlichem Ausmaß konnte dies auch bei Coinfektionen mit einem mukoiden PA-Isolat beobachtet werden. Coinfektionen mit einem nicht-mukoiden PA-Isolat führten im Vergleich zu rein viralen Infektionen zu vermehrter Expression von IL-1 $\beta$  und IL-6 mRNA. Während es unter diesen Bedingungen auch auf Proteinebene zu einem Anstieg der IL-1 $\beta$  Konzentration kam, lag die Konzentration von freiem IL-6 Protein in nahezu allen Proben unter der Nachweisgrenze. Zellkulturmedium aus Coinfektionen mit diesem nicht-mukoiden PA-Isolat führten zudem zu einem Abbau oder einer Bindung von extern zugegebenen rekombinantem IL-6.

IL-8, IP-10, TNF- $\alpha$  Protein und mRNA von IFN- $\beta$ , - $\lambda$ 1 und ISGs, sowie die Viruslast waren vergleichbar zwischen rein viralen Infektionen und bakteriell-viralen Coinfektionen. Ebenfalls keine Unterschiede wurden zwischen Zellen von Emphysem und CF-Spendern gefunden.

Insgesamt zeigen diese Daten, dass eine PA-Infektion die Antwort differenzierter bronchialer Epithelzellen auf eine Virusinfektion verändern kann. Die hierdurch veränderte Immunantwort und möglicherweise eingeschränkten epithelialen Reparaturmechanismen könnten eine Ursache aggravierter viraler Infektionen in *P. aeruginosa*-infizierten Atemwegen darstellen.

Ein besseres Verständnis der Interaktionen zwischen chronisch-bakteriellen und viralen Atemwegsinfektionen könnte potenziell die Behandlung virus-induzierter Exazerbationen bei PA-infizierten CF-Patienten verbessern.

## 7 Abstract

Chronic pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* (PA) infections affect the majority of adult cystic fibrosis (CF) patients. PA infections lead to a decrease in lung function and increase in mortality. Respiratory viruses are suggested to trigger pulmonary exacerbations in CF, yet it is unclear if chronic PA infections affect the susceptibility of the airway epithelium and response to viruses.

The aim of this study was to investigate interactions between PA, human rhinovirus (HRV) and primary bronchial epithelial cells. Therefore, cells from three CF and three emphysema patients were isolated and cultured as air-liquid interface cultures to achieve a mucociliary differentiated pseudostratified epithelium. Chronic infection with clinical PA isolates was carried out for a total period of 16 days. Subsequently, cells were infected with HRV. Key cytokines and viral RNA were quantified by cytometric bead array, ELISA and qPCR.

HRV infection alone increased the concentration of IL-1,-6,-8, TNF- $\alpha$ , IP10, IFN- $\beta$ , - $\lambda$ 1, ISGs and to a similar extent in cells co-infected with a mucoid PA isolate. Coinfection with a non-mucoid PA isolate increased IL-1 $\beta$  and IL-6 mRNA expression compared to pure virus infection. While this led to increased IL-1 $\beta$  protein concentrations, we found drastically decreased IL-6 protein in coinfections with this isolate.

Cell culture medium obtained from coinfections with this non-mucoid PA isolate was able to degrade or bind recombinant IL-6 in a heat-sensitive manner.

IL-8, IP-10 and TNF- $\alpha$  protein, as well as IFN- $\beta$ , - $\lambda$ 1 and ISGs mRNA and viral load did not differ between virus-infected and co-infected cells.

We could not detect significant differences in these readouts between emphysema and CF-cells.

These data show that PA infection can change the response of pBECs to viral infection. The changed immune response and possibly impaired epithelial repair could cause an aggravated outcome of viral infection in PA-infected airways. Understanding the interactions between chronic bacterial infection and respiratory viruses could potentially improve management of virus-induced exacerbations in PA-infected CF-patients.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Naehrig S, Chao CM, Naehrlich L. Cystic Fibrosis. *Dtsch Arztebl Int.* 2017;114(33-34):564-574.
2. Rochholz E. Alemannisches Kinderlied und Kinderspiel aus der Schweiz. 1857.
3. Davis PB. Cystic fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173(5):475-482.
4. Gibson LE CR. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics.* 1959;23(3):545-549.
5. di Sant'Agnese PA DR, Perera GA, Shea E. Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas; clinical significance and relationship to the disease. *Pediatrics.* 1953;12:549-563.
6. Castellani C, Duff AJA, Bell SC, et al. ECFS best practice guidelines: the 2018 revision. *J Cyst Fibros.* 2018;17(2):153-178.
7. Landsteiner K. Darmverschluss durch eingedicktes Meconium; Pankreatitis. *Centralblatt für allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie.* 1905;16:903-907.
8. Fanconi G UE, Knauer C. Das Coeliakiesyndrom bei angeborener zystischer Pankreasfibromatose und Bronchiektasen. *Wien Med Wochenschr.* 1936;86: 753-756.(86):753-756.
9. Anderson DH. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: A clinical and pathological study. *Am J Dis Child.* 1938;56(2)(56(2)):344-399.
10. Quinton PM. Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature.* 1983(301):421-422.
11. Knowlton RG, Cohen-Haguenauer, O., Van Cong, N., Frézal, J., Brown, V.A., Barker, D., Braman, J.C., Schumm, J.W., Tsui, L.C., Buchwald, M., et al. A polymorphic DNA marker linked to cystic fibrosis is located on chromosome 7. *Nature.* 1985(318):380-382.
12. Kerem B, Rommens, J.M., Buchanan, J.A., Markiewicz, D., Cox, T.K., Chakravarti, A., Buchwald, M., Tsui, L.C. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science.* 1989(245):1073-1080.
13. Riordan JR, Rommens, J.M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.L., et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science.* (245):1066-1073.
14. Rommens JM, Iannuzzi, M.C., Kerem, B., Drumm, M.L., Melmer, G., Dean, M., Rozmahel, R., Cole, J.L., Kennedy, D., Hidaka, N., et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science.* 1989(245):1059-1065.
15. Tsui LC, Dorfman R. The cystic fibrosis gene: a molecular genetic perspective. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(2):a009472.
16. Jackson AD, Goss CH. Epidemiology of CF: How registries can be used to advance our understanding of the CF population. *J Cyst Fibros.* 2018;17(3):297-305.

