

AUS DER ARBEITSGRUPPE LUNG INFECTION & REPAIR
DER FORSCHUNGSEINHEIT LUNG REPAIR AND REGENERATION
des Comprehensive Pneumology Center (CPC-M)
Ludwig-Maximilians-Universität München, Asklepios Fachkliniken
München-Gauting und Helmholtz Zentrum München

Vorstand: Prof. Dr. Erika von Mutius

**DIE ROLLE VON INTERFERON LAMBDA
IM KONTEXT DER FIBROSE
UND INFEKTION DER LUNGE DURCH MHV-68**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München



vorgelegt von
Lucas Philipp Csallner
Aus München
2022

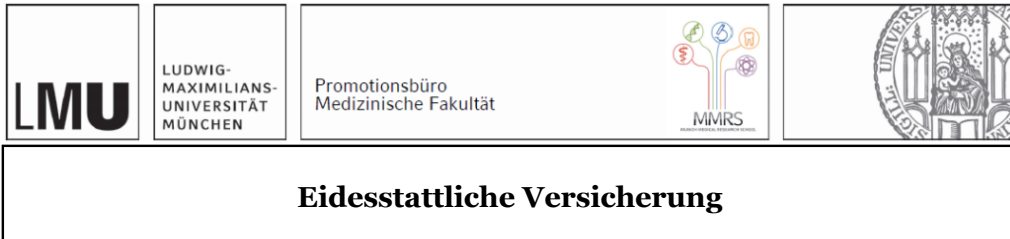
MIT GENEHMIGUNG DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

BERICHTERSTATTER: Prof. Dr. Heiko Adler

MITBERICHTERSTATTER: Prof. Dr. Karl-Klaus Conzelmann

DEKAN: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

TAG DER MÜNDLICHEN PRÜFUNG: 29.09.2022



Eidesstattliche Versicherung

Csallner, Lucas

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

DIE ROLLE VON INTERFERON LAMBDA IM KONTEXT DER FIBROSE
UND INFEKTION DER LUNGE DURCH MHV- 68

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Berlin, 23.10.2022

Lucas Csallner

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand



Dekanat Medizinische Fakultät
Promotionsbüro



Confirmation of congruency between printed and electronic version of the doctoral thesis

Doctoral candidate: Herr Lucas Csallner

I hereby declare that the electronic version of the submitted thesis, entitled

Die Rolle von Interferon lambda im Kontext der Fibrose und Infektion der Lunge durch MHV-68

is congruent with the printed version both in content and format.

Berlin, 23.10.2022

Place, Date

Lucas Csallner

Signature doctoral candidate

1. ZUSAMMENFASSUNG	8
1.1. Hintergrund	8
1.2. Methoden	8
1.2.1. Zellkultur	8
1.2.2. Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)	8
1.2.3. FACS-Analyse	9
1.2.4. Plaque Assay	9
1.2.5. Statistik	9
1.3. Ergebnisse & Schlussfolgerungen	9
1.3.1. Infektionsexperimente	9
1.3.2. Stimulationsexperimente	10
2. ABSTRACT (ENGLISH)	12
2.1. Background	12
2.2. Methods	12
2.2.1. Cell-culture	12
2.2.2. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)	12
2.2.3. FACS-analysis	12
2.2.4. Plaque-assay	13
2.2.5. Statistics	13
2.3. Results & conclusions	13
2.3.1. Experiments of infection	13
2.3.2. Experiments of stimulation	13
3. EINLEITUNG	16
3.1. Die Idiopathische Lungenfibrose	16
3.1.1. IPF in der Gruppe der interstitiellen Lungenerkrankungen (TABELLE 1)	16
3.1.2. Pathogenese der IPF (ABBILDUNG 1)	17
3.1.2.1. Die Makrophagenpolarisation im Rahmen der IPF-Pathogenese	19
3.1.3. Therapie und Prognose der IPF	20
3.2. Interferon-lambda	21
3.2.1. Die Familie der Interferone	21
3.2.1.1. Typ-I Interferone	21
3.2.1.2. Typ-II Interferon	23
3.2.1.3. Typ-III Interferone	23
3.2.1.4. Die Gruppe der Interferon-Stimulated-Genes	26
3.3. MHV-68	27
3.3.1. Die Familie der Herpesviridae	27
3.3.2. Klassifikation	28
3.3.2.1. Alphaherpesvirinae	28
3.3.2.2. Betaherpesvirinae	28
3.3.2.3. Gammaherpesvirinae	28
3.3.3. Morphologie der Herpesviridae (ABBILDUNG 4)	29
3.3.4. MHV-68	30
3.3.5. Interferone und MHV-68	32
3.3.6. Vergleichbarkeit von MHV-68 mit humanen Gammaherpesviren	32
3.3.7. MHV-68 und die idiopathische Lungenfibrose	33
4. HYPOTHESE	34

5. MATERIAL	34
5.1. Geräte	34
5.2. Primer	35
5.3. Software	36
5.4. Reagenzien	36
5.5. Verbrauchsmaterialien	38
6. METHODEN	39
6.1. Zellkultur	39
6.1.1. Zelltypen	39
6.1.2. Zellkulturmedien	40
6.1.3. Passagierung der Zellen	40
6.1.4. Zellzählung und Einstellung einer gewünschten Zellkonzentration	41
6.1.5. Einfrieren der Zellen	41
6.1.6. Auftauen der Zellen	41
6.2. Rekonstitution der Zytokine	41
6.2.1. Interleukin 4 (IL-4)	41
6.2.2. TGF- β 1	42
6.2.3. Interferon lambda 2 und Interferon lambda 3	42
6.3. Molekularbiologische Methoden	42
6.3.1. RNA Isolation	42
6.3.2. Reverse Transkription	42
6.3.3. Quantitative Real-Time-Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)	43
6.3.3.1. Das Prinzip der Polymerase Kettenreaktion (PCR)	43
6.3.3.2. Das Prinzip der quantitativen Echtzeit-PCR (qRT-PCR)	43
6.3.3.3. Durchführung der qRT-PCR	44
6.4. Test der antiviralen Wirksamkeit von Interferon-lambda gegen MHV-68	45
6.4.1. Stimulation mit IFNL und Infektion mit MHV-68	45
6.4.2. Plaque Assay	46
6.4.2.1. Das Prinzip des Plaque Assay	46
6.4.2.2. Durchführung des Plaque Assay	46
6.5. FACS Analyse	47
6.5.1. Das Prinzip der FACS-Analyse	47
6.5.2. Durchführung der FACS-Analyse	48
6.6. Statistische Auswertung	49
7. ERGEBNISSE	51
7.1. Infektionsexperimente	51
7.1.1. Übersicht Infektionsexperimente	51
7.1.2. Analyse der Genexpression nach Infektion mit MHV-68	52
7.1.2.1. Einzelzellkulturen	52
7.1.2.1.1. Durchführung Einzelzellkultur	52
7.1.2.1.2. Ergebnisse Einzelzellkultur (ABBILDUNG 9)	53
7.1.2.2. Co-Kultur LA-4 und MH-S	53
7.1.2.2.1. Durchführung Co-Kultur	53
7.1.2.2.2. Ergebnisse Co-Kultur (ABBILDUNG 10)	54
7.1.2.3. In vivo Lungengewebe	55
7.1.2.3.1. Durchführung in vivo Lungengewebe	55

7.1.2.3.2.	Ergebnisse in vivo Lungengewebe (ABBILDUNG 11)	56
7.1.3.	Antivirale Wirksamkeit von IFNL	56
7.1.3.1.	Durchführung „antivirale Wirksamkeit von IFNL“	56
7.1.3.2.	Ergebnisse antivirale Wirksamkeit von IFNL (ABBILDUNG 12)	59
7.2.	Stimulationsexperimente	60
7.2.1.	Übersicht Stimulationsexperimente (ABBILDUNG 13)	60
7.2.2.	Einzelzellkultorexperimente	61
7.2.2.1.	Durchführung Dosisfindungsexperimente	61
7.2.2.2.	Durchführung Timecourse Experimente	62
7.2.2.3.	Ergebnisse Dosisfindungsexperimente (ABBILDUNG 14 und ABBILDUNG 15)	62
7.2.2.4.	Ergebnisse Timecourse-Experimente von LA-4 und CCL-206 (ABBILDUNG 16)	65
7.2.2.4.1.	CCL-206	65
7.2.2.4.2.	LA-4	66
7.2.2.5.	Ergebnisse des Timecourse-Experiments mit MLE-12 (ABBILDUNG 17)	68
7.2.3.	Co-Kultorexperiment	70
7.2.3.1.	Durchführung Co-Kultorexperimente	70
7.2.3.2.	Ergebnisse Co-Kultorexperimente (ABBILDUNG 18)	70
7.2.4.	Stimulation mit TGF- β	70
7.2.4.1.	Durchführung	71
7.2.4.2.	Ergebnisse (ABBILDUNG 19)	72
7.2.4.2.1.	CCL-206	72
7.2.4.2.2.	LA-4	72
7.2.5.	Makrophagenpolarisation durch IL-4	72
7.2.5.1.	Durchführung Makrophagenpolarisation	72
7.2.5.2.	Ergebnisse Makrophagenpolarisation (ABBILDUNG 20)	74
7.3.	IFNL-Rezeptor-Darstellung mittels FACS	76
7.3.1.	Durchführung FACS-Analyse	76
7.3.2.	Ergebnisse FACS-Analyse (ABBILDUNG 22)	78
8.	DISKUSSION & AUSBLICK	80
8.1.	Infektionsexperimente	81
8.1.1.	Die Expression von IFNL oder dem IFNL-Rezeptor nach Infektion	81
8.1.1.1.	Einzelzellkultorexperimente	81
8.1.1.2.	Co-Kultorexperimente	84
8.1.1.3.	In vivo Lungengewebe	84
8.1.2.	Die antivirale Wirksamkeit von IFNL	85
8.2.	Stimulationsexperimente	85
8.2.1.	Die Expression von EMT-und Fibrosemarkern durch Stimulation mit IFNL	85
8.2.1.1.	Einzelzellkultorexperimente	86
8.2.1.2.	Co-Kultorexperiment	87
8.2.2.	Inhibition der pro-fibrotischen Wirkung von TGF- β	88
8.2.3.	Inhibition der IL-4 induzierten Makrophagenpolarisation	89
9.	DANKSAGUNG	91
10.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	92
11.	TABELLENVERZEICHNIS	95
12.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	95
13.	LITERATURVERZEICHNIS	96

1. Zusammenfassung

1.1. Hintergrund

Interferon lambda (IFNL) wurde im Jahr 2003 erstmals beschrieben und gehört zur Zytokinfamilie der Interferone. Im menschlichen Körper entfaltet es vor allem in epithelzellreichen Organen wie der Lunge seine Wirkung. Dabei ist es als Teil der Immunantwort gegen zahlreiche Pathogene wie Bakterien, Viren oder Pilze aktiv und ähnelt in seiner Wirkungsweise den Typ-I-Interferonen [1]. In Forschungsarbeiten der letzten Jahre wurde IFNL häufig im Zusammenhang mit der Pathogenese chronischer Erkrankungen wie Asthma [2], [3] oder der Fibrose verschiedener Organe diskutiert [4]–[7]. Darunter gehört die Fibrose der Lunge zu den am wenigsten untersuchten Erkrankungen. Zudem häufen sich in den letzten Jahren Hinweise darauf, dass dieses Zytokin bei pathologischen Wundheilungs- und Fibrose-Prozessen der Lunge eine entscheidende Rolle spielen könnte [7]–[9]. Ein seit langem bekanntes Schlüsselzytokin der pulmonalen Fibrogenese ist TGF- β [10], [11]. Neben stimulierenden Effekten auf die Bildung von extrazellulärer Matrix gehört es außerdem zu den wichtigsten Induktoren der EMT [12], [13]. Ein weiteres Zytokin, das durch die Initiierung der alternativen Makrophagenaktivierung (oder: M2-Polarisation) an der Fibrogenese der IPF teilnimmt ist Interleukin 4 (IL-4) [8], [9], [14]. Grund hierfür ist, dass IL-4 aktivierte M2-Makrophagen anti-inflammatorische Zytokine wie TGF- β bilden, die für die IPF-Pathogenese von zentraler Bedeutung sind [15].

Die Liste der potentiellen Co-Faktoren der IPF-Pathogenese ist lang. Auch Herpesviren werden in diesem Kontext diskutiert [16]–[19]. Für die Erforschung der IPF-Pathogenese bietet sich unter anderem das IFN γ RRKo-Mausmodell an. In diesem Tiermodell werden genetisch veränderte IFN γ RRKo-Mäuse mit dem murinen Gammaherpesvirus 68 (MHV-68 oder MuHV-4) infiziert und entwickeln nach Wochen bis Monaten eine Multiorganfibrose, von der auch die Lunge betroffen ist [20], [21]. Der Zusammenhang zwischen der MHV-68 Infektion der Lunge, dem Zytokin IFNL und der Entstehung der Lungenfibrose sollte in dieser Arbeit näher untersucht werden.

1.2. Methoden

1.2.1. Zellkultur

Für die in-vitro Experimente wurden murine Zelltypen verwendet. Dabei kamen LA-4 (Lungenepithelzellen), MLE-12 (Lungenepithelzellen), CCL-206 (Lungenfibroblasten) und MH-S (Alveolarmakrophagen) zum Einsatz. Die Zellen wurden dabei mit dem entsprechenden Zellmedium aufgetaut, passagiert, im Verlauf geerntet, ausgezählt und für die Experimente verwendet. Für die Experimente wurden die Zellen mit Medium in einer Konzentration von 50.000 Zellen pro Milliliter verdünnt.

1.2.2. Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die mRNA der geernteten und ausgezählten Zellen wurde gemäß des Nucleospin® RNA Plus isoliert und deren Konzentration mit dem Spectrophotometer Nanodrop™ 2000 bestimmt. Danach wurde eine mRNA-ddH₂O-Suspension mit einer mRNA-Konzentration von 50ng/ μ l hergestellt, revers transkribiert und für die qRT-PCR verwendet. Hierfür wurde die, während der reversen Transkription hergestellte, cDNA mit dem PowerSYBR® Green Master Mix vermischt und in 96-Well Platten gegeben. Das 7300 Real Time PCR System von Applied Biosystems quantifizierte die Menge an cDNA mit Hilfe der Messung der Fluoreszenzstärke des interkalierten PowerSYBR® Green. Die dabei ermittelten Ct-Werte wurden mit der 2^{- Δ Ct}-Methode graphisch dargestellt.

1.2.3. FACS-Analyse

Für den Nachweis des IFNL-Rezeptors IL28Ra auf LA-4 und MLE-12 wurde die Methode des Fluorescence-Activated-Cell-Sorting (FACS) angewandt. Dafür wurden die Zellen mit einem primären (IgG, goat anti-mouse Antikörper gegen IL28Ra) und einem sekundären Antikörper (Alexa Fluor 488-FITC rabbit anti-goat IgG) gefärbt und das Fluoreszenzsignal mit Hilfe des Durchflusszytometers FACS Calibur von BD Biosciences gemessen. Die Fluoreszenzstärke des sekundären Antikörpers ohne primären Antikörper wurde dabei als Negativkontrolle verwendet. Die graphische Auswertung und Darstellung der Daten erfolgte mit dem Programm FlowJo™ von BD Biosciences.

1.2.4. Plaque Assay

Die antivirale Wirksamkeit von IFNL wurde mit Hilfe des Plaque-Assay gemessen. Hierfür wurden MLE-12 und LA-4 zunächst mit IFNL2 und IFNL3 in Kombination oder mit der IFNL-Trägerlösung als Negativprobe behandelt. Nach 6 Stunden wurden die Zellen dann mit MHV-68 infiziert und für bis zu 120 Stunden inkubiert. Um nach der Inkubationszeit die intrazellulären Virionen freizusetzen, wurden die Zellen wiederholt eingefroren und aufgetaut. Im Anschluss wurde die Virussuspension auf einen Zellrasen von Hamster-Fibroblasten (BHK-21) gegeben und für 5 Tage inkubiert. In dieser Zeit infizierte das Virus die Zellen, wobei jedes Virion ein Loch im Zellrasen, ein sogenanntes Plaque, verursachte. Nach der Inkubation wurden die Plaques ausgezählt, in Plaque-Forming-Units pro Milliliter (PFU/ml) umgerechnet und für die Anfertigung der Virus-Wachstumskurven verwendet.

1.2.5. Statistik

Die Statistische Auswertung und die Anfertigung der Graphen erfolgte mit dem Programm Graphpad Prism 9. Bei normalverteilten Gruppen wurde mit der ANOVA getestet. War mindestens eine Gruppe nicht normalverteilt, erfolgte die Auswertung mit dem nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Test. Zur statistischen Analyse der Experimente zur antiviralen Wirksamkeit (siehe 7.1.3) wurde der Two-Way-ANOVA-Test verwendet. Dabei wurden die zwei Faktoren „Behandlung“ und „Zeit“ auf Signifikanz untersucht.

Resultate mit einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ wurden als signifikant gewertet.

1.3. Ergebnisse & Schlussfolgerungen

1.3.1. Infektionsexperimente

Ein bedeutender Teil der Experimente dieser Arbeit stellen die Infektionsexperimente dar. Dabei wurde die Genexpression verschiedener Zelltypen in vitro und die Genexpression in murinem Lungengewebe nach Infektion von Mäusen mit MHV-68 analysiert.

Eines der wichtigsten Erkenntnisse dieser Experimente ist die antivirale Wirksamkeit von IFNL in den Lungenepithelzellen MLE-12. Hier konnte zum ersten Mal eine direkte Aktivität von IFNL in Lungenepithelzellen gegen MHV-68 nachgewiesen werden. In Zukunft sollte mit Hilfe von Experimenten am Mausmodell die Funktion von IFNL bei einer MHV-68-Infektion der Lunge in vivo untersucht werden.

Im Gegensatz dazu wurde die Virusreplikation in LA-4 durch Stimulation mit IFNL nicht beeinflusst. Die anschließend durchgeführte FACS-Analyse zeigte, dass LA-4 den IFNL-Rezeptor IL28Ra nicht exprimiert. In der Genexpressionsanalyse konnte diese Erkenntnis durch das auffallend niedrige Expressionsniveau des IFNL-Rezeptors in LA-4 bestätigt werden.

Neben der antiviralen Wirkung von IFNL in MLE-12 konnte auch in **homogenisiertem Lungengewebe eine ausgeprägte IFNL-Expressionserhöhung nach MHV-68-Infektion nachgewiesen werden.** Damit liegt die Vermutung einer antiviralen Wirksamkeit von IFNL in der Lunge auf der Hand und sollte in Zukunft im Mausmodell untersucht werden.

Auch die postinfektiöse IFNL- und IFNL-Rezeptorexpression wurde *in vitro* gemessen. Jedoch konnte bei keinem der untersuchten Zelltypen (LA-4, MLE-12 und MH-S) eine relevante Genregulation festgestellt werden.

1.3.2. Stimulationsexperimente

Neben den Infektionsexperimenten befasste sich diese Arbeit mit der Stimulation verschiedener Zelltypen *in vitro*. Als Stimulantien wurden die Zytokine Interferon lambda (IFNL), Transforming growth-Faktor-beta (TGF- β) und Interleukin 4 (IL-4) verwendet. TGF- β gehört durch Effektor-Mechanismen wie der Umwandlung von Fibroblasten zu Myofibroblasten oder der Stimulation zur Bildung extrazellulärer Matrix zu den Schlüssel-Zytokinen der IPF-Pathogenese [10], [11]. Ein Teil dieser Experimente befasste sich mit der Frage, ob IFNL das typische Expressionsmuster von TGF- β auf genetischer Ebene beeinflusst. Dazu wurden Lungenepithelzellen und Lungenfibroblasten zunächst mit IFNL, und im Anschluss mit TGF- β stimuliert und deren Genexpression analysiert.

Th2-Zytokine wie Interleukin 4 (IL-4) und Interleukin 13 gehören zu den Induktoren der M2-Polarisation [14]. IL-4 ist auch *in vitro* ein etablierter M2-Induktor [22], [23] und wurde in den Experimenten zur Makrophagen-Polarisation mit MH-S (siehe 7.2.5) verwendet. In diesen Experimenten sollte ein möglicher Einfluss von IFNL auf die alternative Aktivierung und auf die Expression von TGF- β aufgedeckt werden. Dafür wurden MH-S für 4h mit IFNL vorbehandelt, anschließend mit IL-4 stimuliert und die Expression von Arginase-1 sowie TGF- β 1 und TGF- β 2 mit Hilfe der qRT-PCR analysiert. Arginase-1 diente hier als Positivkontrollgen für die M2-Polarisation.

In den Stimulationsexperimenten mit IFNL konnte **in LA-4 keine relevante Expressionsregulation gemessen werden. Grund hierfür ist die fehlende IFNL-Rezeptorexpression** auf der Oberfläche dieser Lungenepithelzellen. Dagegen konnte in einem ersten Experiment mit MLE-12 eine relevant erhöhte Expression von Collagen, E-Cadherin und N-Cadherin gemessen werden. Dieses Expressionsmuster ist ein überraschendes Ergebnis, weil die Expression der beiden Cadherine im Normalfall nicht gleichsinnig ausfällt. E-Cadherin ist für die Bildung von Zellkontakten zuständig und wird von polar organisierten Epithelzellen exprimiert. N-Cadherin wird dagegen in mesenchymalen Zellen exprimiert, die nicht in Epithelzellverbänden vorkommen [24], [25]. Bei der Epithelialen-Mesenchymalen-Transition (EMT) kommt es beispielsweise im Rahmen der IPF-Pathogenese zur Umwandlung von Epithelzellverbänden in mesenchymale Zellen, die von einer Erniedrigung der E-Cadherin-Expression und einer Erhöhung der N-Cadherin- und Collagen-Expression begleitet wird [26]–[29]. Die hier beobachtete Erhöhung des Gens für Collagen spricht für die Bildung von extrazellulärer Matrix und wäre eher einem mesenchymalen Zelltyp zuzuschreiben.

Grund für das hier beobachtete Genexpressionsmuster könnte eine Art Intermediärstadium zwischen dem epithelialen Phänotyp von MLE-12 und einem mesenchymalen Phänotyp sein, das schon in verschiedenen Krebszellen während der EMT nachgewiesen werden konnte [30]. Vor einer endgültigen Schlussfolgerung muss dieses Ergebnis durch Wiederholungen des Experiments evaluiert werden.

Ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit war die **Hochregulation von E-Cadherin in murinen Lungenfibroblasten nach IFNL-Stimulation**. Trotz der fehlenden Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit ist dieses Ergebnis durchaus überraschend. Wie oben bereits erwähnt ist eine Expressionserhöhung von E-Cadherin hauptsächlich von Epithelzellen zu erwarten und wird in Lungenfibroblasten aufgrund ihrer Mobilität im Gewebe nur in Ausnahmefällen, wie im Prozess der Metastasierung im Rahmen einer Tumorerkrankung, beobachtet [31]–[35]. Somit wurde hier zum ersten Mal gezeigt, dass IFNL eine erhöhte E-Cadherin-Expression in murinen Lungenfibroblasten hervorruft. Im Hinblick auf die obigen Überlegungen zur EMT und MET könnte dieses Ergebnis der erste Hinweis auf eine Mesenchymale-Epitheliale Transition von Lungenfibroblasten sein. Ein ähnliches Ergebnis erzielte

Sheng et al. im Jahr 2006. In dieser Arbeit konnte die MET mit einer Erhöhung von E-Cadherin von embryonalen Mausfibroblasten in Verbindung gebracht werden [36]. Literatur zu diesem Ergebnis ist bis heute rar und sollte Grund für die vermehrte Untersuchung einer möglicherweise MET-induzierenden Wirkung von IFNL in Fibroblasten sein.

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass **IFNL die Expression TGF- β -induzierter Gene wie Fibronectin, Collagen und alpha-SMA in Lungenfibroblasten hemmt**. Zellen bilden Fibronectin und Collagen im Rahmen der Produktion von extrazellulärer Matrix [37]. Alpha-SMA wird im Zuge der Umwandlung von Fibroblasten zu Myofibroblasten vermehrt exprimiert und ist wie die Bildung extrazellulärer Matrix ein zentraler Prozess der IPF-Pathogenese [38], [39]. Somit könnte hier der erste Hinweis für eine hemmende Wirkung von IFNL auf die IPF-typische Genexpression von Lungenfibroblasten vorliegen. Zur Validierung dieser Ergebnisse sind weitere Experimente dieser Art notwendig. Hierbei sollte im Hinblick auf die MET (siehe oben) auch E-Cadherin in zukünftigen Arbeiten mit Lungenfibroblasten untersucht werden.

In den Experimenten zur IL-4 induzierten Makrophagenpolarisation stellte sich heraus, dass der murine Typ-III-Interferon-Subtyp **IFNL2 die Expression von TGF- β 1 und TGF- β 2 in Alveolarmakrophagen stimuliert**. TGF- β stellt eines der wichtigsten Zytokine im Rahmen der EMT und der Lungenfibrose dar. Somit spricht dieses Ergebnis für eine indirekt-agonistische Wirkung von IFNL auf die Makrophagen-vermittelte Fibrogenese der Lunge. Diese Vermutung wird durch das Co-Kulturrexperiment von LA-4 und MH-S unterstützt. Hier ergab sich in einem einzelnen Experiment der Verdacht, dass MH-S durch die IFNL-Stimulation den M2-Polarisations-Marker E-Cadherin erhöht exprimieren. **Somit könnte IFNL die alternative Aktivierung von Makrophagen auch ohne IL-4 verursachen**. Dieses Ergebnis muss durch weitere Stimulationsexperimente mit MH-S evaluiert werden.

Zusammenfassend zeigen die Stimulationsexperimente mit TGF- β und IL-4 einen entgegengesetzten Effekt von IFNL auf Alveolarmakrophagen und Lungenfibroblasten. Das Zytokin verstärkt einerseits die TGF- β -Expression in bereits M2-polarisierten Makrophagen, andererseits hemmt es die TGF- β -induzierte Genexpression in Lungenfibroblasten. In der Literatur finden sich keine Hinweise für eine mögliche Erklärung dieser heterogenen Wirkungsweise von IFNL. Somit bleibt die genaue Charakterisierung dieses Zusammenhangs Aufgabe zukünftiger Forschungsarbeiten. Dabei könnten insbesondere in vivo-Experimente am Mausmodell Aufschluss darüber geben, ob IFNL einen pro- oder antifibrotischen Effekt auf die IPF-Pathogenese hat.

2. Abstract (English)

2.1. Background

Interferon lambda (IFNL) was first described in 2003 and belongs to the cytokine-family of interferons. In the human body, it works primarily in epithelium-rich organs such as the lung. As part of the humoral immune response its mode of action against numerous pathogens such as bacteria, viruses, or fungi is similar to Type-I-Interferons [1]. Recently, IFNL has often been discussed regarding the pathogenesis of chronic diseases such as asthma [2], [3] and the fibrosis of various organs [4]–[7]. Furthermore, increasing evidence suggests a decisive role of this cytokine in pathological wound healing and various fibrotic processes in the lungs [7]–[9].

A well-known key cytokine of pulmonary fibrogenesis is TGF- β [10], [11]. It stimulates the formation of extracellular matrix and is one of the most important inducers of EMT [12], [13]. Another cytokine that has been suggested to participate in IPF-Fibrogenesis by initiating alternative macrophage activation (or: M2-polarization) is interleukin 4 (IL-4) [8], [9], [14]. M2 macrophages activated by IL-4 secrete anti-inflammatory cytokines such as TGF- β [15].

Potential cofactors in IPF pathogenesis are numerous. Herpes viruses are also controversially discussed in this context [16]–[19]. The IFN γ RKo-mouse-model is particularly suitable for further research of pulmonary fibrosis in the context of viral infection. In this animal model, genetically modified mice are infected with the murine gammaherpesvirus 68 (MHV-68 or MuHV-4) and develop multi-organ fibrosis after weeks to months, which also affects the lungs [20], [21]. The relation of MHV-68 infection of the lungs, the cytokine IFNL and the development of pulmonary fibrosis was examined in this work.

2.2. Methods

2.2.1. Cell-culture

Murine cells (LA-4: lung epithelial cells, MLE-12: lung epithelial cells, CCL-206: lung fibroblasts and MH-S: alveolar macrophages) were thawed and passaged with the appropriate cell medium. Before each experiment cells were counted to achieve a concentration of 50.000 cells/ml medium.

2.2.2. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

The mRNA of harvested and counted cells was isolated according to the protocol of Nucleospin® RNA Plus. Then mRNA-concentration was determined using the Nanodrop™ 2000 spectrophotometer. A suspension with the mRNA concentration of 50ng / μ l ddH₂O was prepared. mRNA was reverse transcribed into cDNA and then prepared for qRT-PCR. The cDNA was mixed with the PowerSYBR® Green Master mix and pipetted into 96-well plates. The 7300 Real Time PCR System from Applied Biosystems quantified the amount of cDNA measuring the fluorescence signal of intercalated PowerSYBR® Green. Ct values determined by the 7300 Real Time PCR System were modified for graphical use by the 2^{- Δ Ct}-method.

2.2.3. FACS-analysis

The fluorescence activated cell sorting (FACS) method was used to detect the IFNL receptor IL28Ra on the surface of LA-4 and MLE-12. Therefore, the cells were stained with a primary- (IgG, goat anti-mouse antibody against IL28Ra) and a secondary antibody (Alexa Fluor 488-FITC rabbit anti-goat IgG). The fluorescence signal was measured using the FACS Calibur flow cytometer from BD Biosciences. The cells treated with only the secondary antibody were used as a negative control. The graphic presentation of the data was performed with FlowJo™ from BD Biosciences.

2.2.4. Plaque-assay

The antiviral effect of IFNL was measured using a method called plaque-assay. MLE-12 and LA-4 were first treated with combined IFNL2 and IFNL3 or with an IFNL carrier solution which served as negative control. After 6 hours, the cells were infected with MHV-68 and incubated for up to 120 hours. In order to release the intracellular virions after the incubation period, the cells were repeatedly frozen and thawed. The virus suspension was then applied to adherent cells of hamster fibroblasts (BHK-21) and incubated for 5 days. During this time, the virus infected the cells, with each virion causing a so-called plaque in the cell lawn. After the incubation, the plaques were counted, converted into plaque-forming units per milliliter (PFU / ml) and used to prepare the virus growth curves.

2.2.5. Statistics

The statistical evaluation and the creation of the graphs was carried out with the program Graphpad Prism 9. Normally distributed groups were tested by ANOVA. If at least one group wasn't normally distributed, the evaluation was carried out using the non-parametric Kruskal-Wallis test. The two-way ANOVA test was used for statistical analysis of the experiments on antiviral effect 7.1.3. Here, the two factors "treatment" and "time" were examined for significance.

Results with a significance level of $p \leq 0.05$ were rated as significant.

2.3. Results & conclusions

2.3.1. Experiments of infection

The infection experiments represent a significant part of this work. Here gene expression analysis of various cell types in vitro and of murine lung tissue after infection with MHV-68 was performed.

One of the most important findings from these experiments was the antiviral effect of IFNL in the lung epithelial cell-type MLE-12. For the first time direct antiviral activity of IFNL against MHV-68 was demonstrated in lung epithelial cells. Future experiments IFNL should investigate the cytokine in the context of MHV-68-infected murine lungs in vivo.

In contrast, virus replication in LA-4 was not affected by stimulation with IFNL. The subsequent FACS analysis showed that LA-4 don't express the IFNL-receptor IL28Ra. In a gene expression analysis, this finding was confirmed by the strikingly low level of expression of the IFNL-receptor.

In addition to the antiviral effect of IFNL in MLE-12, a pronounced increase of IFNL expression was shown after in vivo infection of murine lung tissue. In future experiments the antiviral activity in murine lung tissue should be investigated in vivo.

Post-infectious IFNL and IFNL-receptor expression was also measured in vitro. However, no relevant gene regulation could be found in any of the cell types examined (LA-4, MLE-12 and MH-S).

2.3.2. Experiments of stimulation

In addition to the experiments of infection, this work contains experiments regarding the stimulation of various cell types in vitro. The cytokines interferon lambda (IFNL), transforming growth factor-beta (TGF- β) and interleukin 4 (IL-4) were used as stimulants. TGF- β is one of the key cytokines in IPF pathogenesis through numerous mechanisms such as the conversion of fibroblasts to myofibroblasts and the stimulation of the formation of extracellular matrix [10], [11]. Part of these experiments dealt with the question of whether IFNL influences the typical expression pattern of TGF- β at genetical level.

For this purpose, lung epithelial cells and lung fibroblasts were first stimulated with IFNL and then with TGF- β . After that gene expression was analyzed.

Th2 cytokines such as interleukin 4 (IL-4) and interleukin 13 are among the inducers of M2 polarization [14]. IL-4 represents also an established M2 inducer in vitro [22], [23] and was used in the experiments on macrophage polarization with MH-S. In these experiments, a possible influence of IFNL on the alternative activation and expression of TGF- β should be revealed. Therefore, MH-S were pretreated with IFNL for 4 hours, then stimulated with IL-4 and the expression of arginase-1 as well as TGF- β 1 and TGF- β 2 was analyzed. Here, Arginase-1 served as a positive control gene for the M2 polarization.

In the experiments of stimulation with IFNL no relevant regulation of gene-expression could be measured in LA-4. The reason for this result was the lack of IFNL receptor expression on the surface of these lung epithelial cells. In a first experiment with MLE-12 however, a relevantly increased expression of collagen, e-cadherin and n-cadherin was measured. This expression pattern is a surprising result because the expression of the two cadherins isn't normally equidirectional. E-cadherin is one of the main transmembrane proteins of adherens junctions and is therefore expressed by polarized epithelial cells. In contrast, n-cadherin is expressed by mesenchymal cells which aren't found in epithelial cell clusters [24], [25]. In the course of epithelial-mesenchymal transition (EMT), which occurs in the context of IPF pathogenesis, epithelial cell clusters convert into mesenchymal cells. This process is accompanied by a decrease of e-cadherin expression and an increase of n-cadherin- and collagen expression [26]–[29].

The increased expression of collagen by MLE-12 suggests the formation of extracellular matrix which would be more likely attributed to a mesenchymal cell type. A possible reason for this contradictory expression-pattern could be an intermediate state between an epithelial and a mesenchymal cell-phenotype during EMT. Such gene expression-patterns have already been demonstrated in various cancer cell-types [30]. Before reaching a conclusion, this result should be evaluated by repeating the experiment.

Another result of this work was the **upregulation of e-cadherin in murine lung fibroblasts after IFNL stimulation**. Despite the lack of dose-response dependency, this result is quite surprising. As mentioned above, an increase in the expression of e-cadherin is to be expected mainly from epithelial cells and is observed rarely in lung fibroblasts. An example of elevated e-cadherin expression in fibroblast is the formation of metastases in the course of tumor progression, where these cells undergo MET [31]–[35]. It was thus shown for the first time that IFNL induces increased e-cadherin expression in murine lung fibroblasts. Considering EMT and MET, this result could be the first evidence of a mesenchymal-epithelial transition in lung fibroblasts. Sheng et al. achieved a similar result in 2006. In this study, MET was associated with elevated e-cadherin expression in embryonic mouse fibroblasts [36]. Literature on this result is still rare. Thus, investigation of a possible MET-inducing effect of IFNL in fibroblasts in future experiments is needed.

Furthermore, an **inhibiting effect of IFNL on the expression of TGF- β -induced genes such as fibronectin, collagen and alpha-SMA was shown in murine lung fibroblasts**. Cells produce fibronectin and collagen as part of the production of extracellular matrix (ECM)[37]. Alpha-SMA is increasingly expressed during the conversion of fibroblasts to myofibroblasts and represents a central process of IPF pathogenesis [38], [39]. This could be the first time an inhibitory effect of IFNL on the development of pulmonary fibrosis was shown. Further experiments of this kind are necessary to validate these results. The e-cadherin expression should also be examined in future work with lung fibroblasts to address possible MET-induction by IFNL.

The experiments on IL-4-induced macrophage polarization showed, that **the murine type III-interferon subtype IFNL2 stimulates the expression of TGF- β 1 and TGF- β 2 in alveolar macrophages**. TGF- β is one of the most important cytokines in EMT and lung fibrosis. This result therefore suggests an indirect agonistic effect of IFNL on macrophage-mediated fibrogenesis of the lungs. This assumption is supported by the co-culture experiment of LA-4 and MH-S. In a single experiment, the suspicion arose that IFNL was increasing the expression of the M2-polarization marker e-cadherin in MH-S. Thus, IFNL could cause alternative activation of macrophages even without IL-4. This result must be evaluated by further stimulation experiments with MH-S.

In summary, the experiments of stimulation with TGF- β and IL-4 show an opposite effect of IFNL on alveolar macrophages and lung fibroblasts. On the one hand, the cytokine increases TGF- β expression in M2-polarized macrophages, and, on the other hand, it inhibits TGF- β -induced gene expression in lung fibroblasts. In the literature there is no explanation for this heterogeneous mode of action of IFNL. Thus, the exact characterization of IFNL and its relation to IPF remains the task of future research work. Future in vivo experiments with mice could provide information about whether IFNL has a pro-fibrotic or anti-fibrotic effect on IPF pathogenesis.

3. Einleitung

3.1. Die Idiopathische Lungenfibrose

Die Idiopathische Lungenfibrose (IPF) wurde erstmals im Jahr 1838 von D.J. Corrigan mit dem Begriff „Zirrhose der Lunge“ beschrieben. Mehr als 100 Jahre später wurde von Laurence L. Robbins der Begriff „IPF“ eingeführt, um dem radiologischen Bild der pulmonalen Fibrose ohne erkennbare Ursache einen Namen zu geben [41]. Heute gehört sie zur großen Gruppe der idiopathischen interstitiellen Lungenerkrankungen. Die Bezeichnung „interstitiell“ zielt auf das krankhaft veränderte Lungenparenchym ab. Es können demnach alveoläres Epithel, kapilläres Endothel, perivaskuläres und lymphatisches Gewebe sowie Bindegewebe betroffen sein.

Die IPF ist die häufigste der idiopathischen interstitiellen Lungenerkrankungen. Dabei tragen etwa die Hälfte der interstitiellen Lungenerkrankungen das Attribut idiopathisch, die andere Hälfte tritt sekundär auf. Zu den sekundären Ursachen gehören Infektionen wie Viren oder *Pneumocystis jirovecii*, inhalative Noxen wie anorganische oder organische Stäube, nicht-inhalative Noxen wie Amiodaron, Bleomycin oder ionisierende Strahlung, kreislaufbedingte Lungenschäden und Systemerkrankungen wie Sarkoidose, die Gruppe der Kollagenosen und Vaskulitiden und die rheumatoide Arthritis [42].

In letzter Zeit scheint die Anzahl der IPF-Neuerkrankungen zuzunehmen. In Europa und Nordamerika stieg die Inzidenz in den letzten zwanzig Jahren auf bis zu 20/100.000 pro Jahr und ist damit vergleichbar mit der Inzidenz von Magen-, Leber und Zervixkarzinomen [43].

Die Prognose der IPF ist schlecht. Mit einem Alter über 65 Jahren liegt der Median der Überlebenszeit zwischen drei und vier Jahren [44]. Etwa 10-20% der IPF-Patienten haben pro Jahr eine Exazerbation, die mit einem hohen Risiko einhergeht, an respiratorischem Versagen zu versterben [45]. Therapieoptionen sind nach wie vor limitiert und ermöglichen lediglich eine Verzögerung der Krankheitsprogression.

Im folgenden Abschnitt soll die idiopathische Lungenfibrose in die Gruppe der interstitiellen Lungenerkrankungen eingeordnet werden und im Hinblick auf Pathogenese und die Therapie genauer erklärt werden.

3.1.1. IPF in der Gruppe der interstitiellen Lungenerkrankungen (TABELLE 1)

Aktuell sind sieben Vertreter der idiopathischen interstitiellen Lungenerkrankungen bekannt [46]. Zu den häufigsten zählen die Sarkoidose, die IPF und Lungenfibrosen, die durch Kollagenosen verursacht werden. Zu den häufigsten interstitiellen Lungenerkrankungen (ILE) mit bekannter Ursache zählen jene, die durch Umweltschadstoffe ausgelöst werden. Zusätzlich zur bekannten oder unbekanntem Ursache können die ILE anhand histologischer Kriterien eingeteilt werden. Hierbei wird zwischen einem überwiegend entzündlichen und/oder fibrotischen Geschehen und einer hauptsächlich granulomatösen Entzündungsreaktion unterschieden. Die granulomatösen Formen schränken die Lungenfunktion normalerweise weniger ein als die fibrotischen Formen und können besser therapiert werden. Die fibrotischen Formen führen nach fortschreitender Restriktion unweigerlich zur Ateminsuffizienz und zum Tod. Eine Biopsie-Entnahme mit anschließender Histologie ist in vielen Fällen jedoch überflüssig, weil die Diagnose anhand einer hochauflösenden Computertomographie (HRCT) zuverlässig gestellt werden kann. Typischerweise zeigen sich in der HRCT basal und peripher betont netzartige Verdichtungen des Lungenparenchyms mit Bronchiektasien (Ausweitung der großen Bronchien) und sogenannter Honigwabebildung („honeycombing“). Die Symptomatik beginnt in der Regel schleichend und äußert sich in Form von progredienter Atemnot und

unproduktivem Husten. Durch die chronische Hypoxie zeigen sich im Verlauf Trommelschlegelfinger und Uhrglasnägel [47], [48].

Bezeichnung	Histopathologie	CT-Befund	BAL-Befund	Therapie
Idiopathische pulmonale Fibrose (IPF)	Usual interstitial pneumonitis (UIP)	Honigwabem, subpleurales retikuläres Muster	Neutrophile Alveolitis	Steroide
Nicht-spezifische interstitielle Pneumonie (NSIP)	Fibrosierende oder zelluläre NSIP	Milchglastrübung, retikuläres Muster	50/50 lymphozytäre und neutrophile Alveolitis	Steroide + Immunsuppressiva
Kryptogene organisierende Pneumonie (COP)	Bronchiolitis obliterans (BOP)+organisierte Pneumonie	Alveoläre Konsolidierungen	Mischzellige Alveolitis (CD8 und Neutrophile)	Steroide
Akute interstitielle Pneumonie (AIP)	Diffuser Alveolarschaden	Milchglastrübung, teils Konsolidierungen	Neutrophile Alveolitis	Beatmung, Steroide
Desquamative interstitielle Pneumonie (DIP)	DIP	Milchglastrübung, retikuläres Muster	Erhöhte Anzahl und Pigmentierung der Alveolarmakrophagen	Nikotinkarenz, Steroide
Respiratory-Bronchiolitis-ILD (RB-ILD)	RB-ILD	Fleckförmige Milchglastrübung, z.T. Überblähungen	wie DIP	Wie DIP
Lymphoide interstitielle Pneumonie (LIP)	LIP	Milchglastrübung, retikuläres Muster	Lymphozytäre Alveolitis	Steroide

TABELLE 1: ÜBERSICHT DER IDIOPATHISCHEN INTERSTITIELLEN PNEUMONIEN, ANGEPASST AUS [46].

3.1.2. Pathogenese der IPF (ABBILDUNG 1)

Vermutet wird, dass eine chronische Epithelschädigung durch heterogene Ursachen eine interstitielle Entzündungsreaktion hervorruft. Diese Entzündung führt, im Sinne der gestörten Wundheilung, zum Umbau des Parenchyms in fibrotisches Narbengewebe[49].

Im Detail stimuliert das geschädigte Epithel die Proliferation von Fibroblasten und deren Umwandlung in Myofibroblasten. Diese Myofibroblasten produzieren in hohem Maße Komponenten der extrazellulären Matrix, die sich im Lungenparenchym abgelagern und dessen Funktion behindern [41]. Zudem unterliegen Epithelzellen im Rahmen der **Epithelial-Mesenchymal-Transition (EMT)** einem phänotypischen Wandel. Sie differenzieren sich zu Fibroblasten oder Myofibroblasten und beteiligen sich am fibrotischen Umbau des Lungenparenchyms [26]. Polare Epithelzellen verlieren dabei ihre Zellkontakte die durch Cadherine wie E-Cadherin gebildet werden [27]. Im Rahmen der Transformation zu mobilen, mesenchymalen Zellen werden Proteine wie Vimentin, N-Cadherin und Fibronectin exprimiert, die bei der Bildung von extrazellulärer Matrix beteiligt sind [28], [29]. Auch das profibrotische Zytokin TGF-β ist an der EMT beteiligt [12]. Man geht sogar davon aus, dass TGF-β einer der wichtigsten Induktoren der EMT in vitro und in vivo ist [13]. Im Hinblick auf die IPF-Pathogenese ist TGF-β durch zahlreiche Mechanismen seit mehr als 20 Jahren ein etabliertes Schlüsselzytokin [10], [11].

Die EMT spielt nicht nur im Rahmen fibrotischer Prozesse der Lunge eine wichtige Rolle. Auch im Kontext der Embryonalentwicklung [50] und der Metastasierung von malignen Zellen nimmt die EMT eine bedeutende Funktion ein [51], [52]. Die EMT besitzt ein vergleichsweise wenig erforschtes Gegenmodell, bei dem mesenchymale Zellen einen polaren, epithelialen Phänotyp annehmen. Dieser Prozess wird entsprechend der entgegengesetzten Funktion **Mesenchymale-Epitheliale-Transition (MET)** genannt.

Jüngste Untersuchungen deuten auf eine Pathogenese hin, die sich in drei Phasen aufteilt; Prädisposition, Aktivierung und Progression [41].