17. Bobadilla JL, Macek M, Jr., Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat.* 2002;19(6):575-606.
18. Regulation (EC) No 141/2000 of the European Parliament and of the Council of 16 December 1999 on orphan medicinal products.
19. Yamashiro Y, Shimizu, T., Oguchi, S., Shioya, T., Nagata, S., Ohtsuka, Y. The estimated incidence of cystic fibrosis in Japan. *J Pediatr Gastroenterol Nutrition.* 1997(24):544-547.
20. Farrell PM. The prevalence of cystic fibrosis in the European Union. *J Cyst Fibros.* 2008;7(5):450-453.
21. Silva Filho LV, Castanos C, Ruiz HH. Cystic fibrosis in Latin America-Improving the awareness. *J Cyst Fibros.* 2016;15(6):791-793.
22. Keogh RH, Bilton D, Cosgriff R, Kavanagh D, Rayner O, Sedgwick PM. Results from an online survey of adults with cystic fibrosis: Accessing and using life expectancy information. *PLoS One.* 2019;14(4):e0213639.
23. Foundation CF. Patient Registry Annual Data Report. 2017.
24. Stephenson AL, Tom M, Berthiaume Y, et al. A contemporary survival analysis of individuals with cystic fibrosis: a cohort study. *Eur Respir J.* 2015;45(3):670-679.
25. McCarthy VA, Harris A. The CFTR gene and regulation of its expression. *Pediatr Pulmonol.* 2005;40(1):1-8.
26. Elborn JS. Cystic fibrosis. *Lancet.* 2016;388(10059):2519-2531.
27. Stuhmann-Spangenberg M, Aulehla-Scholz C, Dworniczak B, Reiss J. *Leitlinie zur Molekulargenetischen Diagnostik der Cystischen Fibrose.* Vol 2|2009.
28. Dechecchi MC, Tamanini A, Cabrini G. Molecular basis of cystic fibrosis: from bench to bedside. *Ann Transl Med.* 2018;6(17):334.
29. Meng X, Clews J, Ciuta AD, Martin ER, Ford RC. CFTR structure, stability, function and regulation. *Biol Chem.* 2019.
30. Stutts MJ, Canessa, C.M., Olsen, J.C., Hamrick, M., Cohn, J.A., et al. CFTR as a cAMP-Dependent Regulator of Sodium Channels. 1995.
31. Donaldson SH, Boucher RC. Sodium channels and cystic fibrosis. *Chest.* 2007;132(5):1631-1636.
32. Gaillard EA, Kota P, Gentsch M, Dokholyan NV, Stutts MJ, Tarran R. Regulation of the epithelial Na<sup>+</sup> channel and airway surface liquid volume by serine proteases. *Pflugers Arch.* 2010;460(1):1-17.
33. Devor DC, Singh AK, Lambert LC, DeLuca A, Frizzell RA, Bridges RJ. Bicarbonate and chloride secretion in Calu-3 human airway epithelial cells. *J Gen Physiol.* 1999;113(5):743-760.
34. Choi JY, Muallem D, Kiselyov K, Lee MG, Thomas PJ, Muallem S. Aberrant CFTR-dependent HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport in mutations associated with cystic fibrosis. *Nature.* 2001;410(6824):94-97.
35. Garcia-Caballero A, Rasmussen JE, Gaillard E, et al. SPLUNC1 regulates airway surface liquid volume by protecting ENaC from proteolytic cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(27):11412-11417.
36. Pezzulo AA, Tang XX, Hoegger MJ, et al. Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung. *Nature.* 2012;487(7405):109-113.

37. Gustafsson JK, Ermund A, Ambort D, et al. Bicarbonate and functional CFTR channel are required for proper mucin secretion and link cystic fibrosis with its mucus phenotype. *J Exp Med*. 2012;209(7):1263-1272.
38. Wang Y, Wrennall JA, Cai Z, Li H, Sheppard DN. Understanding how cystic fibrosis mutations disrupt CFTR function: from single molecules to animal models. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;52:47-57.
39. Lukacs GL, Verkman AS. CFTR: folding, misfolding and correcting the DeltaF508 conformational defect. *Trends Mol Med*. 2012;18(2):81-91.
40. Bergeron C, Cantin AM. Cystic Fibrosis: Pathophysiology of Lung Disease. *Semin Respir Crit Care Med*. 2019.
41. Boucher RC. Regulation of airway surface liquid volume by human airway epithelia. *Pflugers Arch*. 2003;445(4):495-498.
42. Boucher RC. Cystic fibrosis: a disease of vulnerability to airway surface dehydration. *Trends Mol Med*. 2007;13(6):231-240.
43. Boucher RC. New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J*. 2004;23(1):146-158.
44. Dhooghe B, Noel S, Huaux F, Leal T. Lung inflammation in cystic fibrosis: pathogenesis and novel therapies. *Clin Biochem*. 2014;47(7-8):539-546.
45. Armstrong DS, Hook SM, Jansen KM, et al. Lower airway inflammation in infants with cystic fibrosis detected by newborn screening. *Pediatr Pulmonol*. 2005;40(6):500-510.
46. Cantin AM, Hartl D, Konstan MW, Chmiel JF. Inflammation in cystic fibrosis lung disease: Pathogenesis and therapy. *J Cyst Fibros*. 2015;14(4):419-430.
47. Saiman L. Microbiology of early CF lung disease. *Paediatric Respiratory Reviews*. 2004(5):367–369.
48. Zemanick ET, Wagner BD, Robertson CE, et al. Airway microbiota across age and disease spectrum in cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 2017;50(5).
49. Mahboubi MA, Carmody LA, Foster BK, Kalikin LM, VanDevanter DR, LiPuma JJ. Culture-Based and Culture-Independent Bacteriologic Analysis of Cystic Fibrosis Respiratory Specimens. *J Clin Microbiol*. 2016;54(3):613-619.
50. Coburn B, Wang PW, Diaz Caballero J, et al. Lung microbiota across age and disease stage in cystic fibrosis. *Sci Rep*. 2015;5:10241.
51. Scott JE, O'Toole GA. The Yin and Yang of Streptococcus Lung Infections in Cystic Fibrosis: a Model for Studying Polymicrobial Interactions. *J Bacteriol*. 2019;201(11).
52. Scofield JA, Wu H. Oral streptococci and nitrite-mediated interference of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*. 2015;83(1):101-107.
53. Palleroni NJ. The *Pseudomonas* story. *Environ Microbiol*. 2010;12(6):1377-1383.
54. Crone S, Vives-Florez M, Kvich L, et al. The environmental occurrence of *Pseudomonas aeruginosa*. *APMIS*. 2019.
55. Lyczaka J.B. CCL, Pier G.B. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes and Infection*. 2000(2):051–1060.

56. Tredget EE, Shankowsky HA, Rennie R, Burrell RE, Logsetty S. Pseudomonas infections in the thermally injured patient. *Burns*. 2004;30(1):3-26.
57. Sousa AM, Pereira MO. Pseudomonas aeruginosa Diversification during Infection Development in Cystic Fibrosis Lungs-A Review. *Pathogens*. 2014;3(3):680-703.
58. Engel J, Balachandran P. Role of Pseudomonas aeruginosa type III effectors in disease. *Curr Opin Microbiol*. 2009;12(1):61-66.
59. Jain M, Ramirez D, Seshadri R, et al. Type III secretion phenotypes of Pseudomonas aeruginosa strains change during infection of individuals with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 2004;42(11):5229-5237.
60. Winstanley C, O'Brien S, Brockhurst MA. Pseudomonas aeruginosa Evolutionary Adaptation and Diversification in Cystic Fibrosis Chronic Lung Infections. *Trends Microbiol*. 2016;24(5):327-337.
61. Hogardt M, Heesemann J. Microevolution of Pseudomonas aeruginosa to a chronic pathogen of the cystic fibrosis lung. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;358:91-118.
62. Passador L, Cook JM, Gambello MJ, Rust L, Iglewski BH. Expression of Pseudomonas aeruginosa virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science*. 1993;260(5111):1127-1130.
63. Jimenez PN, Koch G, Thompson JA, Xavier KB, Cool RH, Quax WJ. The multiple signaling systems regulating virulence in Pseudomonas aeruginosa. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2012;76(1):46-65.
64. Pearson JP, Feldman M, Iglewski BH, Prince A. Pseudomonas aeruginosa cell-to-cell signaling is required for virulence in a model of acute pulmonary infection. *Infect Immun*. 2000;68(7):4331-4334.
65. Smith RS, Harris SG, Phipps R, Iglewski B. The Pseudomonas aeruginosa quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)homoserine lactone contributes to virulence and induces inflammation in vivo. *J Bacteriol*. 2002;184(4):1132-1139.
66. Pesci EC, Milbank JB, Pearson JP, et al. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of Pseudomonas aeruginosa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(20):11229-11234.
67. Haussler S, Becker T. The pseudomonas quinolone signal (PQS) balances life and death in Pseudomonas aeruginosa populations. *PLoS Pathog*. 2008;4(9):e1000166.
68. Garcia-Reyes S, Soberon-Chavez G, Cocotl-Yanez M. The third quorum-sensing system of Pseudomonas aeruginosa: Pseudomonas quinolone signal and the enigmatic PqsE protein. *J Med Microbiol*. 2020;69(1):25-34.
69. Kim K, Kim YU, Koh BH, et al. HHQ and PQS, two Pseudomonas aeruginosa quorum-sensing molecules, down-regulate the innate immune responses through the nuclear factor-kappaB pathway. *Immunology*. 2010;129(4):578-588.
70. Hansch GM, Prior B, Brenner-Weiss G, Obst U, Overhage J. The Pseudomonas quinolone signal (PQS) stimulates chemotaxis of polymorphonuclear neutrophils. *J Appl Biomater Funct Mater*. 2014;12(1):21-26.



71. Wade DS, Calfee MW, Rocha ER, et al. Regulation of Pseudomonas quinolone signal synthesis in Pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol.* 2005;187(13):4372-4380.
72. Franklin MJ, Nivens DE, Weadge JT, Howell PL. Biosynthesis of the Pseudomonas aeruginosa Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl. *Front Microbiol.* 2011;2:167.
73. Maunders E, Welch M. Matrix exopolysaccharides; the sticky side of biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett.* 2017;364(13).
74. Cezairliyan BO, Sauer RT. Control of Pseudomonas aeruginosa AlgW protease cleavage of MucA by peptide signals and MucB. *Mol Microbiol.* 2009;72(2):368-379.
75. Hews CL, Cho T, Rowley G, Raivio TL. Maintaining Integrity Under Stress: Envelope Stress Response Regulation of Pathogenesis in Gram-Negative Bacteria. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9:313.
76. Damron FH, Goldberg JB. Proteolytic regulation of alginate overproduction in Pseudomonas aeruginosa. *Mol Microbiol.* 2012;84(4):595-607.
77. Bardoel BW, van der Ent S, Pel MJ, et al. Pseudomonas evades immune recognition of flagellin in both mammals and plants. *PLoS Pathog.* 2011;7(8):e1002206.
78. Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M, et al. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway Pseudomonas infections of cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Investigation.* 2002;109(3):317-325.
79. Pier GB, Grout M, Zaidi TS. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of Pseudomonas aeruginosa from the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(22):12088-12093.
80. Wang EE, Prober CG, Manson B, Corey M, Levison H. Association of respiratory viral infections with pulmonary deterioration in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med.* 1984;311(26):1653-1658.
81. Abman SH, Ogle JW, Butler-Simon N, Rumack CM, Accurso FJ. Role of respiratory syncytial virus in early hospitalizations for respiratory distress of young infants with cystic fibrosis. *J Pediatr.* 1988;113(5):826-830.
82. Kiedrowski MR, Bomberger JM. Viral-Bacterial Co-infections in the Cystic Fibrosis Respiratory Tract. *Front Immunol.* 2018;9:3067.
83. Armstrong D, Grimwood K, Carlin JB, et al. Severe viral respiratory infections in infants with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 1998;26(6):371-379.
84. van Ewijk BE, van der Zalm MM, Wolfs TF, van der Ent CK. Viral respiratory infections in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2005;4 Suppl 2:31-36.
85. Wat D, Doull I. Respiratory virus infections in cystic fibrosis. *Paediatric Respiratory Reviews.* 2003;4(3):172-177.
86. Ramsey BW, Gore EJ, Smith AL, Cooney MK, Redding GJ, Foy H. The effect of respiratory viral infections on patients with cystic fibrosis. *Am J Dis Child.* 1989;143(6):662-668.
87. Hiatt PW, Grace SC, Kozinetz CA, et al. Effects of viral lower respiratory tract infection on lung function in infants with cystic fibrosis. *Pediatrics.* 1999;103(3):619-626.