Unter **Prädisposition** sind externe und interne Risikofaktoren zu verstehen, die in der Summe eine Erkrankung wahrscheinlicher machen. Unter den internen Risikofaktoren finden sich Genvarianten und das Alter des Patienten. Das Einatmen von Umweltgiften stellt eine Form von externen Risikofaktoren dar. Es sind bereits zahlreiche Genvarianten mit Assoziation zur Entstehung der IPF identifiziert worden. Die MUC5B Promoter-Variante ist mit einer Risikobeteiligung von mindestens 30% eine der wichtigsten und könnte in Zukunft einen Platz in der Früherkennung einnehmen [41]. Die Aspiration von Holzstaub, Metallstaub, Zigarettenrauch, Medikamenten und Viruspartikeln stellen bekannte externe Risikofaktoren dar. Dem Zigarettenrauch wird dabei das höchste Risiko zugeschrieben. Auch Virusinfektionen werden als Ursache der chronischen Gewebeschädigung im Rahmen der IPF-Pathogenese seit mehr als 20 Jahren diskutiert [53]. Im Kontext der chronischen Epithelschädigung stehen Gammaherpesviren wegen ihrer Fähigkeit zur Latenzausbildung besonders im Fokus wissenschaftlicher Arbeiten. Beispielsweise zeigte eine Arbeit von Tang et al., dass 97% der untersuchten Patienten mit IPF mit einem Herpesvirus infiziert waren. Dagegen konnte in nur 36% der Kontrollgruppe Herpesvirus-DNA nachgewiesen werden [16]. Andere Arbeiten zu diesem Thema konnten jedoch keinen Zusammenhang zwischen Herpesvirus-Infektion und Lungenfibrose ausmachen [17], [18]. Die Rolle von Herpesvirusinfektionen bei der IPF-Pathogenese wird nach wie vor kontrovers diskutiert und wird auch in Zukunft im Fokus wissenschaftlicher Arbeiten stehen.

Des Weiteren ist die IPF eine Erkrankung des höheren Alters und tritt selten vor dem 50. Lebensjahr auf. Nach dem fünften Lebensjahrzehnt nimmt die Prävalenz jedes Jahrzehnt um fast 10% zu. Dementsprechend spielt das Alter unter den prädisponierenden Faktoren eine wichtige Rolle.

Die **Aktivierungsphase** beschreibt pathologische Gewebeeränderungen wie epitheliale Telomerverkürzung und Seneszenz sowie die Ansammlung von defekten Mitochondrien und Fehlfunktion des endoplasmatischen Retikulums (ER). Die Verkürzung von Telomeren in alveolären Epithelzellen Typ II (AEC-II, AT2, Pneumozyten Typ 2) kann zu einer Umstrukturierung und Fibrosierung des Lungenparenchyms führen. Vermutlich können die Folgen dieser DNA-Verkürzungen IPF verursachen [19]. Seneszenz ist eine Form der Zellalterung, die im Rahmen der Embryonalentwicklung erwünscht ist, um Gewebe zu erneuern und Strukturen im Rahmen des Wachstums zu verändern. Gleichzeitig kann dieser Umbauprozess auch in pathologischer Form vorliegen und die Organisation und Funktion des Lungenparenchyms stören [54]. Die Zerstörung von Mitochondrien tritt im Rahmen der IPF Pathogenese gehäuft auf und verringert die Funktionalität und die Lebenszeit von AEC-II[55]. Zudem ist bekannt, dass die IPF mit erhöhtem ER-Stress einhergeht, welcher zu einem Defekt in der Proteinfaltung führt. Die Ansammlung fehlgefalteter Proteine im Zytoplasma löst einen Mechanismus aus, der „Unfolded Protein Response“ (UPR) genannt wird. Die UPR beinhaltet zahlreiche Signalwege, deren Ziel es ist, die ER-Funktion wiederherzustellen[56].

Der Übergang in die **Progressionsphase** ist fließend und wird durch den zunehmenden Untergang von funktionellem Lungengewebe gekennzeichnet. Es bilden sich klassische Krankheitsmerkmale wie subpleurale Fibroseherde, subepitheliale Foci proliferierender Fibroblasten und luftgefüllte, honigwabartige Gewebeeränderungen aus. Auch die epitheliale Metaplasie wie die EMT, die verstärkte Invasion hämatopoetischer Zellen und die Bildung von lymphoiden Aggregaten gehören zu den charakteristischen Merkmalen dieses Umbauprozesses[41].

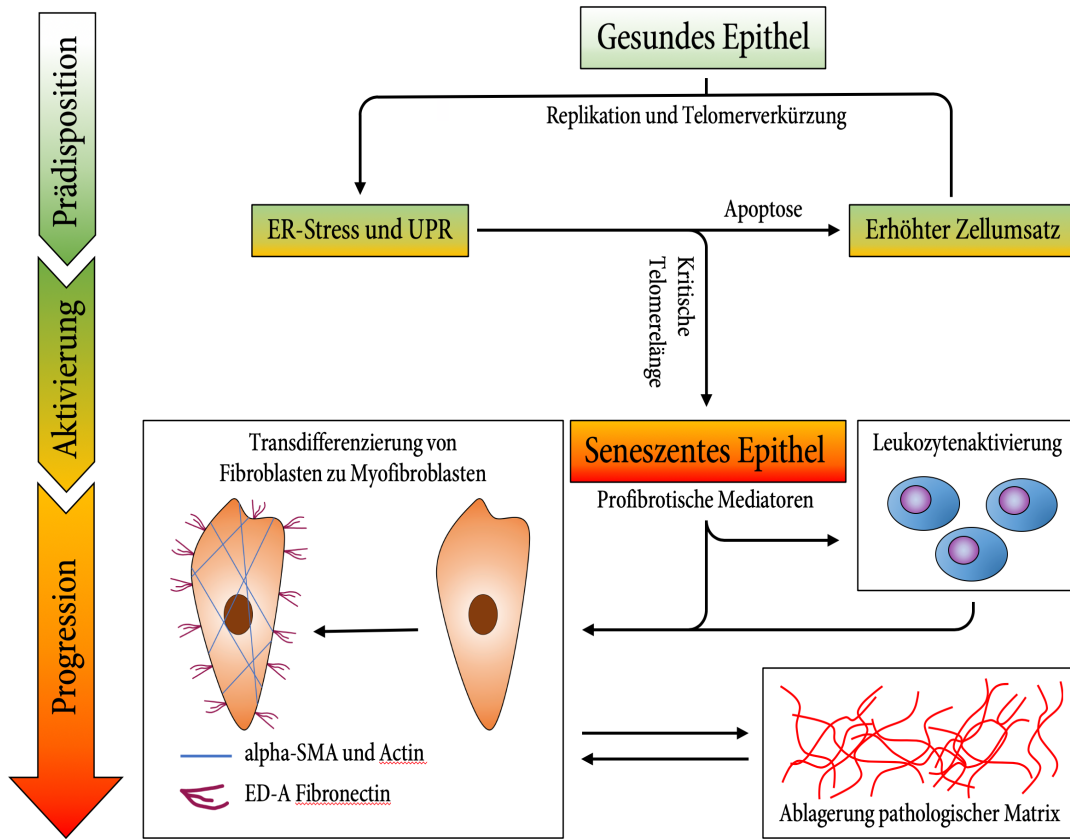


ABBILDUNG 1: BESCHREIBUNG DER IPF-PATHOGENESE

Abhängig von der jeweiligen Prädisposition können Stressoren wie virale Infektionen, Zigarettenrauch, Alterungsprozesse und Hypoxie die Funktion der endoplasmatischen Retikula beeinträchtigen. Die dadurch verursachte UPR wird mit apoptotischem Zelltod, entzündlichen Prozessen, Fibroblastenaktivierung und EMT in Verbindung gebracht. In der Aktivierungsphase folgt die Seneszenz des Epithels auf die kritische Telomerverkürzung und verursacht die Freisetzung profibrotischer Mediatoren wie TGF- β , Wnts, PDGF β . Diese Mediatoren leiten dann entweder direkt oder indirekt durch Leukozyten, die Umwandlung von Fibroblasten zu Myofibroblasten ein [103]. Myofibroblasten produzieren im Gegensatz zu Fibroblasten alpha-SMA, Actin und ED-A Fibronectin. Sie produzieren übermäßig extrazelluläre Matrix (ECM) und besitzen kontraktile Eigenschaften. Die Ablagerung fibrotischer Matrix stimuliert wiederum die Transdifferenzierung von Fibroblasten. Angepasst aus [222].

Durch das zunehmende Verständnis der Erkrankung wird in Zukunft vermutlich nicht mehr der Begriff „IPF“ verwendet, sondern eine Unterteilung in die pathogenetischen und/oder klinischen Subtypen vorgenommen [41].

3.1.2.1. Die Makrophagenpolarisation im Rahmen der IPF-Pathogenese

Makrophagen stellen eine äußerst vielseitige Untergruppe der Leukozyten dar. Im Gegensatz zu der Vermutung, dass Makrophagen größtenteils aus den, im Blut zirkulierenden, Monozyten entstammten, stützen Forschungsergebnisse der letzten Jahre eine andere Hypothese. Scheinbar wandern die meisten gewebspezifischen Makrophagen, schon während der Embryonalentwicklung in

ihr Zielgewebe aus. Jedoch existiert in jedem Gewebe eine Mischung aus embryonalen und adulten Makrophagen, die bei Bedarf aus den, im Blut zirkulierenden, Monozyten ergänzt werden können [14]. Die sogenannte Makrophagenpolarisation ist ein Prozess, durch den Makrophagen durch unterschiedliche, meist lokale, Stimuli ihren Phänotyp und ihre Funktion ändern können. Diese Polarisation bedeutet grundlegende Veränderungen der biologischen Aktivität, der beispielsweise Oberflächenrezeptoren und die Produktion von Zytokinen unterliegen. Dabei werden grob zwei Gruppen unterschieden, die sich aus den sogenannten „M0“-Makrophagen differenzieren können. Die M1-Polarisation (auch: „klassische Aktivierung“) wird typischerweise von Th1-Zytokinen wie Interferon gamma, bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS) oder TNF-alpha induziert. Die Bezeichnung „Th1“ ist eine Beschreibung für verschiedene Untergruppen von CD4+ T-Zellen. Neben Th1-Zellen existieren weitere T-Helferzell-Untergruppen wie die Th2-Zellen. Th2-Zellen induzieren durch Zytokine wie IL-4 und IL-13 unter anderem die M2-Polarisation (auch: „alternative Aktivierung“) [14]. Th2-Zytokine wie IL-13 leiten dabei nicht nur die alternative Makrophagenaktivierung ein, sondern werden auch für die Hemmung von IFNL im Rahmen einer viralen Infektion verantwortlich gemacht [8]. Neben der Hemmung von IFNL spielen Th2-Zytokine eine bedeutende Rolle bei pathologischen Wundheilungs- und Fibroseprozessen, zu denen auch die IPF gehört [9].

M1-Makrophagen produzieren Zytokine wie TNF-alpha und Interleukine wie IL1-alpha oder IL1-beta und sind für die Abwehr von Pathogenen während einer Infektion zuständig. Dabei spielen vor allem das NADPH-System und die Bildung von Sauerstoffradikalen (ROS) eine Rolle.

M2-Makrophagen produzieren anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10, IL-12 und TGF- β und verhindern eine Gewebeschädigung durch M1-Makrophagen. Desweiteren nehmen M2-Makrophagen eine wichtige Funktion in der Phagozytose apoptotischer Zellen und von zerstörtem Gewebe ein. Damit sind sie nicht nur in Heilungs- und Reparaturprozessen involviert, sondern besitzen auch profibrotische Eigenschaften.

Im Rahmen der Gewebefibrose exprimieren M2-Makrophagen Arginase-1, ein Protein, das für die Collagensynthese und den Gewebeumbau essentiell ist [15], [22], [57], [58]. Auch das M2-Zytokin TGF- β nimmt eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Lungenfibrose und der EMT ein [10], [11], [59]. Beispielsweise ist Teil der anti-fibrotischen Wirkung von Pirfenidon die Hemmung der TGF- β Produktion von M2-Makrophagen [60]. Auch bei der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten durch den Wnt/ β -catenin-Signalweg sind M2-Makrophagen von entscheidender Bedeutung [61].

3.1.3. Therapie und Prognose der IPF

Gemeinsam ist den interstitiellen Lungenerkrankungen, dass sie schwer therapierbar sind und eine hohe Mortalität aufweisen. Die mediane Überlebenszeit beträgt näherungsweise 3-5 Jahre, wobei die Lungenfunktion innerhalb der ersten 2 Jahren nach Diagnosestellung bezüglich des Überlebens aussagekräftiger ist als der histologische Subtyp. Nach wie vor existiert keine kausale Therapie der IPF [62], [63].

Zur Therapie der IPF gehören neben symptomatischen Maßnahmen, wie Sauerstoffgabe oder Behandlung eines sogenannten Cor pulmonale im fortgeschrittenen Stadium, auch Rehabilitationsmaßnahmen, wie Physiotherapie, Ergotherapie, Patientenschulung, Raucherentwöhnung und vieles mehr. Glukokortikoide und andere Immunsuppressiva werden mit unterschiedlichem Erfolg verwendet. Thalidomid scheint sich positiv auf den Husten auszuwirken und verbessert so die Atmung [64]. In der EU sind zwei Substanzen zugelassen, die den Krankheitsverlauf der IPF verlangsamen; Pirfenidon und Nintedanib. Der genaue Wirkmechanismus von Pirfenidon bleibt bis heute unklar, jedoch nimmt man an, dass antifibrotische, antientzündliche und antioxidative Prozesse im Mittelpunkt stehen. Wahrscheinlich spielt dabei auch die Hemmung der Kollagensynthese

und der Ausschüttung von TGF- β eine Rolle. Die häufigsten Nebenwirkungen sind Übelkeit, Durchfall und Ausschlag. Sie sind teilweise so stark, dass etwa 11% der Behandelten die Pirfenidon-Therapie abbrechen. Nintedanib ist ein Tyrosin-Kinase-Inhibitor, der in die Proliferation, Migration und Reifung von Lungenfibroblasten eingreift. Es ist verhältnismäßig gut verträglich, wobei etwa 5-10% der Patienten die Therapie nebenwirkungsbedingt abbrechen. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch eine Kombinationstherapie bessere Ergebnisse erzielt werden können, gleichzeitig aber die Nebenwirkungen im Vergleich zur Einzeltherapie nicht signifikant verstärkt werden [65]. Leider können auch diese beiden antifibrotischen Medikamente das Fortschreiten der Lungenfibrose nicht verhindern und die Lungentransplantation stellt die aktuell einzige therapeutische Maßnahme dar [47], [48].

3.2. Interferon-lambda

3.2.1. Die Familie der Interferone

Der Begriff „Interferon“ wurde erstmals 1957 in einer Arbeit von Isaacs und Lindenmann verwendet [66]. Sie gründeten damit die Zytokinfamilie der Interferone [67]. Das Interferon wurde bei der Untersuchung von Chorio-Allantois-Membranen (CAM) von Hühnerembryonen entdeckt. Dabei wurden CAM mit hitze-inaktiviertem Melbourne Influenza A -Virus (iMEL) vorbehandelt und anschließend mit aktivem MEL infiziert. Die Vorbehandlung der CAM mit iMEL hemmte die Proliferation des Virus durch die Freisetzung eines bis dahin unbekanntes „interferierenden“ Zytokins, dem sogenannten Interferon Typ I.

Im Laufe der Jahre ergänzten zahlreiche Forschungsarbeiten das Verständnis über Funktion und Wirkungsweise der Interferone. Im Jahr 1965 wurde das Interferon-Typ-II und im Jahr 2003 das Typ-III-Interferon entdeckt [67].

Name	Synonyme
Typ-I-Interferon	Interferon alpha/IFN- α , Interferon beta/ IFN- β
Typ-II-Interferon	Interferon gamma, IFN- γ
Typ-III Interferon	Interferon lambda, IFNL, IFN- λ

TABELLE 2: ÜBERSICHT ÜBER DIE SYNONYME DER INTERFERON-FAMILIE

3.2.1.1. Typ-I Interferone

Die Funktionen von Typ-I Interferonen sind vielfältig. Sie spielen bei Infektionen durch Parasiten, Pilzen, Viren oder Bakterien genauso eine Rolle wie im Rahmen von Tumor- oder Autoimmunerkrankungen. Als Teil des angeborenen Immunsystems induzieren Typ-I Interferone antivirale Mechanismen in virusinfizierten Zellen. Dabei beeinflussen sie auch benachbarte, nicht-infizierte Zellen. Hinzu kommen modulierende Effekte auf das erworbene Immunsystem. Damit stellen Typ-I Interferone einen essenziellen Bestandteil der antiviralen Antwort des Immunsystems dar. Typ-I Interferone werden wahrscheinlich in allen kernhaltigen Zellen exprimiert [68], wobei periphere dendritische Zellen (pDC) die wichtigsten Produzenten im Rahmen der angeborenen Immunantwort sind [69].

Die Hauptvertreter der Typ-I Interferone sind IFN-alpha und IFN-beta. Im Menschen kodieren für IFN-alpha 13 Gene, für IFN-beta, IFN-eta, IFN-kappa und IFN-omega jeweils nur ein Gen.

Die Induktion von Typ-I Interferon wird über Pattern-Recognition-Receptors (PRR) eingeleitet, welche durch Pathogen-Associated-Molecular-Patterns (PAMPs) stimuliert werden. Dabei spielen RIG-I-Like-Rezeptoren (RLR) im Zytoplasma und Toll-Like-Rezeptoren (TLR) in Endosomen eine zentrale Rolle. Dabei werden PAMPs meist durch RLRs und doppelsträngige RNA (dsRNA) durch

TLRs entdeckt [70]. Über verschiedene Mechanismen wird durch RLR und TLR die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie Nuclear-Factor-kappa-light-chain-enhancer-of-activated-B-cells (NF- κ B) und Interferon-Regulatory-Factor-7 (IRF7) vermittelt und schließlich antivirale Zytokine wie Typ-I Interferone exprimiert.

Typ-I Interferone binden an den heterodimeren Rezeptor IFN- α β R, welcher sich aus IFNAR1 und IFNAR2 zusammensetzt (

ABBILDUNG 2). Die Rezeptor-Untereinheiten sind mit Janus-Aktivierter-Kinase-1 (JAK1) und Tyrosinkinase 2 (TK2) assoziiert. Die Rezeptorbindung von Typ-I Interferon führt über JAK1 und TK2 zur Phosphorylierung des Signal-Transducer-And-Activator-Of-Transcription 1 (STAT1)[71], welcher in Kombination mit STAT2 den IFN-Regulatory-Faktor-9 (IRF9) bindet. Der Komplex aus STAT1, STAT2 und IRF9 wird auch Interferon-stimulated gene factor 3 (ISGF3) genannt.

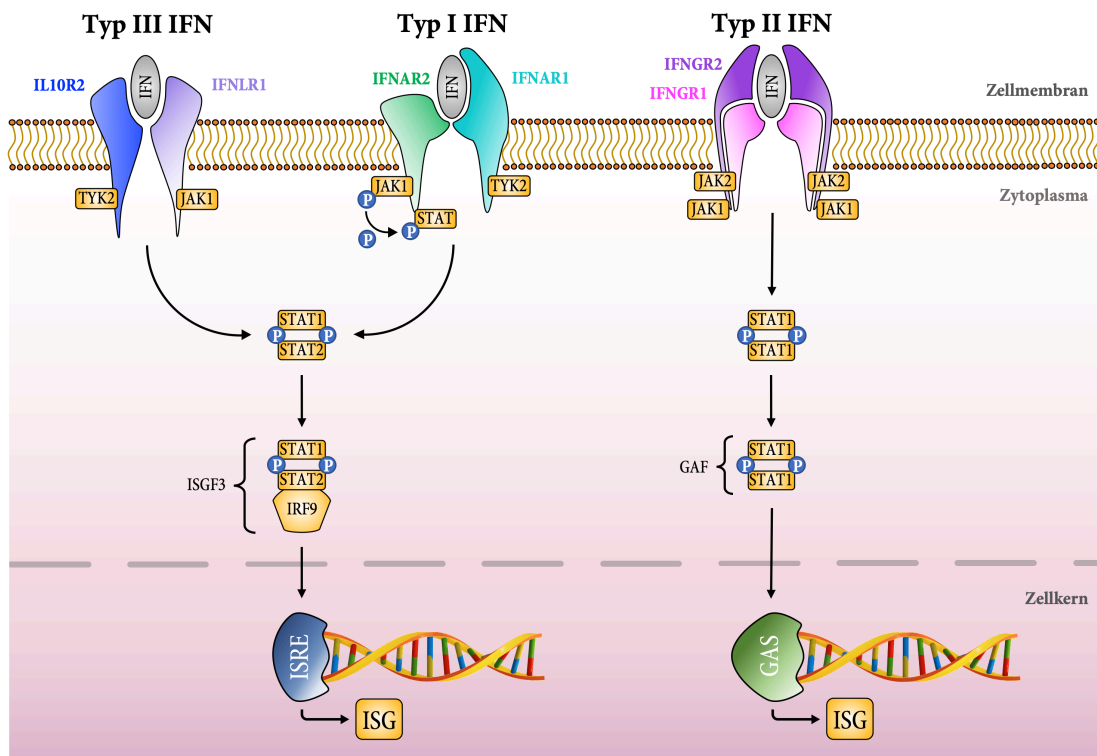


ABBILDUNG 2: TYP-I, TYP-II UND TYP-III-INTERFERON INDUZIERTER REZEPTORAKTIVIERUNG UND DER JAK-STAT-SIGNALWEG

Die Interferon-Subtypen binden an drei unterschiedliche Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Die Bestandteile für die Signaltransduktion stehen auch im Ruhezustand der Zelle zur Verfügung. Das ermöglicht die charakteristisch schnelle Signaltransduktion der Interferone. Typ-I-IFN bindet an einen heterodimeren Rezeptor aus den Untereinheiten IFNAR1 und IFNAR2. Typ-II-IFN bindet an einen dimeren Rezeptor aus zwei Heterodimeren, die sich aus IFNGR1 und IFNGR2 zusammensetzen. Typ-III-IFN bindet an einen heterodimeren Rezeptor, der sich aus IL10R2 und IFNLR1 zusammensetzt. Synonyme der Rezeptoren sind in TABELLE 2 aufgelistet. Die Typ-I und Typ-III Rezeptoraktivierung löst eine Signalkaskade mit einer gemeinsamen Endstrecke aus. An beide Rezeptorkomplexe ist TYK2 und JAK1 gebunden, welche als Folge der extrazellulären IFN-Rezeptoraktivierung phosphoryliert werden. Dies führt wiederum zur Phosphorylierung von STAT1 und STAT2, die zusammen ein Heterodimer bilden. Dieses Heterodimer aktiviert IRF9 und es entsteht ISGF3. Die Rezeptoraktivierung durch Typ-II-Interferone phosphoryliert JAK1 und JAK2, die wiederum STAT1 aktivieren. Zwei phosphorylierte STAT1-Moleküle bilden ein Homodimer, auch GAF genannt. ISGF3 und GAF treten in den Zellkern ein, aktivieren jeweils IFN-stimulated-response-elements oder GAS und induzieren die Transkription von Interferon-stimulierten Genen. Adaptiert aus [1], [72].

ISGF3 aktiviert intranukleär das Interferon-Sensitive-Response-Element (ISRE), einem Promoter vieler Interferon-Stimulated-Genes (ISG) wie ISG15, Interferon-Regulatory-Factor-7 (IRF7) oder IFN-Induced-Proteins-With-Tetratricopeptide-Repeats (IFIT). Klinische Anwendung finden die Typ-I Interferone in der Therapie von Hepatitiden (IFN-alpha) und Multipler Sklerose (IFN-beta) [73].