88. Smyth AR, Smyth RL, Tong CY, Hart CA, Heaf DP. Effect of respiratory virus infections including rhinovirus on clinical status in cystic fibrosis. *Arch Dis Child*. 1995;73(2):117-120.
89. Schogler A, Kopf BS, Edwards MR, et al. Novel antiviral properties of azithromycin in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Eur Respir J*. 2015;45(2):428-439.
90. Muhlebach MS, Stewart PW, Leigh MW, Noah TL. Quantitation of inflammatory responses to bacteria in young cystic fibrosis and control patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(1):186-191.
91. Cantin AM, Bilodeau G, Ouellet C, Liao J, Hanrahan JW. Oxidant stress suppresses CFTR expression. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006;290(1):C262-270.
92. Le Gars M, Descamps D, Roussel D, et al. Neutrophil elastase degrades cystic fibrosis transmembrane conductance regulator via calpains and disables channel function in vitro and in vivo. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187(2):170-179.
93. Smallman LA, Hill SL, Stockley RA. Reduction of ciliary beat frequency in vitro by sputum from patients with bronchiectasis: a serine proteinase effect. *Thorax*. 1984;39(9):663-667.
94. Birrer P, McElvaney NG, Rudeberg A, et al. Protease-antiprotease imbalance in the lungs of children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994;150(1):207-213.
95. Lethem MI, James SL, Marriott C, Burke JF. The origin of DNA associated with mucus glycoproteins in cystic fibrosis sputum. *Eur Respir J*. 1990;3(1):19-23.
96. Dean TP, Dai Y, Shute JK, Church MK, Warner JO. Interleukin-8 concentrations are elevated in bronchoalveolar lavage, sputum, and sera of children with cystic fibrosis. *Pediatr Res*. 1993;34(2):159-161.
97. Tabary O, Zahm JM, Hinnrasky J, et al. Selective up-regulation of chemokine IL-8 expression in cystic fibrosis bronchial gland cells in vivo and in vitro. *Am J Pathol*. 1998;153(3):921-930.
98. Joseph T, Look D, Ferkol T. NF-kappaB activation and sustained IL-8 gene expression in primary cultures of cystic fibrosis airway epithelial cells stimulated with *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005;288(3):L471-479.
99. Delgado MA, Poschet JF, Deretic V. Nonclassical pathway of *Pseudomonas aeruginosa* DNA-induced interleukin-8 secretion in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Infect Immun*. 2006;74(5):2975-2984.
100. De Rose V. Mechanisms and markers of airway inflammation in cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 2002;19(2):333-340.
101. Freedman SD, Blanco PG, Zaman MM, et al. Association of cystic fibrosis with abnormalities in fatty acid metabolism. *N Engl J Med*. 2004;350(6):560-569.
102. Codagnone M, Cianci E, Lamolinara A, et al. Resolvin D1 enhances the resolution of lung inflammation caused by long-term *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Mucosal Immunol*. 2018;11(1):35-49.
103. Kogan I, Ramjeesingh M, Li C, et al. CFTR directly mediates nucleotide-regulated glutathione flux. *EMBO J*. 2003;22(9):1981-1989.

104. Fritzsching B, Zhou-Suckow Z, Trojanek JB, et al. Hypoxic epithelial necrosis triggers neutrophilic inflammation via IL-1 receptor signaling in cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015;191(8):902-913.
105. Sadikot RT, Han W, Everhart MB, et al. Selective I kappa B kinase expression in airway epithelium generates neutrophilic lung inflammation. *J Immunol.* 2003;170(2):1091-1098.
106. Huber AR, Kunkel SL, Todd RF, 3rd, Weiss SJ. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science.* 1991;254(5028):99-102.
107. Montgomery ST, Mall MA, Kicic A, Stick SM, Arest CF. Hypoxia and sterile inflammation in cystic fibrosis airways: mechanisms and potential therapies. *Eur Respir J.* 2017;49(1).
108. Wielputz MO, Puderbach M, Kopp-Schneider A, et al. Magnetic resonance imaging detects changes in structure and perfusion, and response to therapy in early cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014;189(8):956-965.
109. Robinson KM, Kolls JK, Alcorn JF. The immunology of influenza virus-associated bacterial pneumonia. *Curr Opin Immunol.* 2015;34:59-67.
110. Levandowski RA, Gerrity TR, Garrard CS. Modifications of lung clearance mechanisms by acute influenza A infection. *J Lab Clin Med.* 1985;106(4):428-432.
111. Faris AN, Ganesan S, Chatteraj A, et al. Rhinovirus Delays Cell Repolarization in a Model of Injured/Regenerating Human Airway Epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2016;55(4):487-499.
112. Avadhanula V, Rodriguez CA, Devincenzo JP, et al. Respiratory viruses augment the adhesion of bacterial pathogens to respiratory epithelium in a viral species- and cell type-dependent manner. *J Virol.* 2006;80(4):1629-1636.
113. Ishizuka S, Yamaya M, Suzuki T, et al. Effects of rhinovirus infection on the adherence of *Streptococcus pneumoniae* to cultured human airway epithelial cells. *J Infect Dis.* 2003;188(12):1928-1939.
114. van der Sluijs KF, van Elden LJ, Nijhuis M, et al. Involvement of the platelet-activating factor receptor in host defense against *Streptococcus pneumoniae* during postinfluenza pneumonia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006;290(1):L194-199.
115. Yokota S, Okabayashi T, Yoto Y, Hori T, Tsutsumi H, Fujii N. Fosfomycin suppresses RS-virus-induced *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* adhesion to respiratory epithelial cells via the platelet-activating factor receptor. *FEMS Microbiol Lett.* 2010;310(1):84-90.
116. Bellinghausen C, Rohde GGU, Savelkoul PHM, Wouters EFM, Stassen FRM. Viral-bacterial interactions in the respiratory tract. *J Gen Virol.* 2016;97(12):3089-3102.
117. Van Ewijk BE, Wolfs TF, Aerts PC, et al. RSV mediates *Pseudomonas aeruginosa* binding to cystic fibrosis and normal epithelial cells. *Pediatr Res.* 2007;61(4):398-403.

118. Avadhanula V, Wang Y, Portner A, Adderson E. Nontypeable Haemophilus influenzae and Streptococcus pneumoniae bind respiratory syncytial virus glycoprotein. *J Med Microbiol.* 2007;56(Pt 9):1133-1137.
119. Okamoto S, Kawabata S, Nakagawa I, et al. Influenza A virus-infected hosts boost an invasive type of Streptococcus pyogenes infection in mice. *J Virol.* 2003;77(7):4104-4112.
120. Didierlaurent A, Goulding J, Patel S, et al. Sustained desensitization to bacterial Toll-like receptor ligands after resolution of respiratory influenza infection. *J Exp Med.* 2008;205(2):323-329.
121. van der Sluijs KF, van Elden LJ, Nijhuis M, et al. IL-10 is an important mediator of the enhanced susceptibility to pneumococcal pneumonia after influenza infection. *J Immunol.* 2004;172(12):7603-7609.
122. Ghoneim HE, Thomas PG, McCullers JA. Depletion of alveolar macrophages during influenza infection facilitates bacterial superinfections. *J Immunol.* 2013;191(3):1250-1259.
123. Robinson KM, Ramanan K, Tobin JM, et al. Survival during influenza-associated bacterial superinfection improves following viral- and bacterial-specific monoclonal antibody treatment. *JCI Insight.* 2019;4(14).
124. Small CL, Shaler CR, McCormick S, et al. Influenza infection leads to increased susceptibility to subsequent bacterial superinfection by impairing NK cell responses in the lung. *J Immunol.* 2010;184(4):2048-2056.
125. Collinson J, Nicholson KG, Cancio E, et al. Effects of upper respiratory tract infections in patients with cystic fibrosis. *Thorax.* 1996;51(11):1115-1122.
126. Johansen HK, Hoiby N. Seasonal onset of initial colonisation and chronic infection with Pseudomonas aeruginosa in patients with cystic fibrosis in Denmark. *Thorax.* 1992;47(2):109-111.
127. Stressmann FA, Rogers GB, Marsh P, et al. Does bacterial density in cystic fibrosis sputum increase prior to pulmonary exacerbation? *J Cyst Fibros.* 2011;10(5):357-365.
128. Price KE, Hampton TH, Gifford AH, et al. Unique microbial communities persist in individual cystic fibrosis patients throughout a clinical exacerbation. *Microbiome.* 2013;1(1):27.
129. Wark P. TM, Cheese L., Whitehead B., Gibson P.G., Wark K.F., McDonald V.M. Viral infections trigger exacerbations of cystic fibrosis in adults and children. *European Respiratory Journal.* 2012;40(2):508-510.
130. Chin M, De Zoysa M, Slinger R, et al. Acute effects of viral respiratory tract infections on sputum bacterial density during CF pulmonary exacerbations. *J Cyst Fibros.* 2015;14(4):482-489.
131. Chattoraj SS, Ganesan S, Jones AM, et al. Rhinovirus infection liberates planktonic bacteria from biofilm and increases chemokine responses in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Thorax.* 2011;66(4):333-339.
132. Ichinohe T, Pang IK, Kumamoto Y, et al. Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(13):5354-5359.

133. Wang J, Li F, Sun R, et al. Bacterial colonization dampens influenza-mediated acute lung injury via induction of M2 alveolar macrophages. *Nat Commun.* 2013;4:2106.
134. Wolf AI, Strauman MC, Mozdzanowska K, et al. Coinfection with *Streptococcus pneumoniae* modulates the B cell response to influenza virus. *J Virol.* 2014;88(20):11995-12005.
135. Wolf AI, Strauman MC, Mozdzanowska K, et al. Pneumolysin expression by *streptococcus pneumoniae* protects colonized mice from influenza virus-induced disease. *Virology.* 2014;462-463:254-265.
136. de Steenhuijsen Piters WA, Heinonen S, Hasrat R, et al. Nasopharyngeal Microbiota, Host Transcriptome, and Disease Severity in Children with Respiratory Syncytial Virus Infection. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016;194(9):1104-1115.
137. Sonawane AR, Tian L, Chu CY, et al. Microbiome-Transcriptome Interactions Related to Severity of Respiratory Syncytial Virus Infection. *Sci Rep.* 2019;9(1):13824.
138. Ederveen THA, Ferwerda G, Ahout IM, et al. *Haemophilus* is overrepresented in the nasopharynx of infants hospitalized with RSV infection and associated with increased viral load and enhanced mucosal CXCL8 responses. *Microbiome.* 2018;6(1):10.
139. Gulraiz F, Bellinghausen C, Bruggeman CA, Stassen FR. *Haemophilus influenzae* increases the susceptibility and inflammatory response of airway epithelial cells to viral infections. *FASEB J.* 2015;29(3):849-858.
140. Sajjan US, Jia Y, Newcomb DC, et al. *H. influenzae* potentiates airway epithelial cell responses to rhinovirus by increasing ICAM-1 and TLR3 expression. *FASEB J.* 2006;20(12):2121-2123.
141. Bellinghausen C, Gulraiz F, Heinzmann AC, et al. Exposure to common respiratory bacteria alters the airway epithelial response to subsequent viral infection. *Respir Res.* 2016;17(1):68.
142. Petersen NT, Hoiby N, Mordhorst CH, Lind K, Flensburg EW, Bruun B. Respiratory infections in cystic fibrosis patients caused by virus, chlamydia and mycoplasma--possible synergism with *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Paediatr Scand.* 1981;70(5):623-628.
143. Chattoraj SS, Ganesan S, Faris A, Comstock A, Lee WM, Sajjan US. *Pseudomonas aeruginosa* suppresses interferon response to rhinovirus infection in cystic fibrosis but not in normal bronchial epithelial cells. *Infect Immun.* 2011;79(10):4131-4145.
144. Williams C, Ranjendran R, Ramage G. Pathogenesis of Fungal Infections in Cystic Fibrosis. *Curr Fungal Infect Rep.* 2016;10(4):163-169.
145. Delfino E, Del Puente F, Briano F, Sepulcri C, Giacobbe DR. Respiratory Fungal Diseases in Adult Patients With Cystic Fibrosis. *Clin Med Insights Circ Respir Pulm Med.* 2019;13:1179548419849939.
146. Noni M, Katelari A, Dimopoulos G, Doudounakis SE, Tzoumaka-Bakoula C, Spoulou V. *Aspergillus fumigatus* chronic colonization and lung function decline in cystic fibrosis may have a two-way relationship. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015;34(11):2235-2241.
147. Hector A, Kirn T, Ralhan A, et al. Microbial colonization and lung function in adolescents with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2016;15(3):340-349.