3.2.1.2. Typ-II Interferon

Einzigster Vertreter der Typ-II Interferon Familie ist das Interferon-gamma. Neben antiviralen, tumorhemmenden und immunmodulatorischen Funktionen ist die JAK-vermittelte Aktivierung von Makrophagen eine der Hauptaufgaben dieses Zytokins. Im Gegensatz zu Typ-I Interferon kann die Produktion von Typ-II Interferon im Rahmen einer Virusinfektion nicht direkt von der virusinfizierten Zelle eingeleitet werden. Das Zytokin wird hauptsächlich von aktivierten Immunzellen wie natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), CD8-positiven T-Lymphozyten und Th1-Zellen sezerniert. Virusinfizierte Zellen werden durch den Kontakt mit Typ-II Interferon zur Expression verschiedener ISGs wie Viperin (auch: RSAD2), MHC-1-Proteinen und verschiedenen Proteasom-Untereinheiten angeregt. Diese Proteine blockieren die virale Replikation und bereiten die infizierte Zelle für deren Zerstörung durch zytotoxischen T-Zellen vor [74].

Der Typ-II Interferon-Rezeptor wird in allen kernhaltigen Zellen als Tetramer exprimiert. Es besteht aus jeweils zwei Rezeptoruntereinheiten IFNGR1 und IFNGR2 [75]. Kommt es zur Rezeptoraktivierung, phosphorylieren die Tyrosinkinasen JAK1 und JAK2 zwei STAT1-Komplexe, die sich als Homodimer, genannt Gamma-Interferon-Activation-Factor (GAF), zusammenlagern. GAF löst durch die Aktivierung von Gamma-Interferon-Activation-Site (GAS) die Expression verschiedener ISG aus (

ABBILDUNG 2).

Der Typ-II Interferon-Rezeptor ist Teil der sogenannten Typ-II-Zytokin-Rezeptoren, zu der auch der Interleukin-10-Rezeptor (IL-10R) und der Typ-I Interferon-Rezeptor gehört [76].

In der klinischen Diagnostik wird Typ-II Interferon für den indirekten Nachweis einer Tuberkulose-Infektion verwendet (QuantIFERON®-Tb-Test). Noch gibt es keine therapeutische Anwendung von Typ-II Interferon. Zurzeit werden mögliche Therapieansätze in Zusammenhang mit Osteoporose und Autoimmunerkrankungen untersucht [77].

3.2.1.3. Typ-III Interferone

Typ-III-Interferone agieren vorwiegend in der ersten Reihe des Pathogenkontakts, dem Epithel. Dabei üben sie sowohl direkten Schutz gegen Pathogene als auch indirekte, immunmodulatorische Mechanismen aus und sind für die Aufrechterhaltung einer intakten Barriere zuständig. Die Typ-III Interferone, auch IFNLs genannt, ähneln in vielen Aspekten den Typ-I Interferonen. Die Funktion beider Interferonfamilien überschneidet sich größtenteils, jedoch werden Typ-I Interferone nach einer Infektion schneller freigesetzt und resorbiert. Die IFNL-Expression findet zeitlich verzögert statt und wird länger aufrechterhalten. Daneben unterscheidet sich auch das Profil der ISGs, die durch die beiden IFN-Familien induziert werden. Über die Jahre kristallisierte sich heraus, dass es sowohl Interferon-Subtyp-spezifische ISGs gibt, als auch ISGs existieren, die von beiden Interferonfamilien induziert werden. IRF1 ist beispielweise ein Typ-I-Interferon spezifisches ISG, IFIT1 und USP18 sind dagegen unspezifisch [70]. Strukturell ähneln die IFNLs der IL-10 Zytokinfamilie.

Für IFNL kodieren im Menschen vier (**IFNL1** bzw. IL-29, **IFNL2** bzw. IL-28A, **IFNL3** bzw. IL-28B und **IFNL4**) und in der Maus drei Gene, denn im murinen Genom fehlt das entsprechende Gen für IFNL4 [78]. In der Maus sind davon allerdings nur die strukturell sehr ähnlichen IFNL2 und IFNL3 funktional [79], [80] Im Menschen wird neben IFNL2 und IFNL3 auch IFNL1 exprimiert. Das Zytokin IFNL4 ist

trotz des existenten Gens im menschlichen Organismus nicht vorzufinden, weswegen man vermutet, dass die Expression von IFNL4 wahrscheinlich auf mRNA- oder Proteinebene unterdrückt wird [81]. Von der Stimulation von PRR bis hin zur Aktivierung von NF- κ B und IRFs überschneidet sich der Induktionsmechanismus der Typ-I- und Typ-III Interferone größtenteils. Der sogenannte „DNA-Sensor“ Ku70 spielt allerdings nur bei der Induktion von Typ-III Interferonen eine Rolle [9]. Der IFNL-Rezeptor ist ein Heterodimer aus den Untereinheiten IFNLR1 (auch: IL-28Ra) und IL-10R2 (auch: IFNLR2), an den auch IL-10 Zytokine binden können (

ABBILDUNG 2). Während IL-10R2 auf den meisten menschlichen und murinen Zellen zu finden ist, beschränkt sich die Expression von IFNLR1 auf Epithelzellen in der Lunge und der Leber, myeloische Zellen, Neurone, Keratinozyten und einige Immunzellen [82]. Diese Limitierung könnte ein Hinweis auf die spezielle Funktion von IFNL in epithelzellreichen Organen sein. Trotz der Unterschiede bezüglich der Rezeptorkonfiguration überschneiden sich die nachfolgenden Signalwege größtenteils, führen zur Expression von ISGs und zur Verstärkung der IFN-Produktion. Diese autogene Verstärkung wird auch „positives Feedback“ genannt.

Interessanterweise ist die IFNL-assoziierte Entzündungsreaktion deutlich schwächer als jene der Typ-I Interferone. Früheren Studien zeigten, dass IFNL im Rahmen einer respiratorischen Influenza-A-Virus-Infektion (IAV) eine vergleichbare antivirale Wirkung wie Typ-I Interferon hat, jedoch deutlich geringere inflammatorische Nebenwirkungen zeigt [83], [84]. INFL könnte somit als therapeutische Alternative zu IFN-alpha oder IFN-beta in Frage kommen [79].

Wie oben angedeutet, spielt die antivirale Funktion von IFNL vor allem in epithelzellreichen Organen eine Rolle [85]. Der Respirationstrakt ist beim Pathogenkontakt von zentraler Bedeutung und gehört folglich zu einem wichtigsten Organsystem für die Wirkung von IFNL. Dabei ist zu beachten, dass IFNL seine Wirkung sowohl im oberen als auch im unteren Respirationstrakt entfaltet. Im Gegensatz dazu sind Typ-I-Interferone meist auf die unteren Atemwege beschränkt [1], [70], [86], [87]. In den oberen Atemwegen sind erstaunlicherweise auch Keime der normalen Hautflora wie Staphylococcus Epidermidis dazu in der Lage eine IFNL-Expression in Mukosazellen zu induzieren. Erste Forschungsergebnisse liefern Hinweise darauf, dass S. Epidermidis durch die Induktion von IFNL die Ausbreitung von Influenzaviren auf die unteren Atemwege verhindern kann [88].

In der Lunge sezernieren dendritische Zellen und Epithelzellen nach IAV-Infektion IFNL in deutlich höheren Mengen als Typ-I Interferone [89]. Auch bei Infektion der Atemwege mit Rhinoviren [90], dem Influenza-B-Virus (IBV), dem Respiratory-Syncytial-Virus (RSV), dem Human-Metapneumovirus, Coronaviren und Pilzen [91] spielt IFNL eine wichtige Rolle [86]. Eine weitere interessante Erkenntnis der letzten Jahre ist, dass bei dauerhafter IFNL-Stimulation von Lungenepithelzellen deren Barrierefunktion verloren geht und bakterielle Infektionen leichter auftreten. Eine solche Situation kann in der Lunge beispielsweise während des sogenannten „Zytokinsturms“ im Rahmen einer COVID-19 Erkrankung auftreten, wobei hier vermutlich eher die Typ-I-Interferone eine Rolle spielen [92]. Andererseits bietet IFNL in dosierter Anwendung bei COVID-19-Patienten möglicherweise eine vielversprechende Therapieoption, um einen schweren Verlauf zu verhindern [93]. Hier werden zukünftige Arbeiten Aufschluss über die Funktion und über mögliche Therapieoptionen von IFNL im Kontext einer COVID-19-Infektion geben.

Bei Atemwegsinfektionen generell könnten auch Makrophagen eine zentrale Funktion in der IFNL-vermittelten Immunantwort einnehmen. Zhao et al. zeigte im Jahr 2020 die antivirale Wirkung von IFNL gegen das Porcine-Reproductive-and-Respiratory-Syndrome Virus (PRRSV) in primären porzinen Alveolarmakrophagen [94]. Read et al. zeigte im Jahr 2019 die IFNL-induzierte Immunantwort von Makrophagen aus menschlichem Blut und Lebergewebe. Durch Pathogenstimulation wird IFNL in Epithelzellen oder Immunzellen produziert und aktiviert ISGs in Makrophagen. Diese können entweder direkt oder indirekt auf das Pathogen reagieren. Die direkte Immunantwort der Makrophagen beinhaltet unter anderem die Produktion von inflammatorischen Zytokinen oder die Phagozytose. Im Rahmen der indirekten Immunantwort fungieren Makrophagen

als Bindeglied zwischen IFNL-produzierenden Zellen und Lymphozyten. Diese exprimieren den IFNL-Rezeptor nicht und sind daher auf die Vermittlerfunktion der Makrophagen angewiesen [95].

Des Weiteren nimmt IFNL bei Asthma [2], [3] und bei der Fibrose verschiedener Organe, wie der Leber [4], [5], der Niere und der Lunge [6], [7], eine zentrale Funktion ein.

Im Kontext der Leberfibrose konnte IFNL als wichtiger Faktor für die Entzündung und Fibrose der Leber identifiziert werden. Dabei wurden sowohl virale als auch non-virale Hepatitiden untersucht [6]. Beispielsweise zeigte Eslam et al., dass ein IFNL-4 Polymorphismus einen starken Zusammenhang mit der Leberfibrose aufweist. Dies betraf Patienten mit Leberzirrhose einer viralen, aber auch nicht-viralen Genese [96]. Der Begriff Polymorphismus bezeichnet hier sogenannte Single-Nucleotide-Polymorphisms (SNPs), die für die Gene von IFNL und für den IFNL-Rezeptor bekannt sind. Diese SNPs können sich bedeutend auf die Wirkungsweise des Zytokins auswirken. Beispielsweise kann der Verlauf infektiöser Erkrankungen davon beeinflusst werden [97]. Zudem wird auch eine Rolle bei der Fibroseentstehung verschiedener Organsysteme diskutiert [7], [96].

Des Weiteren wurde IFNL in den letzten Jahren zunehmend mit der Nierenfibrose im Rahmen einer Lupusnephritis in Verbindung gebracht. Zickert et al. entdeckte im Jahr 2016 einen Zusammenhang zwischen der IFNL-3-Serumkonzentration und dem Schweregrad des histopathologischen Nierenbefundes. Je höher der IFNL-3-Spiegel war, desto stärker waren die Nieren von der Erkrankung betroffen [98]. Diese Ergebnisse konnten durch andere Forschungsarbeiten bestätigt werden [99], [100].

Auch im Kontext der Lungenfibrose wird IFNL als wichtiger Faktor für die Pathogenese diskutiert.

Moriwaki et al. zeigte im Jahr 2010, dass IFNL durch das Th2-Zytokin IL-13 im Rahmen einer Asthmaerkrankung gehemmt wird [8]. Th2-Zytokine wie IL-13 spielen nicht nur bei Asthma eine zentrale Rolle. Sie sind auch bei pathologischen Wundheilungs- und Fibroseprozessen wie der IPF und bei der alternativen Makrophagenaktivierung wichtig [9]. Dieser Zusammenhang könnte ein Hinweis auf eine Funktion von IFNL im Rahmen von fibrotischen Prozessen in der Lunge sein.

Fast ein Jahrzehnt später untersuchte Metwally et al. im Jahr 2019 Patienten, die an systemischer Sklerose erkrankt waren. Dabei wurden erhöhte Serumspiegel von IFNL3 bei Patienten gemessen, die im Rahmen ihrer Grunderkrankung eine Lungenfibrose entwickelten. Zudem ergab sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten des IFNL-3 Polymorphismus rs12979860 und der Lungenfibrose bei diesen Patienten. Interessanterweise hatte diese Genvariante jedoch keine Auswirkung auf den Schweregrad der kutanen Manifestation der systemischen Sklerose [7].

Die Liste der Erkrankungen bei denen IFNL eine therapeutische Relevanz haben könnte ist lang. Neben der bereits erwähnten COVID-19-Erkrankung gehört dazu auch die Behandlung der chronischen Hepatitis B. Im Jahr 2017 untersuchte eine Arbeitsgruppe um Sandra Phillips den Effekt von IFNL im Rahmen der Therapie von Patienten mit chronischer Hepatitis B. Mithilfe von pegyliertem IFNL in Kombination mit dem virostatischen Nukleosidanalogon Entecavir konnte eine deutliche Reduktion der Viruslast und des HBV-Antigens im Vergleich zur Monotherapie mit Entecavir beobachtet werden. Pegylierung bedeutet kovalente Bindung mit Polyethylenglycol und hat eine Reihe von positiven Effekten auf die Pharmakokinetik einer biologischen Substanz. Dazu gehört beispielsweise die verbesserte Löslichkeit und die Stabilität des pegylierten Moleküls im Organismus [101], sodass dieses Verfahren bei vielen Biopharmaka zur Anwendung kommt. Beispiele sind unter anderem die Pegylierung von monoklonalen Antikörpern wie Certolizumab, von rekombinanten Gerinnungsfaktoren oder dem rekombinanten Colony-Stimulating-Factor Filgrastim.

Zusammenfassend zeigte die Arbeit von Phillips et al. die ausgeprägte antivirale Wirksamkeit und den Nutzen der Integration von IFNL in die Therapie der chronischen Hepatitis B [102].

In der Behandlung der chronischen Hepatitis C gehört Interferon-alpha in Kombination mit Ribavirin seit Jahren zum Therapieregime. Allerdings wurde das Interferon aufgrund der zahlreichen

Nebenwirkungen und der Entwicklung moderner Virostatika als Erstlinientherapie zunehmend abgelöst und spielt heutzutage nur noch als Alternative bei bestimmten Genotypen des Virus und bei Therapieversagen der Virostatikatherapie eine Rolle [103]. Trotzdem könnte Interferon-alpha als Teil der Reservetherapie in Zukunft von IFNL abgelöst werden. In klinischen Studien zeigte pegyliertes IFNL1 ein schwächer ausgeprägtes Nebenwirkungsprofil sowie eine länger anhaltende antivirale Wirkung [104]–[106] als das etablierte pegylierte Interferon-alpha. Vor allem IFNL3 scheint hier aufgrund der stärkeren Wirksamkeit in Frage zu kommen, ist aber in der Produktion deutlich aufwendiger als das bisher in den Studien verwendete IFNL1. Zukünftige Forschungsarbeiten werden Aufschluss über die Relevanz von IFNL als Teil einer Alternativtherapie bei chronischer Hepatitis B geben.

Im Hinblick auf die Behandlung von hepatozellulären Karzinomen (HCC) könnte IFNL ebenfalls in Frage kommen. In einem Hepatom-Mausmodell für HCC konnte gezeigt werden, dass IFNL in Kombination mit Interferon-alpha eine starke antitumoröse Wirkung besitzt. Dabei zeigten beide Interferone in Einzelanwendung ähnliche starke Effekte auf das Tumorwachstum [107]. Interessanterweise konnte aber nur die Kombinationstherapie von IFNL und Interferon-alpha den Lebertumor komplett eliminieren [108]. In Anbetracht der hohen Letalität fortgeschrittener hepatozellulärer Karzinome könnte dieses Ergebnis zukunftsweisend für die Applikation von Interferon-lambda als Adjuvant für die aktuellen Therapieleitlinien sein.

Rezeptor	Untereinheiten	Abkürzung der Untereinheiten
Typ-I-IFN-Rezeptor (auch: IFN- $\alpha\beta$ R)	Interferon-alpha-Rezeptor-1, Interferon-alpha-Rezeptor-2	IFNAR1 und IFNAR2
Typ-II-IFN-Rezeptor	Interferon-gamma-Rezeptor-1, Interferon-gamma-Rezeptor-2	IFNGR1 und IFNGR2
Typ-III-IFN-Rezeptor	Interleukin-10-Rezeptor-2, Interferon-lambda-Rezeptor-1	IFNLR1 und IFNLR2 (auch: IL-28Ra und IL10R2)

TABELLE 3: ÜBERSICHT ÜBER DIE INTERFERON-REZEPTOREN, DEREN UNTEREINHEITEN UND ABKÜRZUNGEN

3.2.1.4. Die Gruppe der Interferon-Stimulated-Genes

Die Interferon-Stimulated-Genes (ISG) bilden einen wichtigen Teil der antiviralen Expressionsmuster, die durch extrazelluläres IFN in einer Zelle ausgelöst werden. Die Funktionen dieser heterogenen Proteine sind vielfältig, im Mittelpunkt steht aber der Eingriff in den viralen Infektionszyklus (**ABBILDUNG 3**). Im Folgenden werden vor allem ISGs beschrieben, die für diese Arbeit von Relevanz sind.

ISG15 gehört zu den ISG mit hohem Expressionsniveau. Es ist ein ubiquitin-ähnliches Protein und kann kovalent an Zielproteine gebunden werden. Diese Bindung wird als „ISGylation“ bezeichnet und ähnelt dem Bindungsmechanismus des Ubiquitins [72].

USP18 ist vermutlich das ISG mit dem stärksten Einfluss auf die Typ-I Interferon-Desensitivierung [72]. Im Detail bedeutet Desensitivierung, dass Typ-I und Typ-III Interferone die USP18-induzierte Hemmung der Typ-I Interferon-Rezeptorbindung verursachen. Diesen Mechanismus nennt man auch negatives Feedback [109]. Zudem greift USP18 hemmend in den JAK-STAT-Signalweg ein und hebt die ISGylation durch ISG15 auf [72].

IFI44 wird hauptsächlich durch Typ-I Interferone und durch Infektion verschiedener Viren induziert. Eine Besonderheit von IFI44 ist, dass es scheinbar eine hemmende Wirkung auf die IFN-vermittelte Zellantwort auf eine Virusinfektion hat [110].

RSAD2 oder **Viperin** kann auf zwei Signalwegen induziert werden. Durch den oben genannten JAK-STAT-Signalweg oder direkt über IRF1/3. Dadurch behindert es die virale Replikation und den Austritt

des Virus aus der Zelle. Im Rahmen einer CMV-Infektion kann Viperin direkt durch das Virus induziert werden und wirkt in diesem Fall zugunsten des Virus.

IFIT1 bildet mit weiteren Proteinen der IFIT-Familie einen Komplex, der an die PPP-RNA von Viren bindet und, vermutlich durch die Entfernung von viralen Nukleinsäuren, die virale Vermehrung behindert [111].

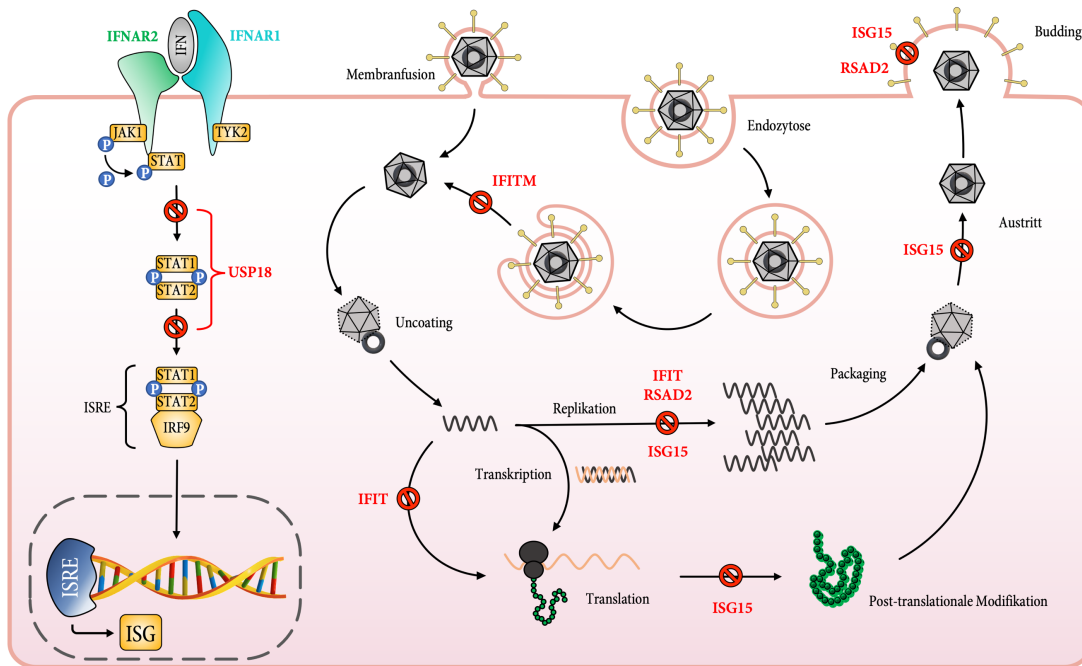


ABBILDUNG 3: SCHEMATISCHE ÜBERSICHT ÜBER DIE ANTIVIRALE WIRKUNG EINIGER ISGS (ROT).

Die Produkte Interferon-stimulierter Gene greifen an vielen verschiedenen Stellen des viralen Infektionszyklus ein. Das IFN-induzierte Transmembranprotein (IFITM) behindert die Membranfusion verschiedener Viren und somit deren Eintritt in die Zelle. Die Ubiquitin Spezifische Peptidase 18 (USP18) hemmt den Jak-Stat-Signalweg und löst als ISG15-Protease die ISGylation auf. IFIT-Proteine greifen inhibierend in die Translation ein und scheinen virale RNA zu zerstören. ISG15 greift in unterschiedliche virale Vermehrungsmechanismen wie der Translation, der Replikation und den Virusaustritt ein. RSAD2 inhibiert die virale Replikation und das Virus-Budding. Das „Budding“ beschreibt die Übernahme eines Teils der Wirtszellmembran durch behüllte Viren während des Austritts aus der Wirtszelle [72].

3.3. MHV-68

3.3.1. Die Familie der Herpesviridae

In der Natur sind die Herpesviridae mit mehr als 200 Mitgliedern vertreten. Humanpathogen sind nach aktuellem Stand jedoch nur acht. Interessanterweise ist fast 100% der erwachsenen Bevölkerung mit mindestens einem dieser Viren infiziert [112].