148. Seidler MJ, Salvenmoser S, Muller FM. Aspergillus fumigatus forms biofilms with reduced antifungal drug susceptibility on bronchial epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(11):4130-4136.
149. Smith K, Rajendran R, Kerr S, et al. Aspergillus fumigatus enhances elastase production in Pseudomonas aeruginosa co-cultures. *Med Mycol.* 2015;53(7):645-655.
150. Srinivasan B, Kolli AR, Esch MB, Abaci HE, Shuler ML, Hickman JJ. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *J Lab Autom.* 2015;20(2):107-126.
151. Ramakrishnan MA. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J Virol.* 2016;5(2):85-86.
152. Killington RA, Stott EJ, Lee D. The effect of temperature on the synthesis of rhinovirus type 2 RNA. *J Gen Virol.* 1977;36(3):403-411.
153. Eickmeier O, Huebner M, Herrmann E, et al. Sputum biomarker profiles in cystic fibrosis (CF) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and association between pulmonary function. *Cytokine.* 2010;50(2):152-157.
154. Carson RT, Vignali DA. Simultaneous quantitation of 15 cytokines using a multiplexed flow cytometric assay. *J Immunol Methods.* 1999;227(1-2):41-52.
155. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y).* 1993;11(9):1026-1030.
156. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-408.
157. Jiang D, Schaefer N, Chu HW. Air-Liquid Interface Culture of Human and Mouse Airway Epithelial Cells. *Methods Mol Biol.* 2018;1809:91-109.
158. Stewart CE, Torr EE, Mohd Jamili NH, Bosquillon C, Sayers I. Evaluation of differentiated human bronchial epithelial cell culture systems for asthma research. *J Allergy (Cairo).* 2012;2012:943982.
159. Grainger CI, Greenwell LL, Lockley DJ, Martin GP, Forbes B. Culture of Calu-3 cells at the air interface provides a representative model of the airway epithelial barrier. *Pharm Res.* 2006;23(7):1482-1490.
160. Leung C, Wadsworth SJ, Yang SJ, Dorscheid DR. 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.* 2020.
161. Staudt MR, Buro-Auriemma LJ, Walters MS, et al. Airway Basal stem/progenitor cells have diminished capacity to regenerate airway epithelium in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014;190(8):955-958.
162. Forbes II. Human airway epithelial cell lines for in vitro drug transport and metabolism studies. *Pharm Sci Technolo Today.* 2000;3(1):18-27.
163. Prytherch Z, Job C, Marshall H, Oreffo V, Foster M, BeruBe K. Tissue-Specific stem cell differentiation in an in vitro airway model. *Macromol Biosci.* 2011;11(11):1467-1477.

164. Wan H, Winton HL, Soeller C, et al. Tight junction properties of the immortalized human bronchial epithelial cell lines Calu-3 and 16HBE14o. *Eur Respir J.* 2000;15(6):1058-1068.
165. Westmoreland C, Walker T, Matthews J, Murdock J. Preliminary Investigations into the use of a Human Bronchial Cell Line (16HBE14o-) to Screen for Respiratory Toxins In Vitro. *Toxicol In Vitro.* 1999;13(4-5):761-764.
166. Marvig RL, Dolce D, Sommer LM, et al. Within-host microevolution of *Pseudomonas aeruginosa* in Italian cystic fibrosis patients. *BMC Microbiol.* 2015;15:218.
167. Cramer N, Klockgether J, Wrasman K, Schmidt M, Davenport CF, Tummler B. Microevolution of the major common *Pseudomonas aeruginosa* clones C and PA14 in cystic fibrosis lungs. *Environ Microbiol.* 2011;13(7):1690-1704.
168. Shteinberg M, Elborn JS. Use of inhaled tobramycin in cystic fibrosis. *Adv Ther.* 2015;32(1):1-9.
169. Langton Hewer SC, Smyth AR. Antibiotic strategies for eradicating *Pseudomonas aeruginosa* in people with cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017;4:CD004197.
170. Ratjen F, Doring G, Nikolaizik WH. Effect of inhaled tobramycin on early *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in patients with cystic fibrosis. *Lancet.* 2001;358(9286):983-984.
171. Doring G, Conway SP, Heijerman HG, et al. Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. *Eur Respir J.* 2000;16(4):749-767.
172. Koeppen K, Barnaby R, Jackson AA, Gerber SA, Hogan DA, Stanton BA. Tobramycin reduces key virulence determinants in the proteome of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles. *PLoS One.* 2019;14(1):e0211290.
173. Sorensen M, Kantorek J, Byrnes L, et al. *Pseudomonas aeruginosa* Modulates the Antiviral Response of Bronchial Epithelial Cells. *Front Immunol.* 2020;11:96.
174. Semaniakou A, Croll RP, Chappe V. Animal Models in the Pathophysiology of Cystic Fibrosis. *Front Pharmacol.* 2018;9:1475.
175. Stoltz DA, Meyerholz DK, Pezzulo AA, et al. Cystic fibrosis pigs develop lung disease and exhibit defective bacterial eradication at birth. *Sci Transl Med.* 2010;2(29):29ra31.
176. Sutanto EN, Kicic A, Foo CJ, et al. Innate inflammatory responses of pediatric cystic fibrosis airway epithelial cells: effects of nonviral and viral stimulation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011;44(6):761-767.
177. Pervolaraki K, Rastgou Talemi S, Albrecht D, et al. Differential induction of interferon stimulated genes between type I and type III interferons is independent of interferon receptor abundance. *PLoS Pathog.* 2018;14(11):e1007420.
178. Bolen CR, Ding S, Robek MD, Kleinstein SH. Dynamic expression profiling of type I and type III interferon-stimulated hepatocytes reveals a stable hierarchy of gene expression. *Hepatology.* 2014;59(4):1262-1272.

179. Blaas D. Viral entry pathways: the example of common cold viruses. *Wien Med Wochenschr.* 2016;166(7-8):211-226.
180. Bella J, Rossmann MG. ICAM-1 receptors and cold viruses. *Pharm Acta Helv.* 2000;74(2-3):291-297.
181. Look DC, Stoll LL, Romig SA, Humlicek A, Britigan BE, Denning GM. Pyocyanin and its precursor phenazine-1-carboxylic acid increase IL-8 and intercellular adhesion molecule-1 expression in human airway epithelial cells by oxidant-dependent mechanisms. *J Immunol.* 2005;175(6):4017-4023.
182. Madjdpour C, Oertli B, Ziegler U, Bonvini JM, Pasch T, Beck-Schimmer B. Lipopolysaccharide induces functional ICAM-1 expression in rat alveolar epithelial cells in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000;278(3):L572-579.
183. Frick AG, Joseph TD, Pang L, Rabe AM, St Geme JW, 3rd, Look DC. Haemophilus influenzae stimulates ICAM-1 expression on respiratory epithelial cells. *J Immunol.* 2000;164(8):4185-4196.
184. Yu HB, Finlay BB. The caspase-1 inflammasome: a pilot of innate immune responses. *Cell Host Microbe.* 2008;4(3):198-208.
185. Franchi L, Eigenbrod T, Munoz-Planillo R, Nunez G. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol.* 2009;10(3):241-247.
186. Triantafilou K, Kar S, van Kuppeveld FJ, Triantafilou M. Rhinovirus-induced calcium flux triggers NLRP3 and NLRC5 activation in bronchial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2013;49(6):923-934.
187. Han M, Bentley JK, Rajput C, et al. Inflammasome activation is required for human rhinovirus-induced airway inflammation in naive and allergen-sensitized mice. *Mucosal Immunol.* 2019;12(4):958-968.
188. Miao EA, Mao DP, Yudkovsky N, et al. Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(7):3076-3080.
189. Yahr TL, Wolfgang MC. Transcriptional regulation of the Pseudomonas aeruginosa type III secretion system. *Mol Microbiol.* 2006;62(3):631-640.
190. Mahenthiralingam E, Campbell ME, Speert DP. Nonmotility and phagocytic resistance of Pseudomonas aeruginosa isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. *Infect Immun.* 1994;62(2):596-605.
191. Huus KE, Joseph J, Zhang L, et al. Clinical Isolates of Pseudomonas aeruginosa from Chronically Infected Cystic Fibrosis Patients Fail To Activate the Inflammasome during Both Stable Infection and Pulmonary Exacerbation. *J Immunol.* 2016;196(7):3097-3108.
192. Piper SC, Ferguson J, Kay L, et al. The role of interleukin-1 and interleukin-18 in pro-inflammatory and anti-viral responses to rhinovirus in primary bronchial epithelial cells. *PLoS One.* 2013;8(5):e63365.
193. Schmitz N, Kurrer M, Bachmann MF, Kopf M. Interleukin-1 is responsible for acute lung immunopathology but increases survival of respiratory influenza virus infection. *J Virol.* 2005;79(10):6441-6448.



194. Stokes CA, Ismail S, Dick EP, et al. Role of interleukin-1 and MyD88-dependent signaling in rhinovirus infection. *J Virol.* 2011;85(15):7912-7921.
195. Chen Y, Garvin LM, Nickola TJ, Watson AM, Colberg-Poley AM, Rose MC. IL-1beta induction of MUC5AC gene expression is mediated by CREB and NF-kappaB and repressed by dexamethasone. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2014;306(8):L797-807.
196. Fujisawa T, Chang MM, Velichko S, et al. NF-kappaB mediates IL-1beta- and IL-17A-induced MUC5B expression in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011;45(2):246-252.
197. Henke MO, John G, Germann M, Lindemann H, Rubin BK. MUC5AC and MUC5B mucins increase in cystic fibrosis airway secretions during pulmonary exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;175(8):816-821.
198. Montgomery ST, Frey DL, Mall MA, Stick SM, Kicic A. Rhinovirus Infection Is Associated With Airway Epithelial Cell Necrosis and Inflammation via Interleukin-1 in Young Children With Cystic Fibrosis. *Frontiers in Immunology.* 2020;11.
199. Cohen TS, Prince AS. Activation of inflammasome signaling mediates pathology of acute *P. aeruginosa* pneumonia. *J Clin Invest.* 2013;123(4):1630-1637.
200. Schultz MJ, Rijneveld AW, Florquin S, Edwards CK, Dinarello CA, van der Poll T. Role of interleukin-1 in the pulmonary immune response during *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002;282(2):L285-290.
201. Conese M, Copreni E, Gioia SD, Rinaldis PD, Fumarulo R. Neutrophil recruitment and airway epithelial cell involvement in chronic cystic fibrosis lung disease. *Journal of Cystic Fibrosis.* 2003;2(3):129-135.
202. DiMango E, Zar HJ, Bryan R, Prince A. Diverse *Pseudomonas aeruginosa* gene products stimulate respiratory epithelial cells to produce interleukin-8. *J Clin Invest.* 1995;96(5):2204-2210.
203. Rada B, Leto TL. Pyocyanin effects on respiratory epithelium: relevance in *Pseudomonas aeruginosa* airway infections. *Trends Microbiol.* 2013;21(2):73-81.
204. Alves MP, Schogler A, Ebener S, et al. Comparison of innate immune responses towards rhinovirus infection of primary nasal and bronchial epithelial cells. *Respirology.* 2016;21(2):304-312.
205. Bodini A, D'Orazio C, Peroni D, et al. Biomarkers of neutrophilic inflammation in exhaled air of cystic fibrosis children with bacterial airway infections. *Pediatr Pulmonol.* 2005;40(6):494-499.
206. Fujitani S, Sun HY, Yu VL, Weingarten JA. Pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*: part I: epidemiology, clinical diagnosis, and source. *Chest.* 2011;139(4):909-919.
207. Chatzinikolaou I, Abi-Said D, Bodey GP, Rolston KV, Tarrand JJ, Samonis G. Recent experience with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in patients with cancer: Retrospective analysis of 245 episodes. *Arch Intern Med.* 2000;160(4):501-509.