Gemeinsamkeiten sind ein vergleichsweise großes Repertoire an Proteinen für den Infektionszyklus, die Zerstörung der Wirtszelle als Folge der Virusproduktion (lytische Replikation) und die Fähigkeit, alternativ zur lytischen Infektion in ein sogenanntes Latenzstadium einzutreten. Die Produktion lytischer Proteine wird im Latenzstadium inhibiert und die gesamte Genexpression auf ein Minimum reduziert [113]. So verbleibt das Virus lebenslang in der Wirtszelle. Unter bestimmten Einflüssen, wie Stress, UV-Strahlung, Menstruation, Nanopartikeln [114] oder Immunsuppression [113] geht das Virus in die Produktion von Virionen und die Zerstörung der Wirtszellen über [73]. Die Symptomatik dieser Reaktivierung unterscheidet sich je nach Virusspezies und Wirtszelle. VZV (Varizella Zoster

Virus) ist für den Mechanismus der Latenz und Reaktivierung ein anschauliches Beispiel. Die Primärinfektion von VZV äußert sich in den meisten Fällen als stammbetontes Exanthem mit Vesikeln, Papeln und Krusten. Dieses Exanthem wird wegen seiner Vielfalt an Effloreszenzen auch als Heubner'sche Sternenkarte bezeichnet und geht meist mit allgemeiner Erkältungssymptomatik einher. Die sogenannten Windpocken heilen in der Regel komplikationslos ab. Das Virus verbleibt jedoch lebenslang in den in den Spinal- und Hirnnervenganglien und kann, beispielsweise im Rahmen einer passageren Immunsuppression, reaktiviert werden. Die bei Reaktivierung auftretende Symptomatik orientiert sich strikt am Verlauf der betroffenen Nervenendigungen. Beim Befall der Spinalganglien kommt es zu Dermatom-bezogener Bläschenbildung. Bei Hirnnervenbefall können unter anderem Augen und Ohren betroffen sein [115], [116]

3.3.2. Klassifikation

Seit 1971 führten verschiedene Herangehensweisen zur Einteilung der Herpesviridae zunächst zu einer Klassifikation nach biologischen Kriterien. Im Jahr 1981 wurden von Roizman et al. die drei großen Familien der Alphaherpesvirinae, Betaherpesvirinae und Gammaherpesvirinae definiert. Im Zuge der Entdeckung weiterer Herpesvirus-Spezies wurden teils neue Subfamilien etabliert, teils der bestehende Katalog um nicht-klassifizierbare Spezies ergänzt, wobei sich die Einteilung nach Roizman nach wie vor hält [117], [118].

3.3.2.1. Alphaherpesvirinae

Alphaherpesviren sind durch einen kurzen Reproduktionszyklus, effiziente Zerstörung von Wirtszellen, schnelles Wachstum in Kultur und die Fähigkeit in die Latenz überzugehen gekennzeichnet. Des Weiteren sind sie nicht auf eine Wirtsspezies begrenzt, sondern infizieren neben Menschen auch Vögel und Reptilien. Humanpathogene Alphaherpesviren sind HSV-1, HSV-2 und VZV. Wirtszellen sind vor allem Neuronen sensorischer Ganglien, aber auch Epithelzellen von Haut und Schleimhaut [118].

3.3.2.2. Betaherpesvirinae

Betaherpesviren haben einen verhältnismäßig langen Reproduktionszyklus von über 7 Tagen. Die Wirtsspezies ist fast ausschließlich auf Säugetiere beschränkt [119]. Dabei nehmen infizierte Zellen oft stark in ihrer Größe zu. Betaherpesviren infizieren vor allem sekretorische Drüsen, Lymphozyten und Zellen der Niere, wobei sie dort in die Latenz übergehen können. Vertreter dieser Untergruppe sind das Zytomegalievirus (CMV), das Muromegalovirus (MCMV), das Proboscivirus (EEHV-1) und das Roseolovirus (HHV-6)[73].

3.3.2.3. Gammaherpesvirinae

Gammaherpesviren infizieren ausschließlich Säugetiere und haben damit unter den Herpesviridae das engste Wirtsspektrum. Sie sind lymphotrop, infizieren normalerweise aber entweder nur B-Zellen oder nur T-Zellen. Gammaherpesviren können auch Zellen anderer Gewebetypen wie Epithel, Endothel oder glatter Muskulatur infizieren und sind vor allem in lymphatischen Zellen dazu in der Lage in das Latenzstadium überzugehen [120].

Sie sind als einzige Herpesviren onkogen, das heißt sie beeinflussen im Rahmen der malignen Transformation eine Vielzahl zellulärer Kontrollmechanismen, die bei einer Fehlfunktion zu Krebs führen können. Die humanpathogenen Vertreter dieser Gruppe sind das Epstein-Barr-Virus (EBV) und das Kaposi's-Sarkoma-Associated-Herpesvirus (KSHV). Sie sind für maligne

Tumorerkrankungen wie Lymphome, lymphoproliferative Erkrankungen, das Kaposi-Sarkom und weitere nicht-lymphatische Tumorerkrankungen verantwortlich [121]. Das EBV löst außerdem die infektiöse Mononukleose (auch: Pfeiffer'sches Drüsenfieber) aus [73]. Gammaherpesviren werden des Weiteren in Zusammenhang mit der Pathogenese chronischer Erkrankungen wie der idiopathischen Lungenfibrose [122], COPD [123], Atherosklerose [124], Multipler Sklerose und Morbus Alzheimer [125], [126] gebracht.

3.3.3. Morphologie der Herpesviridae (ABBILDUNG 4)

Das Virion ist kugelförmig und besteht aus vier Hauptbestandteilen; dem Kern, dem Kapsid, dem Tegument und der Hülle. Der Durchmesser wird hauptsächlich von der Dicke des Teguments bestimmt und variiert je nach Spezies zwischen 120-260nm. Der Kern enthält die ringförmige, nicht-kondensierte Doppelstrang-DNA, die speziesabhängig bis zu 100 Proteine kodiert.

Das ikosaedrische Kapsid besteht aus 161 Capsomeren, deren Grundstruktur von nur vier Proteinen gebildet wird. Das Kapsid hat einen Durchmesser von etwa 100nm.

Die Proteinstruktur zwischen Kapsid und Hülle wird als Tegument (lat. für „Bedeckung“, „Hülle“) bezeichnet. Es wird von bis zu 20 viralen Proteinen gebildet und hat vermutlich eine geordnete, teils asymmetrische Struktur. Diese Proteine sorgen unter anderem dafür, dass die zellulären Prozesse an die Bedürfnisse des Virus angepasst werden und optimieren so dessen Reproduktion.

Die Virushülle wird aus einem modifizierten Bruchstück der Wirtszellmembran hergestellt, ist klassischerweise dreischichtig aufgebaut und enthält virale Glykoproteine. Ein Virion kann dabei über 1000 Glykoproteine tragen.

Der Vorgang, durch den das Nukleokapsid die Hülle erhält, lässt sich in zwei Phasen aufteilen. Diese werden auch als „primary envelopment“ und „secondary envelopment“ bezeichnet [127]. Das primary Envelopment findet beim Austritt des Virions aus dem Zellkern ins Zytoplasma statt (ABBILDUNG 4). Dafür bindet das Nukleokapsid zunächst an die innere Kernmembran und bildet dadurch ein behülltes Partikel im Perinuklearraum [128]. Danach verbindet sich das, durch die innere Kernmembran behüllte, Nukleokapsid mit der äußeren Kernhülle und wird unbehüllt ins Zytoplasma freigegeben [129]. Vor dem Secondary Envelopment wird das Nukleokapsid nach dem Austritt aus dem Zellkern zunächst mit den Tegument-Proteinen ausgestattet. Die zweite Hülle erhält das Virion wahrscheinlich durch das Trans-Golgi-Netzwerk und durch das Early Endosome [130]–[132]. Das behüllte Virion wandert dann in einem Vesikel durch das Zytoplasma zur Zellmembran und wird in den Extrazellulärraum freigesetzt [127].

Zu beachten ist, dass die Zusammensetzung dieser Lipidmembran zwischen den Herpesvirusspezies stark variieren kann [73]. Außerdem ist der genaue molekulare Mechanismus, der zum Aufbau der Hülle führt, bislang nicht vollends bekannt [133].

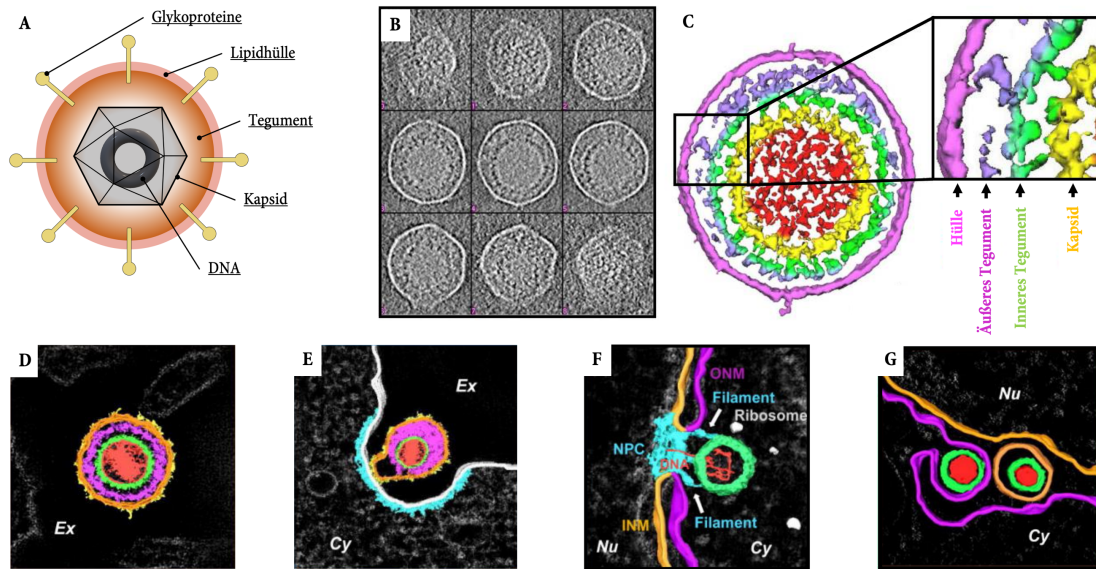


ABBILDUNG 4: DARSTELLUNG EINES HERPES-VIRIONS AM BEISPIEL VON MHV- 68.

A Schematische Darstellung eines Herpes-Virions und dessen wichtigste Bestandteile. **B** Neun Schnittbilder einer Cryo-Elektronentomographie-Aufnahme (Cryo-ET) eines MHV-68-Virions. **C** 3D-Rekonstruktion eines MHV-68-Virions mittels Cryo-Elektronen-Tomographie aus Cryo-Elektronenmikroskopie-Einzelschnitten. Die verschiedenen Farben der Einzelschichten wurden gemäß des Abstands der Molekülformationen vom Zentrum des Virions vergeben. Es zeigt die molekulare Interaktion der einzelnen Schichten und veranschaulicht die Komplexität und die strukturelle Vielfalt des MHV-68-Teguments und seiner Hülle. **D, E, G** Elektronentomographie- Bilder von MHV-68-Virionen farblich dargestellt: rot = DNA, grün = Kapsid, rosa = Tegument, orange = Hülle und gelb = Vorwölbungen der Hülle. **D** Virion im Extrazellulärraum, **E** Endozytose farblich dargestellt: grau = Plasmamembran der Wirtszelle, Cyan = elektronendichte Beschichtung der inneren Zellmembran, die Ähnlichkeit mit der Clathrin-vermittelten Endozytose aufweist. **F** Injektion der DNA in den Zellkern durch eine Kernpore. Farben: rot = virale DNA, grün = Kapsid, grau = Ribosomen, orange = INM (innere Kernmembran), rosa = ONM (äußere Kernmembran), Cyan = NPC (Kernpore) und Filamente. „Nu“ = Nukleus, „Cy“ = Zytoplasma. Die Filamente dienen vermutlich dem Docking-Prozess zwischen dem Kapsid und der Kernpore. **G** Beim Ausschleusen des Virions aus dem Zellkern verliert es seine primäre Hülle und tritt unbehüllt in das Zytoplasma ein. Adaptation der Grafiken aus: **A-C** [134] und **D-E** [135].

3.3.4. MHV-68

Für die Untersuchung der Gammaherpesviren am Tiermodell stellt die hohe Wirtsspezifität eine problematische Hürde dar. Zwar existieren repräsentative Virusmodelle an Primaten und chimären Mäusen, diese sind aber entweder sehr kostenaufwendig oder bringen grundlegende Limitationen bezüglich der Wirtsimmunität mit sich [121].

Im Jahr 1980 wurde erstmals ein Herpesvirus aus Rötelmäusen und Gelbhals-Feldmäusen isoliert, welches sich unter anderem in BHK-21-Zellen und Rabbit-Embryo-Fibroblast-Zellen (REF) gut vermehrte [136]. Später wurde dieses Virus als murines gamma-Herpesvirus-68 (MHV-68) katalogisiert und der Familie der Herpesviridae, der Subfamilie Gammaherpesvirinae und der Gattung der Rhadinoviren zugeordnet. Es wird alternativ auch als murines Herpesvirus 4, MuHV-4 oder als mouse herpesvirus strain 68 bezeichnet [137].

Auch in der Hausmaus (*Mus musculus*), die für wissenschaftliche Untersuchungen nahezu ein Alleinstellungsmerkmal unter den Mausarten besitzt, vermehrt sich MHV-68 gut. In der Natur wird das Virus wahrscheinlich über die Atemwege aufgenommen und infiziert zunächst Zellen der Mukosa wie alveolare Epithelzellen [138], welche die erste physikalische Barriere darstellen. In dieser akuten Phase der Infektion wird ein Großteil der viralen Gene exprimiert. Nach ein paar Tagen und mithilfe von B-

Zellen werden weitere Organe wie die Milz infiltriert und das virale Gen-Expressionsmuster beginnt sich in Richtung einiger weniger Latenz-spezifischer Gene zu verschieben. Die Mechanismen der akuten und latenten Infektion laufen zunächst parallel ab, nach 2-3 Wochen sind die meisten Virionen in die Latenz übergegangen. Wichtige Zellen hierfür sind B-Zellen, Makrophagen, Epithelzellen und dendritische Zellen, wobei Milz und Peritoneum die wichtigsten Manifestationsorte der Latenz darstellen. Durch Nanopartikel [114], Stress, UV-Strahlung und Menstruation können latente Herpesviren reaktiviert werden. Dann kommt es erneut zur lytischen Replikation. Diese unterscheidet sich in einigen Punkten von einer Erstinfektion. Dazu gehört die Tatsache, dass das Virus sich aus der infizierten Zelle heraus vermehren kann und somit einige Schutzmechanismen umgeht. Zudem wurde das Virus im Rahmen der Erstinfektion schon einmal als Antigen erkannt und Wirtszelle wie Immunsystem haben entsprechende Abwehrmechanismen bereits eingeleitet.

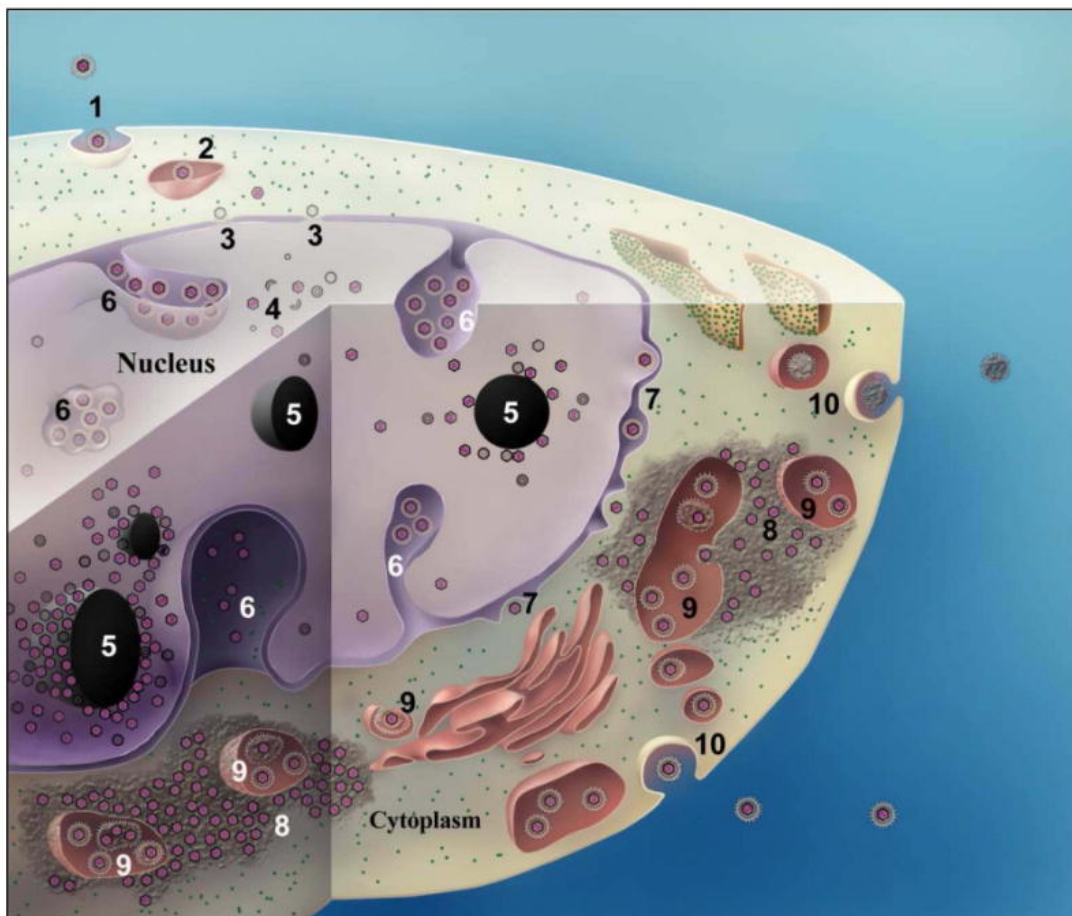


ABBILDUNG 5: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES INFIZIONSZYKLUS VON MHV-68.

(1) Endozytose oder Membranfusion. Durch welchen der beiden Prozesse MHV-68 in die Zelle eintritt scheint unter anderem vom Zelltyp bestimmt zu werden. Die Familie der Herpesviren ist grundsätzlich zu beiden Mechanismen in der Lage. (2) Transport in einem Endosom-Vesikel zum Zellkern. (3) Injektion der viralen DNA durch einen Kernporus. (4) Zusammenbau des Kapsids, welches anschließend die DNA umhüllt. Dieser Zusammenschluss wird auch Nukleokapsid genannt (5) Bildung von intranukleären Inklusionskörperchen, die möglicherweise für die Reparatur des Zellkerns und den Zusammenbau des Nukleokapsids bestimmt sind. (6) Einstülpung der Zellkernmembran (Invagination) und (7) Austritt des unbehüllten Virions aus dem Zellkern. (8) Bildung des Teguments und (9) zweite Behüllung des Virions im Trans-Golgi-Netzwerk. (10) Austritt via Exozytose. Quelle: [135].

Neben den erwähnten Phasen des Infektionszyklus wird vermutet, dass MHV-68, ähnlich wie CMV, eine persistente Infektion mit konstanter, aber relativ niedriger Replikationsrate auslösen kann. Unter

welchen immunologischen Bedingungen und in welchem Kontext der einzelnen Infektionsphasen diese persistente Infektion abläuft, ist noch unklar [121]. Eine schematische Darstellung des Infektionszyklus von MHV-68 ist in **ABBILDUNG 5** zu sehen.

3.3.5. Interferone und MHV-68

Wie oben beschrieben sind Typ-I Interferone vor allem in der akuten Phase einer Virusinfektion wichtig. Aus diesem Grund besitzen IFNAR1-Knockout-Mäuse keine ausreichende Abwehrfunktion in der akuten MHV-68 Infektion. In der Latenzphase regulieren Typ-I Interferone die virale Genexpression *in vivo* und verhindern die Reaktivierung des Virus. Auch einzelne Proteininteraktionen wurden bislang untersucht. Dazu gehört auch die H2AX-Kinase mit dem Namen Open-Reading-Frame-36 (ORF36) [139]. Während des Infektionszyklus bindet ORF36 spezifisch an das intranukleär vorliegende IRF3. Dadurch wird die IRF3-vermittelte Transkription von Typ-I Interferonen behindert [140]. Im Infektionszyklus des KSHV inhibiert ORF45 IRF7 und somit die Transkription von ISG und Typ-I Interferonen. Auch im Infektionszyklus des MHV-68 nimmt ORF45 eine essenzielle Funktion in der frühen Phase der Virusreplikation ein. Mehr ist bislang nicht bekannt [141].

Typ-II-Interferon wird während der akuten Infektion in hohem Maße produziert. Liegt es während der Herpesvirusinfektion in Mäusen in erniedrigter Konzentration vor, sinkt die Effektivität der CD4-vermittelten Immunantwort und die Mortalität nimmt zu [20]. Des Weiteren entwickeln Typ-II Interferonrezeptor-Knockout-Mäuse, die mit MHV-68 infiziert wurden, eine Multi- Organfibrose die unter anderem die Milz, die Leber und die Lunge betrifft. Grund hierfür ist, dass Typ-II Interferon für die Kontrolle von Reaktivationsmechanismen und die Ausräumung von persistenten Infektionen zuständig ist [21]. Durch die chronische Viruspersistenz mit niedrigen, aber pathologischen Titern werden vermutlich fibrotische Erkrankungen mitverursacht. Die detaillierte Aufschlüsselung dieser Mechanismen bleibt weiterhin Aufgabe zukünftiger Forschung [20]. „Knockout“ bedeutet hier, dass ein bestimmtes Gen der Mäuse durch genetische Manipulation deaktiviert wurde.

In der Gruppe der ISG konnte bis heute nur für ISG15 eine antivirale Wirkung direkt nachgewiesen werden. Dabei zeigten infizierte ISG15-Knockout-Mäuse erhöhte Virustiter aber, keine erhöhte Mortalität [142].

Über die Interaktion von Typ-III Interferonen und MHV-68 ist bislang wenig bekannt. Im Jahr 2016 zeigte eine Forschergruppe um Katarína Lopusná, dass Typ-III Interferone vermutlich eine wichtige Rolle in der frühzeitigen Virusabwehr von infizierten Epithelzellen einnehmen und MHV-68 in den ersten 6 Stunden nach Infektion die IFNL-Rezeptoren im Gegensatz zu den Typ-I-Interferon-Rezeptoren nicht zerstört [82]. Zudem konnte im Jahr 2019 gezeigt werden, dass IFNL die Replikation von MHV-68 in murinen Epithelzellen der oberen Atemwege hemmt. *In vitro* konnte IFNL die Viruslast allerdings nur reduzieren, wenn der IFNL-Rezeptor IFNLR1 verstärkt exprimiert wurde. *In vivo* bestätigte sich diese Beobachtung. Allerdings konnte trotz der antiviralen Wirkung von IFNL in den oberen Atemwegen ein Übertritt der Virionen in Lymphknoten und die Milz nicht verhindert werden [143].

3.3.6. Vergleichbarkeit von MHV-68 mit humanen Gammaherpesviren

Die Ähnlichkeit und Vergleichbarkeit von MHV-68 und humanen Gammaherpesviren lässt sich anhand der Betrachtung mehrerer Viruseigenschaften erklären.

Genau wie humane Gammaherpesviren im menschlichen Wirt kann das murine Virus Lymphome und lymphoproliferative Erkrankungen in der Maus auslösen. Es gibt zwar einige virale Gene, die nur im murinen Virus vorliegen, jedoch sind die meisten davon für die Replikation durchaus verzichtbar.

Daher sind viele Grundprinzipien der Pathogenese ähnlich und die wichtigsten Gene der Replikation, der Latenz und der Reaktivierung sind in beiden Virusstämmen vertreten.

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Immunsysteme von Mensch und Maus sehr ähnlich konfiguriert sind, erscheint die Annahme der Relevanz des MHV-68 Mausmodells hinsichtlich ihrer Vergleichbarkeit mit humanen Gammaherpesviren durchaus vertretbar [121].

Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass MHV-68 große Ähnlichkeit mit dem humanen Epstein-Barr-Virus besitzt. Dabei sind B-Zellen im Rahmen der Viruspersistenz und -latenz sowohl für MHV-68 als auch für EBV essenziell [144]. Im Rahmen der Erstinfektion beider Virusspezies kommt es bei klinisch kranken Patienten und Mäusen zu einer Atrophie des Thymus und der Milz. Bei fehlender Symptomatik entwickelt sich im Rahmen der Lymphozytenproliferation eine Splenomegalie [145]. Demnach ist MHV-68 als Modell zur Erforschung der infektiösen Mononukleose mittlerweile unverzichtbar [137].

Zudem verbesserte MHV-68 das Verständnis bezüglich der Ausbildung und Aufrechterhaltung der Viruslatenz von Gammaherpesviren. Beispielsweise tritt das Virus bevorzugt in B-Zellen der Milz, Makrophagen und dendritischen Zellen in die Latenz ein und ähnelt damit dem humanen KSHV [146]. Auch in der Impfstoffentwicklung gegen KSHV konnten Untersuchungen von MHV-68 tiefgreifende Erkenntnisse liefern [147].

Zudem konnte gezeigt werden, dass MHV-68 einer EBV-Infektion des zentralen Nervensystems ähnelt. Dabei persistiert MHV-68 im ZNS und kann wie das Epstein-Barr-Virus zu einem Hydrozephalus, einer Meningitis, einer Zerebellitis oder einer Enzephalitis führen [148].

3.3.7. MHV-68 und die idiopathische Lungenfibrose

Einige Studien haben bereits die Rolle von Gammaherpesviren wie EBV als chronischer inflammatorischer Stimulus in der Pathogenese der IPF beleuchtet [16]. Im Mausmodell löst MHV-68 in Typ-II-Interferon-Rezeptor-Knockout-Mäusen (auch: IFN γ RRKo) eine Lungenfibrose aus. Hierbei handelt es sich um Mäuse, die durch genetische Modifikation den Rezeptor für Interferon gamma nicht ausbilden können [20]. Diese Lungenfibrose ähnelt der IPF unter anderem durch die Ausschüttung profibrotischer Zytokine wie TGF- β und IL-13. Allein die akute Infektion scheint aber für die Entstehung der Fibrose nicht auszureichen. Wenn das Gammaherpesvirus im Laufe der Infektion nicht in die Reaktivierung übergeht, findet sich neben lymphozytären Infiltraten und einer Vaskulitis nur eine milde und lokal begrenzte Fibrose. Auch die klassischen Signalwege und Zytokine werden im Rahmen dieser Infektion nicht aktiviert. Somit scheint die Reaktivierung und die daraus resultierende chronische Epithelschädigung für den Übergang einer Lungenentzündung in die Lungenfibrose ein wichtiger Faktor zu sein [149].

4. Hypothese

„Interferon spielt bei der Entstehung der idiopathischen Lungenfibrose im Rahmen der MHV-68-Infektion der Lunge eine wichtige Rolle.“

Die Infektion durch Herpesviren wird als einer der Co-Faktoren bei der Entstehung der idiopathischen Lungenfibrose diskutiert. Dabei steht vor allem die chronische Epithelschädigung und ein gestörter Wundheilungsprozess im Fokus. In epithelzellreichen Organen wie der Lunge wurde IFNL als wichtiges Zytokin im Rahmen von Virusinfektionen und fibrotischen Prozessen identifiziert. Bislang existieren jedoch noch keine Forschungsarbeiten, die Aufschluss über den Zusammenhang von IFNL mit der idiopathischen Lungenfibrose im Rahmen einer Herpesvirusinfektion geben. Ziel dieser Arbeit ist somit die Untersuchung dieses Zusammenhangs am Mausmodell in vitro und in vivo mithilfe des murinen Gammaherpesvirus MHV-68.

5. Material

5.1. Geräte

Modell	Gerät	Hersteller
3031	Schüttelinkubator	GFL, Burgwedel, Germany
4K15	Kühlzentrifuge	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Germany
900 & Grill	Mikrowelle	Severin, Sundern, Germany
7300 Real Time PCR System	Real Time PCR-System	Applied Biosystems/ Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Axiovert 200M	Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Jena, Germany
KTR 1670	Kühlschrank (4°C)	Bosch, Stuttgart, Germany
Centrifuge 5417 R	Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Germany
Comfort	Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr, Ochsenhausen, Germany
comfort	Thermoschüttler	Eppendorf, Hamburg, Germany
Dell Latitude D510	Laptop	Dell Technologies Inc., Round Rock, USA
Economic cooler	Kühlschrank (4°C)	Bosch, Stuttgart, Germany
Eppendorf Research 10	Einkanalpipette 10µl	Eppendorf, Hamburg, Germany
Eppendorf Research 20	Einkanalpipette 20µl	Eppendorf, Hamburg, Germany
Eppendorf Research 100	Einkanalpipette 100µl	Eppendorf, Hamburg, Germany
Eppendorf Research 200	Einkanalpipette 200µl	Eppendorf, Hamburg, Germany
Eppendorf Research 1000	Einkanalpipette 1000µl	Eppendorf, Hamburg, Germany
Eppendorf Research 100 8-fach	Mehrkanalpipette 8-fach, 100µl	Eppendorf, Hamburg, Germany
FACS Calibur	Durchflusszytometer	BD Biosciences, Heidelberg, Germany
GSD 1443	Gefrierschrank (-20°C)	Bosch, Stuttgart, Germany
Laserjet Pro400	Laserdrucker	HP Inc., Palo Alto, California
Mastercycler gradient	PCR System	Eppendorf, Hamburg, Germany
Megafuge 1.0	Zentrifuge	Heraeus, Hanau, Germany
Micro 200R	Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen, Germany
Microcentrifuge	Tischzentrifuge	Neolab, Heidelberg, Germany

Mr. Frosty™	Gefrierbehälter	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nanodrop 2000	Spektrometer	Peqlab, Wilmington, DE, USA
Neubauer improved	Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Königshofen, Germany
Officejet Pro K5400	Tintenstrahldrucker	HP Inc., Palo Alto, California
Pipetboy	Pipettierhilfe	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal, Germany
Rotina 35 R	Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen, Germany
RS-VA10	Vortexgerät	Phenix Instruments, Garbsen, Germany
Telaval 31	Mikroskop	Zeiss, Jena, Germany
Terra ATX P8P67-M	Desktop-PC	Wortmann AG, Schnathorst, Germany

TABELLE 4: GERÄTE GELISTET NACH MODELL UND HERSTELLER

5.2. Primer

Name	Sequenz	Literatur
mUSP18	forward: 5'-CAT CCT CCA GGG TTT TCA GA-3' reverse: 5'-AAG GAC CAG ATC ACG GAC AC-3'	Selvakumar et al. 2017 [150]
mIFI44	forward: 5'-AAC TGA CTG CTC GCA ATA ATG T-3' reverse: 5'-GTA ACA CAG CAA TGC CTC TTG T-3'	Selvakumar et al. 2017 [150]
mColla1	forward: 5'-CCA AGA AGA CAT CCC TGA AGT CA-3' reverse: 5'-TGC ACG TCA TCG CAC ACA-3'	Mümmmler et al. 2018 [151]
mFn	forward: 5'-GGT GTA GCA CAA CTT CCA ATT ACG-3' reverse: 5'-GGA ATT TCC GCC TCG AGT CT-3'	Mümmmler et al. 2018 [151]
malpha-SMA	forward: 5'-GCT GGT GAT GAT GCT CCC A-3' reverse: 5'-GCC CAT TCC AAC CAT TAC TCC-3'	Mümmmler et al. 2018 [151]
mE-Cad	forward: 5'-AGC CAT TGC CAA GTA CAT CC-3' reverse: 5'-AAA GAC CGG CTG GGT AAA CT-3'	v.d. Velden et al. 2012 [152]
mVim	forward: 5'-TGA AGG AAG ATG GCT CGT-3' reverse: 5'-TCC AGC AGC TTC CTG TAG GT-3'	v.d. Velden et al. 2012 [152]
mN-Cad	forward: 5'-CCA CAG ACA TGG AAG GCA ATC C-3' reverse: 5'-CAC TGA TTC TGT ATG CCG CAT TC-3'	Gündüz et al. 2012 [153]
mbeta-actin	forward: 5'-AGA GGG AAA TCG TGC GTG AC-3' reverse: 5'-CAA TAG TGA TGA CCT GGC CGT-3'	Sommereyns et al. 2008 [154]
mIFN- alpha5	forward: 5'-CCT GTG TGA TGC AAC AGG TC-3' reverse: 5'-TCA CTC CTC CTT GCT CAA TC-3'	Sommereyns et al. 2008 [154]
mIFN-beta	forward: 5'-ATG AAC AAC AGG TGG ATC CTC C-3' reverse: 5'-AGG AGC TCC TGA CAT TTC CGA A-3'	Sommereyns et al. 2008 [154]
mIFN-lambda2/3	forward: 5'-AGC TGC AGG CCT TCA AAA-AG-3' reverse: 5'-TGG GAG TGA ATG TGG CTC AG-3'	Sommereyns et al. 2008 [154]
mIFNAR1	forward: 5'-CAT GTG TGC TTC CCA CCA CT-3' reverse: 5'-TGG AAT AGT TGC CCG AGT CC-3'	Sommereyns et al. 2008 [154]
mIL-28Ra	forward: 5'-TGC AGA TTC CTC TCC AGC AA-3' reverse: 5'-GTC TTC ACC CCC TGA AAC CA-3'	Sommereyns et al. 2008 [154]
mUSP18	forward: 5'-CAT CCT CCA GGG TTT TCA GA-3' reverse: 5'-AAG GAC CAG ATC ACG GAC AC-3'	Selvakumar et al. 2017 [150]
mISG15	forward: 5'-GGT GTC CGT GAC TAA CTC CAT reverse: 5'-TGG AAA GGG TAA GAC CGT CCT	[155] PrimerBank ID: 226874850c1
mIFIT1	forward: 5'-TGA AGC AGA TTC TCC ATG ACC-3' reverse: 5'-GCA AGA GAG CAG AGA GTC AAG'	Lazear et al. 2015 [156]
mRSAD2	forward: 5'-ACA CAG CCA AGA CAT CCT TC-3' reverse: 5'-CAA GTA TTC ACC CCT GTC CTG-3'	Lazear et al. 2015 [156]

mTGF- β 1	forward: 5'-CTC CCG TGG CTT CTA GTG C-3' reverse: 5'-GCC TTA GTT TGG ACA GGA TCT G -3'	[155] PrimerBank ID: 6755775a1
mTGF- β 2	forward: 5'-TCG ACA TGG ATC AGT TTA TGC G-3' reverse: 5'-CCC TGG TAC TGT TGT AGA TGG A-3'	[155] PrimerBank ID: 166706904c1
mArginase-1	forward: 5'-GGA ACC CAG AGA GAG CAT GA-3' reverse: 5'-TTT TTC CAG CAG ACC AGC TT-3'	Zhang et al. 2018 [157]

TABELLE 5: PRIMERSEQUENZEN MIT DER JEWEILIGEN LITERATURANGABE „m“ = MURIN

Die Primer wurden von Metabion international AG, Semmelweisstraße 3, 82152 Planegg, bezogen.

5.3. Software

Name	Anwendung	Hersteller
SigmaPlot	Datenanalyse-und Graphik-Software	Systat Software GmbH, Erkrath, Germany
FlowJo™	Durchflusszytometrie-Software	BD Biosciences, Heidelberg, Germany
Microsoft Word	Schreibsoftware	Microsoft, Redmond, Washington, USA
Microsoft Excel	Tabellensoftware	Microsoft, Redmond, Washington, USA
Graphpad Prism 9	Statistik-und Graphiksoftware	GraphPad Software San Diego, California

TABELLE 6: SOFTWARE GELISTET NACH NAME, ANWENDUNG UND HERSTELLER

5.4. Reagenzien

Reagenz	Hersteller
2-Mercaptoethanol (50mM)	Amimed/biozol, Eching, Germany
Albumin, Pulver, from bovine serum	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany
ACK Lysing Buffer	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Carboxymehtylcellulose sodium salt C4888-500G	Merck KGaA/Sigma-Aldrich
Cristal violet	Roth, Karlsruhe, Germany
Dulbecco´s Modified Eagle Medium 500ml (DMEM), (+)4,5g/l D- Glucose, (+)L- Glutamin, (+)Pyruvat	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dulbecco´s Modified Eagle Medium 500ml-low glucose (DMEM-low glucose), (-)L- Glutamin, (+)Pyruvat	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline (DPBS) 500ml (-)CaCl ₂ (-)MgCl ₂	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany
Distilled Water DNase free/RNase free	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
EDTA	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany
Ethanol	Merck, Darmstadt, Germany
Fetal Bovine Serum (FBS)	PAN Biotech, Aidenbach, Germany
Formaldehydlösung 37% CH ₂ O 30,03 g/mol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
Glasgow-MEM (BHK-21)	PAN Biotech, Aidenbach, Germany
Glycerin, ROTIPURAN®≥99,5% wasserfrei	p.a., Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems™/ Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Interferon lambda 2 (murin, recombinant, lyophilisiert), Reinheit > 98%	Novus Biologicals Europe, Abingdon, UK
Interferon lambda 3 (murin, recombinant, lyophilisiert), Reinheit > 98%	Novus Biologicals Europe, Abingdon, UK
Interleukin 4 (murin, rekombinant, lyophilisiert), Reinheit 95,0%	ImmunoTools GmbH, Friesoythe, Germany
IL-28R alpha/IFN-lambda R1 Antibody	Novus Biologicals Europe, Abingdon, UK
L-Glutamine (200mM)	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nucleospin® RNA Plus DNA, RNA and protein purification Kit	Macherey-Nagel, Düren, Germany
Penicillin/Streptomycin	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PowerSYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems/ Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RPMI Medium 1640 (+)L-Glutamin	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
TGF-β1 (human, recombinant, lyophilisiert), Reinheit >98%	PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA
Trypanblau 0,4%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany
Trypsin-EDTA 0,05% 100ml	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tryptose Phosphate Broth T8159-100ml	Merck KGaA/Sigma-Aldrich

TABELLE 7: REAGENZIEN GELISTET NACH HERSTELLER

5.5. Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
96 Well Cell Culture Cluster, Flat Bottom	Corning Inc., NY, USA
50ml Polypropylene Conical Tube	Falcon, Corning Inc., NY, USA
15ml High Clarity Polypropylene Conical Tube	Falcon, Corning Inc., NY, USA
5ml Polystyrene Round-Bottom-Tube	Falcon, Corning Inc., NY, USA
Bacillol Plus	Bode Chemie GmbH, Hamburg, Germany
Cell Culture Flask 250ml, 75cm ² filter screw cap	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany
Cell Culture Flask 50ml, 25cm ² filter screw cap	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany
Costar® Stripette 25ml	Corning Inc., NY, USA
Costar® Stripette 10ml	Corning Inc., NY, USA
Costar® Stripette 5ml	Corning Inc., NY, USA
CryoTube™ Vials 2ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ecoshield™ Natural Nitrile PF250	Shield Scientific, Bennekom, Niederlande
MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode	Applied Biosystems/ Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Multiwell 24 well	Falcon, Corning Inc., NY, USA
PARAFILM® Double Size Roll	Merck KGaA/Sigma-Aldrich
Sterillium Virugard	Bode Chemie GmbH, Hamburg, Germany
SurPhob Spitzen, 10µl, farblos	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Germany
SurPhob Spitzen, 200µl, farblos	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Germany
SurPhob Spitzen, 1250µl, farblos	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Germany
Zellkultur Testplatte 96U	Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz

TABELLE 8: VERBRAUCHSMATERIALIEN GELISTET NACH HERSTELLER

6. Methoden

In diesem Abschnitt werden die grundlegenden Methoden dieser Arbeit erklärt. Eine detaillierte Beschreibung der Durchführung ist für jedes Experiment in dem entsprechenden Abschnitt im Ergebnisteil zu finden.

6.1. Zellkultur

6.1.1. Zelltypen

Bezeichnung	Morphologie	Gewebe	ATCC®	Organismus	Literatur
BHK-21	Fibroblast, adhärent	Niere	CCL-10™	Mesocricetus auratus, Hamster	[158]–[160]
Mlg 2908	Fibroblast, adhärent	Lunge	CCL-206™	Mus musculus, Maus	[161]–[163]
LA-4	Epithelzelle, adhärent	Lunge	CCL-196™	Mus musculus, Maus	[114], [164], [165]
MH-S	Alveolarmakrophage, adhärent und Suspension	Lunge	CRL-2019™	Mus musculus, Maus	[114], [166], [167]
MLE-12	Epithelzelle, SV40-transformiert, adhärent	Lunge	CRL-2110™	Mus musculus, Maus	[168]–[170]

TABELLE 9: ZELLTYPEN, DEREN MORPHOLOGIE, ZUGEHÖRIGKEIT ZU GEWEBETYPEN UND ORGANISMEN SOWIE DEREN EIGENSCHAFTEN

6.1.2. Zellkulturmedien

Zelltyp	Zusammensetzung	
	Reagenz	Volumen
LA-4	DMEM	500ml
	FBS 75ml bzw. 15%	75ml
	Penicillin/Streptomycin	5ml
	L-Glutamin	5ml
MH-S	RPMI	500ml
	FBS	75ml
	Penicillin/Streptomycin	5ml
	L-Glutamin	5ml
MLE-12	2-Mercaptoethanol (50mM)	500µl
	DMEM	500ml
	FBS 75ml bzw. 15%	75ml
	Penicillin/Streptomycin	5ml
BHK-21	L-Glutamin	5ml
	Glasgow-MEM (BHK-21)	500ml
	FBS	25ml
	Penicillin/Streptomycin	5ml
CCL-206	L-Glutamin	5ml
	Tryptose Phosphate Broth	25ml
	DMEM-F12	500ml
	FBS	50ml
Overlay-Medium	Penicillin/Streptomycin	5ml
	Medium	200ml
Formaldehyd (FA)	Methylcellulose	1,5g
	Formaldehydlösung 37%	2ml
	PBS	100ml

TABELLE 10: ZELLTYPEN, DEREN NÄHRMEDIEN SOWIE DIE ZUSAMMENSETZUNG DER NÄHRMEDIEN

6.1.3. Passagierung der Zellen

Folgende Methode gilt für die Zelltypen LA-4, MH-S, BHK-21, MLE-12 und CCL-206.

Die Zellen wurden unter 37°C und 5% CO₂ inkubiert und alle 3-5 Tage bei einer Konfluenz von ca. 70%-90% in einem Verhältnis von 1/10 passagiert. Konfluenz meint hier die Dichte des Zellrasens. Eine Konfluenz von 100% entspricht einem geschlossenen Zellrasen.

Zunächst wurde die Vitalität und das Wachstum unter dem Mikroskop kontrolliert. Im Anschluss wurde das Medium aus der Kulturflasche entfernt. Die freiliegenden Zellen wurden sofort mit 2ml PBS gewaschen, geschwenkt und abgeschüttet. Zum Ablösen der Zellen wurde 2ml Trypsin-EDTA hinzugegeben und unter Sichtkontrolle geschwenkt. Sobald fast alle Zellen abgelöst waren wurde die Trypsin-EDTA/Zellen-Suspension von der Zellkulturflasche in 8ml Medium überführt (Suspension im Verhältnis 1/5). 1ml der 1/5-Suspension wurde in eine neue Zellkulturflasche mit 9ml (10ml Zellkulturflasche) oder 19ml Medium (20ml Zellkulturflasche) überführt.

Die Passagezahl wurde fortlaufend dokumentiert. Ab einer Passage von ca. 25-30 (je nach Vitalität der Kultur) wurden die Zellen verworfen und eine neue Kultur aus einer eingefrorenen Zellsuspension begonnen.

Vor den Experimenten wurde die Konzentration der Zellen pro ml bestimmt und eine Suspension von Zellen und Medium in gewünschter Konzentration (i.d.R. 50.000 Zellen/ml) hergestellt.

6.1.4. Zellzählung und Einstellung einer gewünschten Zellkonzentration

Ausgangspunkt für die Zellzählung war die 1/5-Zellsuspension aus der Zellkulturpassage. Davon wurden 20µl entnommen, mit 80µl Trypanblau vermischt und von den resultierenden 100µl 10µl in die Neubauer Zählkammer eingespritzt. Tote Zellen wurden unter dem Mikroskop identifiziert und nicht für die Zählung berücksichtigt. Gezählt wurden die Zellen innerhalb der großen Quadrate der Zählkammer. Die Zellkonzentration wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{Anzahl der gezählten Quadrate}} * \frac{10.000}{\text{ml}} * \text{Dilutionsfaktor} = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}}$$

„10.000“ ist hier der Faktor eines Zählquadrats mit einer Fläche von 0,0025 mm².

Der Dilutionsfaktor wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Volumen Zellsuspension}}{\text{Volumen Trypanblau} + \text{Volumen Zellsuspension}} = \text{Dilutionsfaktor}$$

Es folgte die Berechnung der nötigen Volumina von Medium und Suspension für die Einstellung der gewünschten Zellkonzentration.

6.1.5. Einfrieren der Zellen

Nach Passagierung einer Kulturgeneration wurde die übrig gebliebene Zellsuspension bei 280 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1,5ml DMSO/FBS (davon 10% DMSO) resuspendiert und in ein Cryotube gegeben. Der Einfriervorgang erfolgte für mindestens 2h im Gefrierbehälter Mr. Frosty™ bei -80°C. Die Zellen wurden bei -80°C gelagert.

6.1.6. Auftauen der Zellen

Zum Auftauen wurde ein Cryotube in 37°C warmes Wasser eingebracht, bis sich der gefrorene Anteil auf etwa 1cm Durchmesser reduziert hatte. Dann wurde die kalte Suspension mit 37°C warmem Medium gemischt und zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit Medium vermischt und in eine Kulturflasche gegeben.

6.2. Rekonstitution der Zytokine

Rekonstitution bedeutet hier die Wiederherstellung der biologischen Aktivität des jeweiligen Zytokins durch Herstellung einer Suspension nach den Herstellerangaben.

6.2.1. Interleukin 4 (IL-4)

Das murine, rekombinante Interleukin 4 wurde als steriles Pulver in lyophilisierter Form geliefert und nach den Herstellerempfehlungen rekonstituiert.

Zunächst wurden 10ml doppelt destilliertes Wasser (ddH₂O) mit 10mg 0,1%igem BSA-Pulver vermischt. Diese Suspension wird im Folgenden Trägerlösung (auch: Vehikel-Kontrolle) genannt. Dann wurden 10µg IL-4 in 100µl Trägerlösung gegeben und vermischt. Diese IL-4 -Suspension wurde mit 9900µl Trägerlösung vermischt. Die Konzentration von IL-4 in dieser Suspension betrug 1ng/µl und wurde bei -20°C gelagert. Auch die Trägerlösung wurde bei -20°C gelagert.

6.2.2. TGF-β1

Das humane, rekombinante TGF-β1 wurde als steriles, lyophilisiertes Pulver geliegt und nach den Herstellerangaben rekonstituiert.

Der erste Schritt war die kurze Zentrifugation von 2µl TGF-β1. Anschließend wurde eine Salzsäurelösung (HCl) mit einer Molarität von 4mM hergestellt. Dafür wurden 7,82µl 32%ige HCl-Lösung in 20ml ddH₂O gegeben und vermischt. In diese Suspension wurden 20mg 0,1%iges BSA-Pulver gegeben und vermischt. Diese Suspension wird im Folgenden als „Trägerlösung“ bezeichnet. 2µl des vorher zentrifugierten TGF-β1 wurden anschließend mit 2ml Trägerlösung vermischt. Diese Suspension enthielt eine TGF-β1-Konzentration von 1ng/µl und wurde bei -80°C gelagert. Auch die Trägerlösung wurde bei -80°C gelagert.