208. Rada B. Interactions between Neutrophils and *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis. *Pathogens*. 2017;6(1).
209. Laval J, Ralhan A, Hartl D. Neutrophils in cystic fibrosis. *Biol Chem*. 2016;397(6):485-496.
210. Roesch EA, Nichols DP, Chmiel JF. Inflammation in cystic fibrosis: An update. *Pediatr Pulmonol*. 2018;53(S3):S30-S50.
211. Osika E, Cavaillon JM, Chadelat K, et al. Distinct sputum cytokine profiles in cystic fibrosis and other chronic inflammatory airway disease. *Eur Respir J*. 1999;14(2):339-346.
212. Kim JS, Okamoto K, Rubin BK. Pulmonary function is negatively correlated with sputum inflammatory markers and cough clearability in subjects with cystic fibrosis but not those with chronic bronchitis. *Chest*. 2006;129(5):1148-1154.
213. Mayer-Hamblett N, Aitken ML, Accurso FJ, et al. Association between pulmonary function and sputum biomarkers in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(8):822-828.
214. Vitenberga Z, Pilmane M, Babjoniseva A. An Insight into COPD Morphopathogenesis: Chronic Inflammation, Remodeling, and Antimicrobial Defense. *Medicina (Kaunas)*. 2019;55(8).
215. Edwards MR, Mukaida N, Johnson M, Johnston SL. IL-1beta induces IL-8 in bronchial cells via NF-kappaB and NF-IL6 transcription factors and can be suppressed by glucocorticoids. *Pulm Pharmacol Ther*. 2005;18(5):337-345.
216. Shi L, Manthei DM, Guadarrama AG, Lenertz LY, Denlinger LC. Rhinovirus-induced IL-1beta release from bronchial epithelial cells is independent of functional P2X7. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012;47(3):363-371.
217. Standiford TJ, Kunkel SL, Basha MA, et al. Interleukin-8 gene expression by a pulmonary epithelial cell line. A model for cytokine networks in the lung. *J Clin Invest*. 1990;86(6):1945-1953.
218. Zhu Z, Tang W, Ray A, et al. Rhinovirus stimulation of interleukin-6 in vivo and in vitro. Evidence for nuclear factor kappa B-dependent transcriptional activation. *J Clin Invest*. 1996;97(2):421-430.
219. Eda H, Burnette BL, Shimada H, Hope HR, Monahan JB. Interleukin-1beta-induced interleukin-6 production in A549 cells is mediated by both phosphatidylinositol 3-kinase and interleukin-1 receptor-associated kinase-4. *Cell Biol Int*. 2011;35(4):355-358.
220. Jiang Z, Kunimoto M, Patel JA. Autocrine regulation and experimental modulation of interleukin-6 expression by human pulmonary epithelial cells infected with respiratory syncytial virus. *J Virol*. 1998;72(3):2496-2499.
221. Saint-Criq V, Villeret B, Bastaert F, et al. *Pseudomonas aeruginosa* LasB protease impairs innate immunity in mice and humans by targeting a lung epithelial cystic fibrosis transmembrane regulator-IL-6-antimicrobial-repair pathway. *Thorax*. 2018;73(1):49-61.
222. Rowe HM, Meliopoulos VA, Iverson A, Bomme P, Schultz-Cherry S, Rosch JW. Direct interactions with influenza promote bacterial adherence during respiratory infections. *Nat Microbiol*. 2019;4(8):1328-1336.

223. Smith CM, Sandrini S, Datta S, et al. 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*. 2014;190(2):196-207.
224. Repnik U, Starr AE, Overall CM, Turk B. Cysteine Cathepsins Activate ELR Chemokines and Inactivate Non-ELR Chemokines. *J Biol Chem*. 2015;290(22):13800-13811.
225. Van den Steen PE, Proost P, Wuyts A, Van Damme J, Opdenakker G. Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood*. 2000;96(8):2673-2681.
226. Zhao W, Oskeritzian CA, Pozez AL, Schwartz LB. Cytokine production by skin-derived mast cells: endogenous proteases are responsible for degradation of cytokines. *J Immunol*. 2005;175(4):2635-2642.
227. Waern I, Karlsson I, Pejler G, Wernersson S. IL-6 and IL-17A degradation by mast cells is mediated by a serglycin:serine protease axis. *Immun Inflamm Dis*. 2016;4(1):70-79.
228. Jones SA. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol*. 2005;175(6):3463-3468.
229. McLoughlin RM, Jenkins BJ, Grail D, et al. IL-6 trans-signaling via STAT3 directs T cell infiltration in acute inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(27):9589-9594.
230. Fielding CA, McLoughlin RM, McLeod L, et al. IL-6 regulates neutrophil trafficking during acute inflammation via STAT3. *J Immunol*. 2008;181(3):2189-2195.
231. Dienz O, Rincon M. The effects of IL-6 on CD4 T cell responses. *Clin Immunol*. 2009;130(1):27-33.
232. Yang ML, Wang CT, Yang SJ, et al. IL-6 ameliorates acute lung injury in influenza virus infection. *Sci Rep*. 2017;7:43829.
233. Lauder SN, Jones E, Smart K, et al. Interleukin-6 limits influenza-induced inflammation and protects against fatal lung pathology. *Eur J Immunol*. 2013;43(10):2613-2625.
234. Pyle CJ, Uwadiae FI, Swieboda DP, Harker JA. Early IL-6 signalling promotes IL-27 dependent maturation of regulatory T cells in the lungs and resolution of viral immunopathology. *PLoS Pathog*. 2017;13(9):e1006640.
235. Doyle WJ, Casselbrant ML, Li-Korotky HS, et al. The interleukin 6 -174 C/C genotype predicts greater rhinovirus illness. *J Infect Dis*. 2010;201(2):199-206.
236. van der Poll T, Keogh CV, Guirao X, Buurman WA, Kopf M, Lowry SF. Interleukin-6 gene-deficient mice show impaired defense against pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis*. 1997;176(2):439-444.
237. Ladel CH, Blum C, Dreher A, Reifenberg K, Kopf M, Kaufmann SH. Lethal tuberculosis in interleukin-6-deficient mutant mice. *Infect Immun*. 1997;65(11):4843-4849.
238. Schwarz C, Schulte-Hubbert B, Bend J, et al. [CF Lung Disease - a German S3 Guideline: Module 2: Diagnostics and Treatment in Chronic Infection with *Pseudomonas aeruginosa*]. *Pneumologie*. 2018;72(5):347-392.

## **9 Danksagung**

Für Veröffentlichung im Hochschulpublikationssystem entfernt.

## **10 Lebenslauf**

Für Veröffentlichung im Hochschulpublikationssystem entfernt.



## 11 Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

„*Pseudomonas aeruginosa* moduliert die inflammatorische Antwort des Atemwegsepithels auf Rhinovirusinfektionen“ im Zentrum der Inneren Medizin, Medizinischen Klinik I, Schwerpunkt Pneumologie und Allergologie unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Gernot Rohde mit Unterstützung durch Dr. Carla Bellinghausen ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.