6.2.3. Interferon lambda 2 und Interferon lambda 3

Das murine, rekombinante Interferon lambda 2 und 3 wurde als steriles, lyophilisiertes Pulver geliefert und nach den Herstellerangaben rekonstituiert.

Zunächst wurden 20µg IFNL kurz zentrifugiert. Anschließend wurden 100µl ddH₂O hinzugegeben und kurz zentrifugiert. Zu dieser Suspension wurde 100µl Glycerol hinzugegeben, kurz zentrifugiert und bei -20°C gelagert. Außerdem wurde eine Suspension von ddH₂O und Glycerol im Verhältnis 1:1 als Trägerlösung bei -20°C gelagert.

6.3. Molekularbiologische Methoden

6.3.1. RNA Isolation

RNA wurde mittels Nucleospin® RNA Plus entsprechend den Empfehlungen des Herstellers aus Zellen gewonnen und aufbereitet. Danach wurde die RNA-Konzentration und Qualität mit dem Spectrophotometer Nanodrop™ 2000 näherungsweise bestimmt. Entsprechend dem Ergebnis des Spectrophotometers wurden 25µl einer RNA-ddH₂O-Suspension mit einer mRNA-Konzentration von 50ng/µl hergestellt und für die nachfolgende reverse Transkription verwendet. Die übrige mRNA-Suspension wurde bei -20°C gelagert und katalogisiert.

6.3.2. Reverse Transkription

Die RNA-Suspension der Konzentration 50ng/µl wurde mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit von Applied Biosystems™ entsprechend den Empfehlungen des Herstellers in komplementäre DNA, nachfolgend „cDNA“ genannt, umgeschrieben.

6.3.3. Quantitative Real-Time-Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)

6.3.3.1. Das Prinzip der Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine molekularbiologische Methode zur Amplifikation ausgewählter Abschnitte von DNA, cDNA oder RNA. Zunächst wird eine doppelsträngige cDNA-Matrize durch Temperaturerhöhung zu zwei Einzelsträngen denaturiert (erste Denaturierung). Am Einzelstrang können ausgewählte Oligonukleotide (Primer) an ihrem komplementären cDNA-Abschnitt anlagern und damit den Start- und Endpunkt für die DNA-Polymerase festlegen (Primerhybridisierung). Für jede zu amplifizierende DNA-Sequenz wird ein Forward- und ein Reverse-Primer benötigt. Die Begriffe Forward und Reverse stammen aus der zellulären Replikationslehre. In der Replikationsgabel lagert sich der Forward-Primer an den Leitstrang, der Reverse-Primer an den Folgestrang an. Die Polymerase synthetisiert dann einen, zur Vorlage-DNA komplementären, DNA-Tochterstrang (Elongation). Die DNA-Elongation erfolgt dabei immer vom 5'-zum 3'-Ende, wobei die neuen DNA-Bausteine an das 3'-Ende angefügt werden. Als Substrat benötigt die Polymerase dabei Deoxynukleotidtriphosphate (dNTPs), die sich aus einer Deoxyribose, jeweils einer der vier Nukleinbasen Adenin, Cytosin, Guanin oder Thymin und einem Triphosphatrest zusammensetzen. Bei jedem Zyklus der Denaturierung und der Elongation verdoppelt sich die Menge der vorliegenden DNA. Die Länge des synthetisierten DNA-Stränge entspricht dabei dem Abstand zwischen dem Forward- und dem Reverse-Primer. Diese Methode zur Klonierung von DNA wird unter anderem in der forensischen Medizin zur Durchführung von Abstammungstests verwendet [74].

6.3.3.2. Das Prinzip der quantitativen Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Als Weiterentwicklung der PCR bietet die qRT-PCR die Möglichkeit, mit Hilfe einer Schmelzkurve die Menge an DNA quantitativ zu bestimmen. Grundlage der Schmelzkurve ist die Einlagerung (Interkalation) eines Fluoreszenzfarbstoffes wie SYBR Green I in Doppelstrang-DNA (dsDNA). SYBR Green I ist ein asymmetrischer Cyanin-Farbstoff, der selektiv in dsDNA interkaliert [171]. Der resultierende dsDNA-SYBR-Komplex absorbiert blaues Licht der Wellenlänge 497nm und emittiert grünes Licht der Wellenlänge 520nm[172], welches durch einen Sensor detektiert wird. Je mehr cDNA zu Beginn der qRT-PCR vorliegt, desto mehr dsDNA stellt die Reaktion her. Die Zykluszahl bleibt konstant und ermöglicht so einen Vergleich zweier Polymerase-Kettenreaktionen. Die Fluoreszenzstärke korreliert mit der vorliegenden Gesamtlänge der dsDNA und bildet die Basis zur quantitativen Bestimmung der dsDNA. Zur Differenzierung zwischen unspezifischen Syntheseprodukten oder Primer-Dimeren wird am Ende der qRT-PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Der Großteil der synthetisierten dsDNA Produkte hat nach einer korrekt durchgeführten qRT-PCR die gleiche Länge und somit denselben Schmelzpunkt. Die Schmelzkurve zeigt einen einzigen, starken Abfall der Fluoreszenzstärke am Schmelzpunkt des dsDNA-Produktes. Während jeder Elongation wächst das Fluoreszenzsignal aufgrund der ansteigenden Länge der dsDNA. Daher wird auch von „Echtzeit“ gesprochen. Die Anzahl der Zyklen bis zum Überschreiten einer definierten Fluoreszenzschwelle wird Ct-Wert („threshold cycle“) genannt. Die Ct-Werte bilden die Grundlage für die Interpretation der qRT-PCR und wurden in dieser Arbeit auf zwei verschiedene Arten berechnet und interpretiert;

1. Die $2^{-\Delta Ct}$ -Berechnung erlaubt die Darstellung der Ct-Werte relativ zum Ct-Wert des Housekeepers. Housekeeper sind Gene, deren Expression sich während des Experiments nicht ändert und damit als konstanter Bezugsparameter zur Berechnung der relativen Genexpression verwendet werden können.

In dieser Arbeit wurde beta-actin als Housekeeper verwendet. Ein weiterer Normalisierungsparameter ist der passive Farbstoff ROX™ (5-Carboxy-X-rhodamin). Rhodamine sind besonders resistent gegen äußere Einflüsse und besitzen eine konstante Signalstärke [173]. ROX ist im *PowerSYBR® Green PCR Master Mix* enthalten und wird von der Systemsoftware des *7300 Real Time PCR Systems* als „normalized Reporter“, auch „Rn“, berücksichtigt.

$$\Delta Ct_{(Probe)} = Ct_{(Probe)} - Ct_{(Housekeeper)}$$

analog dazu gilt:

$$\Delta Ct_{(Negativprobe)} = Ct_{(Negativprobe)} - Ct_{(Housekeeper)}$$

2. Die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Berechnung erlaubt die Darstellung der ΔCt -Werte relativ zum ΔCt -Wert einer Negativprobe. Die Negativprobe ist der Ct-Wert der Zellen, die im Rahmen eines Experiments nicht mit der zu untersuchenden Substanz behandelt wurden, sonst aber identischen Bedingungen ausgesetzt waren. Diese Methode wurde in Graphiken dieser Arbeit nicht verwendet.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(Probe)} - \Delta Ct_{(Negativprobe)}$$

6.3.3.3. Durchführung der qRT-PCR

Zur Evaluation der Pipettiergenauigkeit wurden einige PCRs durchgeführt, bei denen jedes Sample als Triplikat vorlag. Nachdem die Pipettiergenauigkeit als ausreichend gut befunden wurde, wurden die Samples der nachfolgenden PCRs als Unikat pipettiert.

Jedes Well der 96-well-Platten enthielt ein Volumen von 25µl folgender Zusammensetzung:

Reagenz	Volumen in µl
PowerSYBR® Green PCR Master Mix	12,5
Forward Primer	1 (Konzentration: 10µM)
Reverse Primer	1 (Konzentration: 10µM)
Distilled Water DNase free/RNase free	8,5
cDNA	2 (Konzentration 50ng/µl)
Gesamt	25µl

TABELLE 11: REAGENZIEN UND DEREN VOLUMINA PRO WELL BEI DER QRT-PCR

Das qRT-PCR-Programm stellte sich wie folgt dar:

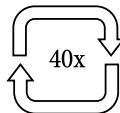
Stadium	Temperatur	Dauer (min:sek)	Wiederholung
Initiation	50,0°C	2:00	↓ 1x
Erste Denaturierung	95,0°C	10:00	↓ 1x
Denaturierung	95,0°C	0:15	
Primerhybridisierung, Elongation und Fluoreszenzmessung	60,0°C	1:00	
	95,0°C	0:15	
Schmelzkurve	60,0°C	0:30	↓ 1x
	95,0°C	0:15	

TABELLE 12: ABLAUF EINER PCR UND DEREN EINTEILUNG IN STADIUM, TEMPERATURVERLAUF, DAUER UND WIEDERHOLUNGSZAHL

6.4. Test der antiviralen Wirksamkeit von Interferon-lambda gegen MHV-68

6.4.1. Stimulation mit IFNL und Infektion mit MHV-68

Am Tag vor dem Experiment wurden die Zellen geerntet und je 1ml in ein Well mit einer Konzentration von 50.000 Zellen/ml in 24-Well-Platten gegeben. Pro 24 -Well-Platte wurden zur besseren Kontrolle der Reinheit je nur zwei Wells verwendet. Für jeden Zeitpunkt wurde eine neue Platte verwendet.

Am Morgen des folgenden Tages wurde pro Platte je zwei Wells behandelt. Ein Well mit IFNL2 & IFNL3 und ein Well mit der Vehikel-Kontrolle (auch: Trägerlösung). Die Vehikel-Kontrolle enthielt kein Zytokin, aber sonst alle Bestandteile der IFNL-Suspension. 6h nach der Vorbehandlung wurden die Zellen mit einer MOI von 0,01 mit MHV-68 infiziert. Die MOI, auch „Multiplicity of Infection“ stellt das Verhältnis von Viruspartikeln zu Zellen dar. Im obigen Fall ist also das Verhältnis von Viruspartikeln zu Zellen in der Suspension 1:100. Dazu wurde, nach dem Absaugen und Lagerung des Mediums bei 4°C, pro Well die entsprechende Virusmenge als 500µl Virus-Medium-Suspension auf die Zellen gegeben und 1h bei 37°C inkubiert. Diese Virus-Medium-Suspension wird auch als Input-Kontrolle bezeichnet. Von der Input-Kontrolle wird nach der Infektion der Zellen mindestens 500µl für die Anfertigung der Plaque-Assays aufbewahrt. Zu beachten ist, dass die Input Kontrolle die gleiche Anzahl an Einfrier- und Auftauvorgängen wie die infizierten Zellen durchlaufen muss. Grund hierfür ist, dass die Virionenzahl bei jedem Einfriervorgang näherungsweise um den Faktor 1×10^{-1} erniedrigt wird.

Dann wurde die Virus-Medium-Suspension entfernt und die Wells zweimal mit PBS gewaschen. In jedes Well wurde die zuvor gesammelte INFL-Medium- oder Vehikel-Medium-Suspension gegeben und für 96h bei 37°C inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Input-Kontrolle bei -80°C eingefroren. Nach 24h, 48h, 72h und 96h wurde je eine Platte bei -80°C eingefroren. Nach dem Einfrieren wurden die Platten und die Input-Kontrolle vollständig aufgetaut und erneut eingefroren. Dieser Vorgang zerstört die meisten Zellen und setzt die intrazellulären Viruspartikel frei.

6.4.2. Plaque Assay

6.4.2.1. Das Prinzip des Plaque Assay

Der Plaque Assay ist ein biologischer Test zur Quantifizierung von infektiösen Viren. Grundlage dieses Tests ist ein Zellrasen eines ausgewählten Zelltyps (bspw. BHK-21) mit einer Konfluenz von näherungsweise 100%. Diese Zellkultur wird mit einer bekannten oder unbekanntem Konzentration des Virus infiziert. Vor Infektion wird eine Titrationsreihe der Virussuspension angefertigt, wobei in der Regel sechs bis acht Verdünnungen mit absteigender Konzentration von 10^{-1} bis 10^{-8} hergestellt werden. Nach Infektion wird ein semisolides Medium (hier: „Overlay-Medium“) auf den Zellrasen gegeben. Die Methylcellulose dieses Mediums verhindert die räumliche Verbreitung der Virionen in der Kultur, sodass nur unmittelbar angrenzende Zellen infiziert werden. Infizierte Zellen werden im Rahmen des zytopathischen Effekts (CPE) zerstört und bilden ein Loch im Zellrasen, das sogenannte Plaque. Die Ausprägung des CPE können je nach Virus, Zelltyp und Experiment variieren. Neben den Plaques kann beispielsweise die Bildung mehrkerniger Riesenzellen (Synzytien), Zellschrumpfung oder das Austreten von Zellbestandteilen auftreten.

Ein Plaque entspricht im Idealfall genau einem infektiösem Virion. Am Ende des Experiments wird der verbleibende Zellrasen angefärbt, wodurch die Plaques sichtbar werden. Zur Auszählung sollte derjenige Zellrasen einer Verdünnungsreihe herangezogen werden, der zwischen 20 und 100 Plaques enthält. Dieser Bereich bietet den besten Kompromiss aus Zählbarkeit und statistischer Signifikanz [73]. Die Anzahl der gezählten Plaques wird mit dem Input-Faktor und der jeweiligen Verdünnung verrechnet. Der Input Faktor wird verwendet, wenn die Virussuspension nicht genau einem Milliliter entspricht. Das Ergebnis wird als Plaque-Forming-Units pro Milliliter angegeben. Der Plaque Assay kann beispielsweise zur Bestimmung einer unbekanntem Viruskonzentration oder zur Quantifizierung des Effekts bestimmter Substanzen auf die lytische Replikation verwendet werden.

6.4.2.2. Durchführung des Plaque Assay

Für die Herstellung des Zellrasens wurden BHK-21-Zellen verwendet. Diese Zellen sind als Wirt für die lytische Replikation von MHV-68-Virus optimal geeignet [174].

Am Tag vor der Titration wurden die BHK-21-Zellen in einer Konzentration von 50.000/ml/Well vorgelegt. Für jeden Zeitpunkt wurden 6 Wells (je 6 für Vehikel-Kontrolle und IFNL) verwendet. Zusätzlich wurden vier Wells für die Negativkontrolle angelegt. Die Negativkontrolle bestand aus 2 Wells mit Medium ohne Virus und 2 Wells Overlay-Medium ohne Virus.

Am Tag der Titration wurde zunächst die Verdünnungsreihe hergestellt. Als Ausgangslösung wurde der Überstand aus den wiederholt eingefrorenen Platten herangezogen (siehe 6.4.1). 100µl dieser Virus-Medium-Suspension wurden mit 900µl Medium verdünnt. Dieser Schritt wurde bis zum Erreichen einer Verdünnung von 1×10^{-6} der Ausgangslösung durchgeführt. Für die Verdünnung wurden 5ml Polystyrene Round-Bottom-Tubes verwendet.

Das Medium der am Tag zuvor vorgelegten BHK-21-Zellen wurde abgesaugt. 900µl der entsprechend verdünnten Virus-Medium-Suspension wurde auf die Zellen gegeben und für 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Virus-Medium-Suspension wurde entfernt, die Zellen mit 2ml Overlay-Medium bedeckt und für 5 Tage bei 37°C inkubiert. Das Overlay-Medium bestand aus Zellmedium mit 1,5g Methylcellulose je 200ml Medium.

Nach 5 Tagen wurde das Overlay-Medium abgesaugt, je Well 250µl Färbelösung hinzugegeben und für 15 Minuten inkubiert. Die Färbelösung bestand aus 1g Kristallviolett, gelöst in PBS und 10%

Formaldehyd, die für die Färbung im Verhältnis 1:10 mit ddH₂O verdünnt wurde. Dann wurde die Färbelösung entfernt und die Wells wurden mehrmals mit Wasser gewaschen. Nachdem die Platten getrocknet waren, wurden die Plaques ausgezählt und der Virustiter anhand folgender Formel berechnet.

$$n\text{Plaques} \times 1,1[\text{Input Faktor}] \times \text{Verdünnung} = \text{Anzahl} \frac{\text{PFU}}{\text{ml}}$$

6.5. FACS Analyse

6.5.1. Das Prinzip der FACS-Analyse

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Identifizierung und Zählung von Zellen [175]. Die Zellen werden in Suspension einzeln durch ein Röhrchen geleitet und von einem Laser erkannt [176]. Die FACS-Analyse (fluorescence-activated-cell-sorter) bietet dabei zusätzlich die Möglichkeit, Zellen mit einem Fluoreszenz-Farbstoff zu markieren und nach Fluoreszenzsignal zu unterscheiden. Die auf diese Weise differenzierten Zellgruppen werden auch Populationen genannt. Man unterscheidet zwischen der direkten und der indirekten Färbung der Zellen. Bei der direkten Färbung bindet ein fluoreszenzmarkierter Antikörper unmittelbar an ein Zellantigen. Die indirekte Färbung bedient sich eines primären Antikörpers und eines sekundären Antikörpers. Der direkte Antikörper ist nicht markiert und bindet spezifisch an das Zellantigen, wobei der sekundäre Antikörper die Fluoreszenzmarkierung trägt und spezifisch an den primären Antikörper bindet [76].

Das FACS Calibur verwendet einen 488nm Argonlaser und Detektoren für drei verschiedene Fluoreszenzparameter. Fluoreszenzunabhängig erkennt die Forward-Scatter-Diode (FSC) anhand des Vorwärtsstreulichtes das Volumen und die Side-Scatter-Diode anhand des Seitwärtsstreulichtes (SSC) die Granularität der Zellen. Diese beiden Parameter können anhand eines Scatterplots gegenübergestellt werden und erlauben beispielsweise die Unterscheidung der einzelnen Leukozyten-Subtypen (auch: Leukozytenpopulationen) im Blut. Die graphische Darstellung von Fluoreszenzstärke gegenüber der Zellzahl wird Histogramm genannt. Das sogenannte „gating“ bezeichnet die Möglichkeit, einzelne Subpopulationen mithilfe der Software einzugrenzen und getrennt voneinander zu beurteilen.

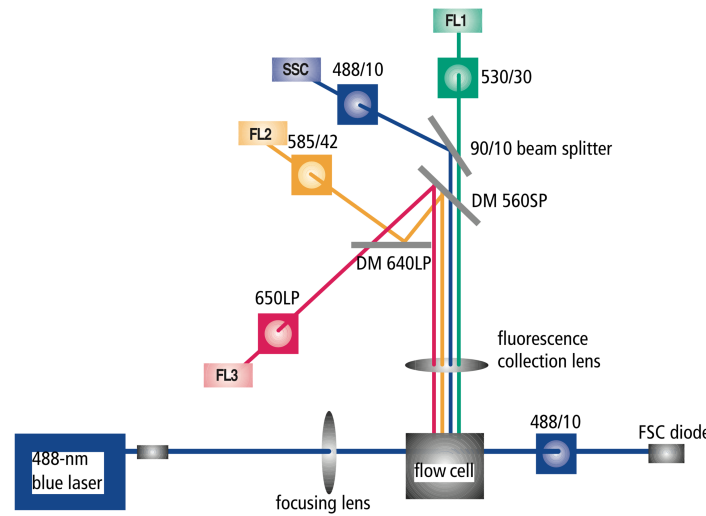


ABBILDUNG 6: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES FACS CALIBUR STANDARD OPTIKSYSTEMS.

Licht der Wellenlänge 488nm wird fokussiert und trifft auf die Zellen im Analyseröhrchen. Die dabei erzeugte Fluoreszenz wird mit unterschiedlichen Spiegeln und Filtern auf die Detektoren geleitet. Abkürzungen: SSC: Side-Scatter-Diode, FSC: Forward-Scatter-Diode, FL1/FL2/FL3: Detektoren für drei verschiedene Fluoreszenzen, DM 560SP und DM640LP=Dichroitische Spiegel und Filter zur spektralen Zerlegung. Quelle: [177]

6.5.2. Durchführung der FACS-Analyse

Zellen wurden geerntet und in einer Konzentration von 5×10^5 bis 1×10^6 Zellen/100uL/Well in eine 96-Well-Rundbodenplatte gegeben. Es wurden je 3 Wells pro Zellart und je 100µl pro Well verwendet. Anschließend wurde die Rundbodenplatte bei 1200 x g bei 4°C fünf Minuten lang zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Dann wurde das Pellet mit 150µl FACS-Puffer resuspendiert („Waschen“), erneut zentrifugiert und abgeschüttet. Der FACS-Puffer bestand aus PBS mit 2% FCS. Sobald die Zellen mit Antikörpern in Kontakt kamen wurde in Dunkelheit und auf Eis gearbeitet. In jedes zu färbende Well wurden 25µl der Suspension des primären Antikörpers gegeben. Die nicht zu färbenden Wells wurden mit 25µl FACS-Puffer behandelt. Im Anschluss wurde die Rundbodenplatte zentrifugiert und der Überstand abgeschüttet. Die Färbung mit sekundärem Antikörper verlief analog zum Verfahren mit dem primären Antikörper. Nach Zentrifugation und nach Abschütten des Überstandes wurde jedes Pellet mit 100µl FACS-Puffer resuspendiert und die Zell-Antikörper-Suspension in FACS-Tubes überführt. Diese wurden bei 4°C gelagert und anschließend für die FACS-Analyse verwendet.

Als primärer Antikörper wurde ein IgG, goat anti-mouse Antikörper gegen den IFNL-Rezeptor1 (IFNLR1 bzw. IL28Ra) in einer Konzentration von 1µg/µl verwendet. Jedes betreffende Well enthielt 1µg des primären Antikörpers.

Als Sekundärer Antikörper wurde Alexa Fluor 488-FITC (F1) rabbit anti-goat IgG in einer Konzentration von 2mg/ml verwendet. Jedes zu färbende Well enthielt ungefähr 50ng (Nanogramm) des sekundären Antikörpers.

Die graphische Auswertung und Darstellung der Daten erfolgte mit dem Programm FlowJo™ von BD Biosciences.

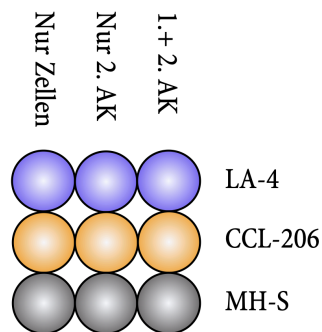


ABBILDUNG 7: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINER PIPETTIERVORLAGE FÜR DIE FACS-ANALYSE

Gezeigt wird die Pipettiervorlage für eine FACS-Analyse mit LA-4, CCL-206 und MH-S. Für jeden Zelltyp wurden je ein Well für die Negativkontrolle „nur Zellen“, ein Well für den 2. Antikörper und ein Well für den 1. und 2. Antikörper angelegt. Die genaue Durchführung wurde in 6.5.2 erläutert.

Makrophagen exprimieren auf ihrer Oberfläche Fc-Rezeptoren, die für falsch positive Ergebnisse in der FACS-Analyse verantwortlich sein können. Diese Rezeptoren binden die Fc-Region der hier verwendeten Antikörper und erzeugen damit ein falsch positives Fluoreszenzsignal. Daher wurden die MH-S-Zellen mit einem Fc-Block behandelt, bevor sie mit dem primären Antikörper in Kontakt kamen. Dazu wurden 50µl des Fc-Blocks (2.4G2: rat anti-mouse CD16/CD32) je Well hinzugefügt und 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen mit FACS-Puffer und Zentrifugation wurde wie oben mit dem primären Antikörper fortgefahren.

6.6. Statistische Auswertung

Die Statistische Auswertung und die Anfertigung der Graphen erfolgte mit dem Programm Graphpad Prism 9. Zunächst wurde mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung getestet.

Waren alle Gruppen einer Analyse normalverteilt wurde eine Varianzanalyse mithilfe des parametrischen ANOVA-Tests durchgeführt. Es wurde dabei ein ungepaarter ANOVA Test ohne Messwiederholungen verwendet. Die Varianzhomogenität wurde bei jedem ANOVA-Test automatisch mittels Brown-Forsythe-Test und, bei mindestens fünf Werten einer Gruppe, zusätzlich mit dem Bartlett's-Test überprüft. Bei Varianzheterogenität wurde der Brown-Forsythe-ANOVA und der Welch-ANOVA-Test verwendet. Nach der Empfehlung von Glantz et al. [178] wurde dabei der Welch Test bevorzugt zur Interpretation der Signifikanz herangezogen. Der Vergleich zwischen mehreren Einzelgruppen wurde bei Varianzhomogenität mit dem „Dunnett-Multiple-Comparisons-Tests“ und bei Varianzheterogenität mit dem „Dunnett-T3-Multiple-Comparisons-Test“ durchgeführt.

War mindestens eine Gruppe nicht normalverteilt, erfolgte die Auswertung mit dem nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Test. Zwei Einzelgruppen einer Auswertung wurden mit dem „Dunns-Multiple-Comparisons“-Tests verglichen.

Bei manchen Experimenten wurde trotz einer nicht-normalverteilten Gruppe der One-Way-ANOVA durchgeführt. In der Literatur bestätigt sich vielfach, dass einfaktorische ANOVA-Tests robust gegenüber Verletzungen der Normalverteilungsannahme sind [179]–[183]. War jedoch mehr als eine Gruppe nicht normalverteilt, wurde auf einen nicht-parametrischen Test zurückgegriffen.

Zur statistischen Analyse der Experimente zur antiviralen Wirksamkeit (7.1.3) wurde der Two-Way-ANOVA-Test verwendet. Dabei wurden die zwei Faktoren „Behandlung“ und „Zeit“ auf Signifikanz untersucht. Zusätzlich wurde auf eine Interaktion der beiden Faktoren untersucht. Vor der

Durchführung des Two-Way-ANOVA wurde mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung untersucht. Waren die Daten eines Experiments lognormal verteilt, wurden sie entsprechend der Empfehlung von Graphpad Prism 9 [184] mit dem 10er-Logarithmus zu normalverteilten Daten transformiert. Im Rahmen der Logarithmierung war es notwendig Zahlenwerte = 0 mit einem Zahlenwert >0 zu ersetzen. Dieser Austausch beeinträchtigt die Genauigkeit der Daten nicht, weil die Zahl 1 unter dem sogenannten „Detection Limit“ von 10 PFU/ml liegt. Das Detection Limit ergibt sich aus der Methodik des Plaque-Assay und der Berechnung der PFU/ml. Bei der ersten Verdünnungsstufe 1×10^{-1} und einem ausgezählten Plaque, ergeben sich nach der Formel zur Berechnung der PFU/ml elf Plaques pro Milliliter. Demnach wird eine Anzahl von 0 bis 10 PFU/ml von dem Experiment nicht erkannt und ist gleichbedeutend mit 0 PFU/ml. Es ist demnach möglich einen Zahlenwert von 0-9 einzusetzen, ohne die Aussagekraft des Experiments maßgeblich zu beeinflussen. Wichtig ist aber, dass immer derselbe Zahlenwert eingesetzt wird. In dieser Arbeit wurde hierfür der Zahlenwert 1 gewählt.

Resultate mit einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ wurden als signifikant gewertet.

7. Ergebnisse

7.1. Infektionsexperimente

7.1.1. Übersicht Infektionsexperimente

Eine der zentralen Fragestellungen dieser Arbeit war, ob die Infektion von murinen Lungenzellen mit MHV-68 die Genexpression von IFNL und dem IFNL-Rezeptor beeinflusst. Im Rahmen der Infektionsexperimente wurden murine Lungenepithelzellen und murine Alveolarmakrophagen in Einzel- und Co-Kultur mit MHV-68 infiziert und anschließend auf die Expression von IFNL oder IFNL-Rezeptor untersucht. Außerdem wurden mRNA-Proben aus MHV-68-infizierten Lungen von C57BL/6-Mäusen untersucht. Die Genexpression wurde mittels qRT-PCR quantifiziert und graphisch dargestellt. Für die Interpretation der PCR-Ergebnisse wurde ein Wert von $\leq 0,5$ -fach und von ≥ 2 -fach im Verhältnis zur Negativkontrolle als relevante Regulation angesehen.

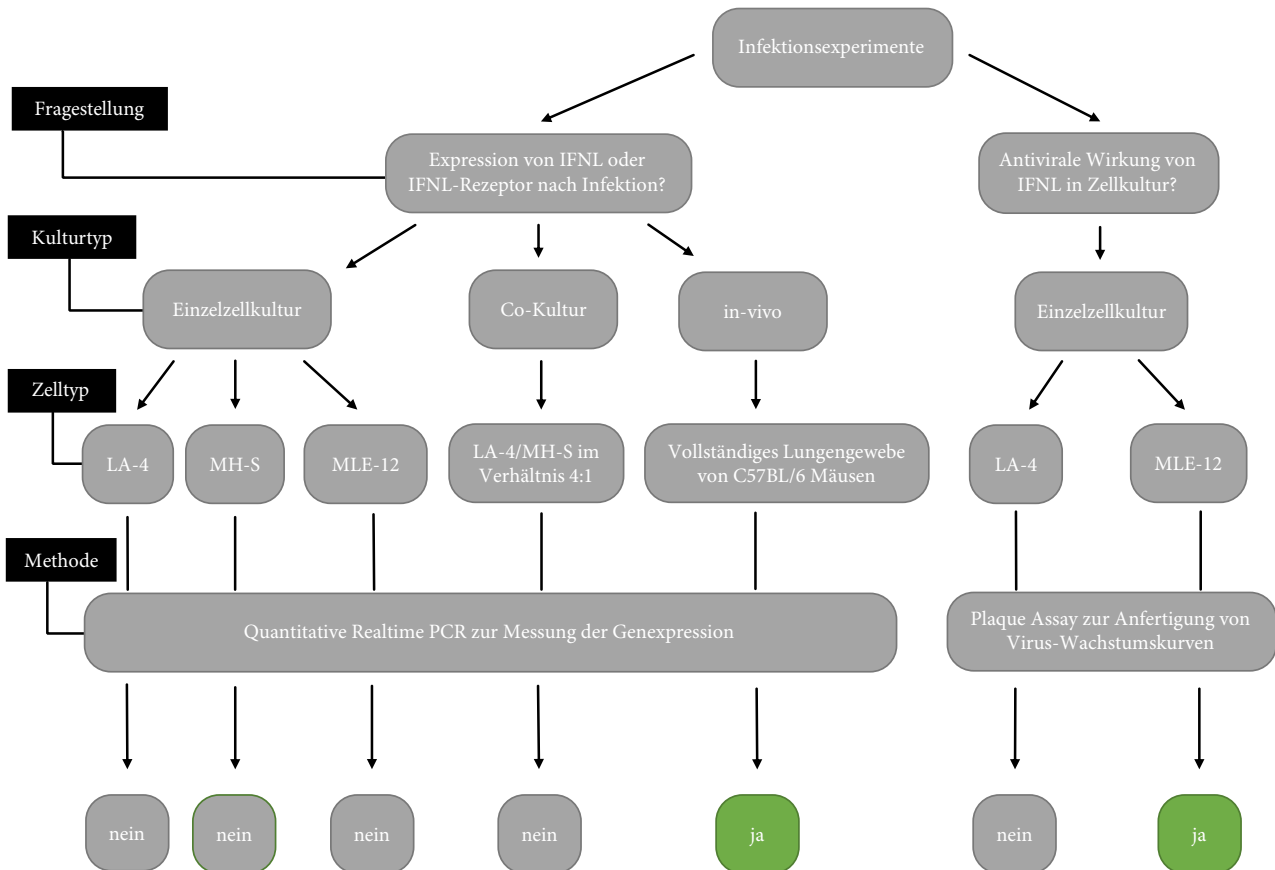


ABBILDUNG 8: FLUSSDIAGRAMM DER INFEKTIONSEXPERIMENTE

Gezeigt ist der Ablauf der Infektionsexperimente, die sich in zwei zentrale Fragestellungen gliedern lassen. Weiß auf schwarz sind die Oberbegriffe der einzelnen Zeilen, Fragestellung, Kulturtyp, Zelltyp und Methode aufgelistet. Die letzte Zeile beantwortet mit „ja“ oder „nein“ die initiale Fragestellung unter Berücksichtigung der statistischen Analyse. Nur statistisch signifikante Ergebnisse erhielten das Attribut „ja“.

Die zweite Fragestellung der Infektionsexperimente war, ob IFNL eine antivirale Wirkung in Zellkultur besitzt. Mithilfe von sogenannten „Plaque-Assays“ wurde die Virusreplikation anhand der Bildung von sogenannten „Plaque-Forming-Units“ (PFU) quantitativ bestimmt und als Virus-Wachstumskurven graphisch dargestellt.

7.1.2. Analyse der Genexpression nach Infektion mit MHV-68

Die ersten Experimente dieser Arbeit stellen die Infektion einzelner Zelltypen in vitro und die anschließende Quantifizierung der Genexpression dar. Die untersuchten Gene sind in TABELLE 13 aufgelistet.

In der Maus kodieren vier verschiedene Gene für Interferon lambda. Interessanterweise sind davon nur IFNL2 und IFNL3 funktional. Diese beiden Gene wurden in dieser Arbeit repräsentativ für die murine IFNL-Familie untersucht. Die Genloci von IFNL2 und IFNL3 grenzen direkt aneinander, sodass nur ein Primerpaar verwendet werden muss [154].

Zusätzlich wurden zwei Gene der Typ-I-Interferone, Interferon-alpha und Interferon-beta, als Positivkontrolle verwendet. Im Rahmen der MHV-68-Infektion ist zu erwarten, dass im Rahmen der zellulären Virusabwehr Typ-I-Interferone erhöht exprimiert werden [82], [185]–[187]. Werden die Gene für die Typ-I-Interferone nach Infektion erhöht exprimiert, kann somit davon ausgegangen werden, dass MHV-68 eine antivirale Reaktion in den Zellen auslöst. Im Kontext der antiviralen Aktivität der Zellen wurde die Expression von IFNL2/3 und der Typ-I- und Typ-III-Interferon-Rezeptoruntereinheiten IL28Ra und IFNaR1 untersucht. Die Gene für IL28Ra und IFNaR1 wurden in die Genexpressionsanalyse miteinbezogen, weil die Regulation der Rezeptorexpression eines Zytokins zusätzliche Erkenntnisse über dessen biologische Wirksamkeit liefern kann. Beispielsweise kann eine erhöhte oder erniedrigte Rezeptorexpression trotz konstanter Zytokinexpression eine Veränderung der biologischen Aktivität eines Zytokins bedeuten.

Gen	Bezeichnung	Funktion
IFNL2/3	Interferon lambda 2 & 3	Gen für IFNL 2 und IFNL 3
IL28Ra	Interleukin-28-Rezeptor-alpha oder IFNLR1	Untereinheit des IFNL-Rezeptors
IFNa5	Interferon-alpha-5	Gen für eine Interferon-alpha-Untereinheit
IFNβ	Interferon-beta	Gen für Interferon-β
IFNaR1	Interferon-alpha-Rezeptor-1	Rezeptoruntereinheit für Interferon alpha und beta

TABELLE 13: UNTERSUCHTE GENE DER INFektionSEXPERIMENTE

Abgebildet ist jeweils der Name für das Gen, alternative Bezeichnungen und dessen Funktion. Die Primer der hier gelisteten Gene sind in TABELLE 5 aufgelistet.

7.1.2.1. Einzelzellkulturen

Wie in 3.2.1.3 erläutert, geht man davon aus, dass IFNL vor allem in epithelzellreichen Organen eine Rolle spielt. Deswegen wurden hier die murinen Lungeneithellzellen LA-4 und MLE-12 für die Infektionsexperimente verwendet. Daneben wurden auch murine Alveolarmakrophagen in Einzelzellkultur infiziert und deren Genexpression ausgewertet. Grund hierfür ist, dass Makrophagen sowohl im Rahmen des Infektionsprozesses mit MHV-68 als auch in der Interferon-vermittelten Virusabwehr eine wichtige Rolle spielen (siehe: 3).

7.1.2.1.1. Durchführung Einzelzellkultur

Für die Infektionsexperimente in Einzelzellkultur wurden die Zellen zunächst geerntet und gezählt. Dabei wurden für jedes Experiment circa 50.000 Zellen mit einem Milliliter Medium in ein Well gegeben. Sieben Wells stellten die Zeitpunkte „0h, 1h, 2h, 4h, 8h, 24h und 48h“ nach Virusinfektion dar. „0h“ bedeutete, dass die Zellen direkt im Anschluss an die Infektion geerntet wurden. Ein Well wurde

nicht mit MHV-68 infiziert und diente als Negativkontrolle „neg“. Nach 24h waren die Zellen adhärent und die Infektion mit MHV-68 konnte durchgeführt werden. Dabei wurde mit einer MOI von 1 infiziert. Für die Infektion wurde zunächst das Zellmedium abgesaugt, dann 1ml Virussuspension auf die entsprechenden Wells gegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Negativkontrolle wurde in diesem Schritt mit Medium ohne Virus behandelt. Anschließend wurde die Virussuspension abgesaugt, 1ml Medium zugegeben und erneut bei 37°C inkubiert. Für die Negativkontrolle erfolgten identische Arbeitsschritte, allerdings ohne Virus. Die Ernte erfolgte nach dem jeweiligen, oben genannten Zeitraum. Die Negativkontrolle wurde zum Zeitpunkt „0h“ geerntet. Die flüssigen Bestandteile der Zellsuspension wurden mittels Zentrifugation von den Zellen getrennt. Zellen und flüssiger Überstand wurden bei -80°C aufbewahrt.

7.1.2.1.2. Ergebnisse Einzelzellkultur (ABBILDUNG 9)

Die Expression der Gene für IFN-alpha und IFN-beta war in **LA-4** nach MHV-68 Infektion erhöht. Die Hochregulation des Gens für IFN-alpha erreichte 48h nach Infektion den Maximalwert von 9,23-fach im Vergleich zur Positivkontrolle und war statistisch signifikant ($p=0,0243$). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Virusinfektion eine antivirale Reaktion der Zellen verursacht hat. Im Vergleich zu IFN-alpha fiel die Induktion von IFN-beta durch MHV-68 geringer aus. So war IFN-beta 24h nach Infektion nur 1,93-fach hochreguliert. Die Expression von IFNL und dem IFNL-Rezeptor lag teilweise unter dem 0,5-fachen der Negativkontrolle. In der statistischen Analyse ergab sich jedoch keine Signifikanz, sodass nicht von einer relevanten Regulation ausgegangen werden kann.

In **MH-S** schienen die Gene für IFN-alpha, IFN-beta und IFNL nach Infektion hochreguliert zu sein. Die Expression von IFNL schien relevant erhöht und erreichte 24h nach Infektion den Maximalwert von 7,04-fach im Vergleich zur Negativkontrolle. Allerdings ergab die statistische Analyse aller in **MH-S** untersuchten Gene aufgrund der hohen Standardabweichungen keine Signifikanz.

In einem ersten Testexperiment wurden die murinen Lungenepithelzellen **MLE-12** analog zu den oben beschriebenen Infektionsexperimenten untersucht. Hier zeigten sich jedoch keine relevanten Unterschiede im Vergleich zu **LA-4**.

7.1.2.2. Co-Kultur LA-4 und MH-S

Die Blut-Luft-Schranke der Lunge besteht hauptsächlich aus alveolären Epithelzellen und Makrophagen. In vitro-Forschungsarbeiten zeigen, dass alveoläre Epithelzellen und Makrophagen in Co-Kultur einen bedeutenden Mehrwert im Vergleich zur Monokultur liefern [188], [189]. Grund hierfür sind vermutlich Wechselwirkungen zwischen den unterschiedlichen Zelltypen der Co-Kultur, die eine bessere Imitation des Lungenepithels in vivo ermöglicht [190].

In der Annahme, dass die Infektion von **LA-4** und **MH-S** in Co-Kultur zusätzliche Erkenntnisse zur Monokultur der beiden Zelltypen liefern könnte, wurde ein Co-Kultur-Infektionsexperiment durchgeführt.

7.1.2.2.1. Durchführung Co-Kultur

Für das Co-Kultur-Experiment wurde ein Verhältnis von **LA-4** zu **MH-S** von 4:1 gewählt. Dabei wurden in jedes Well ca. 120.000 **LA-4** und ca. 30.000 **MH-S** mit 2ml Medium gegeben. Als Co-Kulturmedium wurde RPMI mit 20% FCS verwendet. Die Aussaat der Zellen und der Infektionsprozess verlief nach dem Protokoll der oben erläuterten Durchführung (7.1.2.1.1.).

7.1.2.2.2. Ergebnisse Co-Kultur (ABBILDUNG 10)

Das Gen von Interferon- β war 4h nach Infektion 8,28-fach im Vergleich zur Negativprobe hochreguliert. Die Virusinfektion schien demnach auch in Co-Kultur eine zelluläre Genregulation zu verursachen.

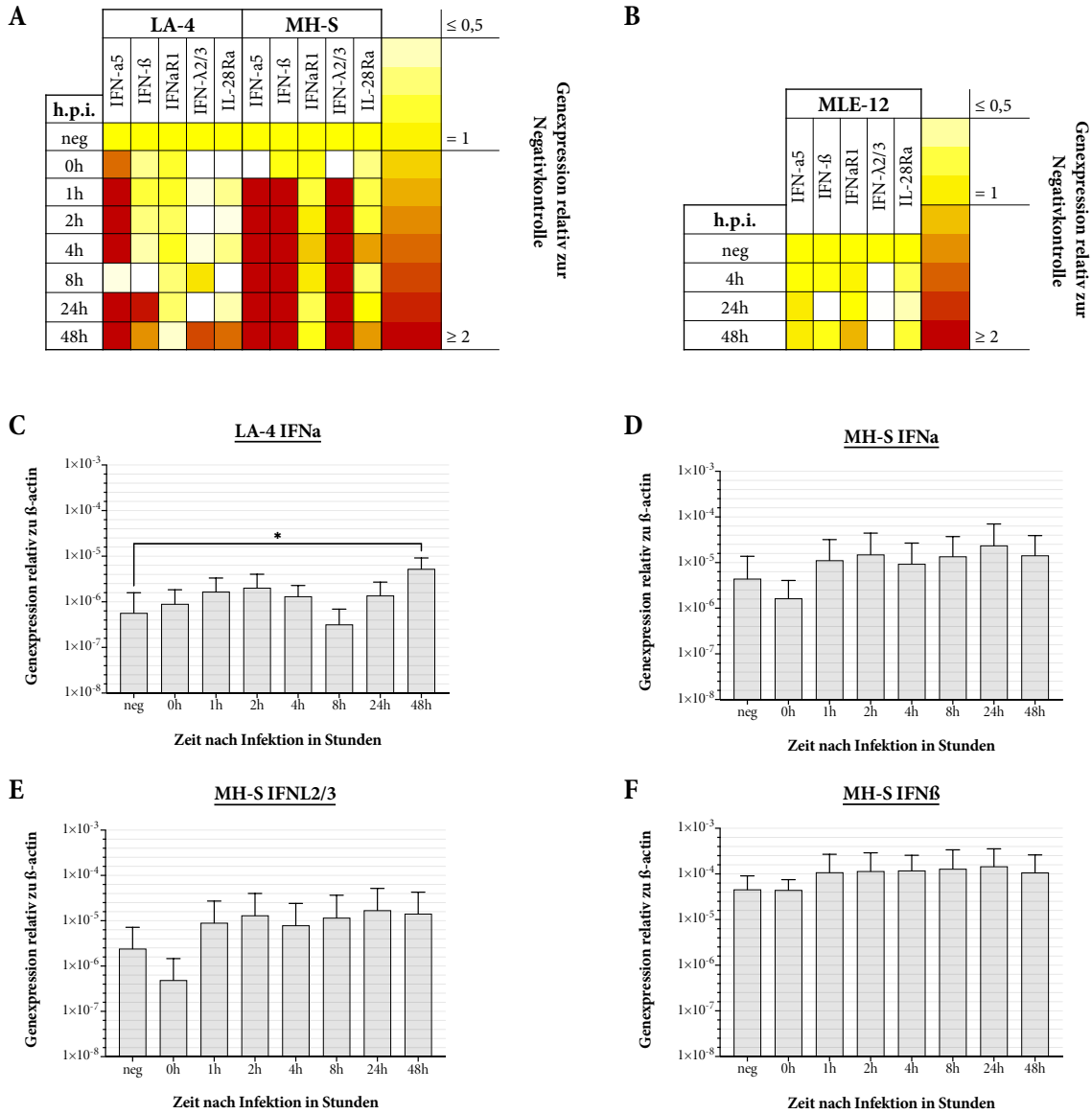


ABBILDUNG 9: GENEXPRESSION VON LA-4, MH-S UND MLE-12 NACH INFESTION MIT MHV-68

A Heatmap der Einzelzellkulturrexperimente mit LA-4 und MH-S von vier unabhängigen Experimenten. Farblich kodiert ist die relative Genexpression im Vergleich zur Negativkontrolle „neg“ des jeweiligen Experiments. Der Farbbereich stellt die relative Genexpression von 0,5-fach bis 2-fach im Vergleich zur Negativkontrolle dar. Als relevante Expressionsregulation wurden Werte $\leq 0,5$ und Werte ≥ 2 angesehen. Werte $\leq 0,5$ erscheinen weiß, Werte ≥ 2 erscheinen rot und Werte = 1 erscheinen gelb. B Heatmap des Einzelzellkulturrexperiments mit MLE-12 (n=1). C-F Zeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Genexpression von vier unabhängigen Experimenten mit LA-4 und MH-S. C Expression von IFN α in LA-4 0h, 1h, 2h, 4h, 8h, 24h und 48h nach Infektion (*: P=0,0243). D-F analog zu C.

IFNL schien in diesem Experiment nicht reguliert zu sein. Das niedrige Expressionsniveau im Bereich von 1×10^{-8} bis 1×10^{-7} stützt diese Annahme. Für die weiteren Gene zeigte sich keine relevante Regulation. In der Annahme, dass Wiederholungen dieses Experiments keine zusätzlichen Erkenntnisse liefern würden, wurden keine weiteren Co-Kultur-Experimente durchgeführt.

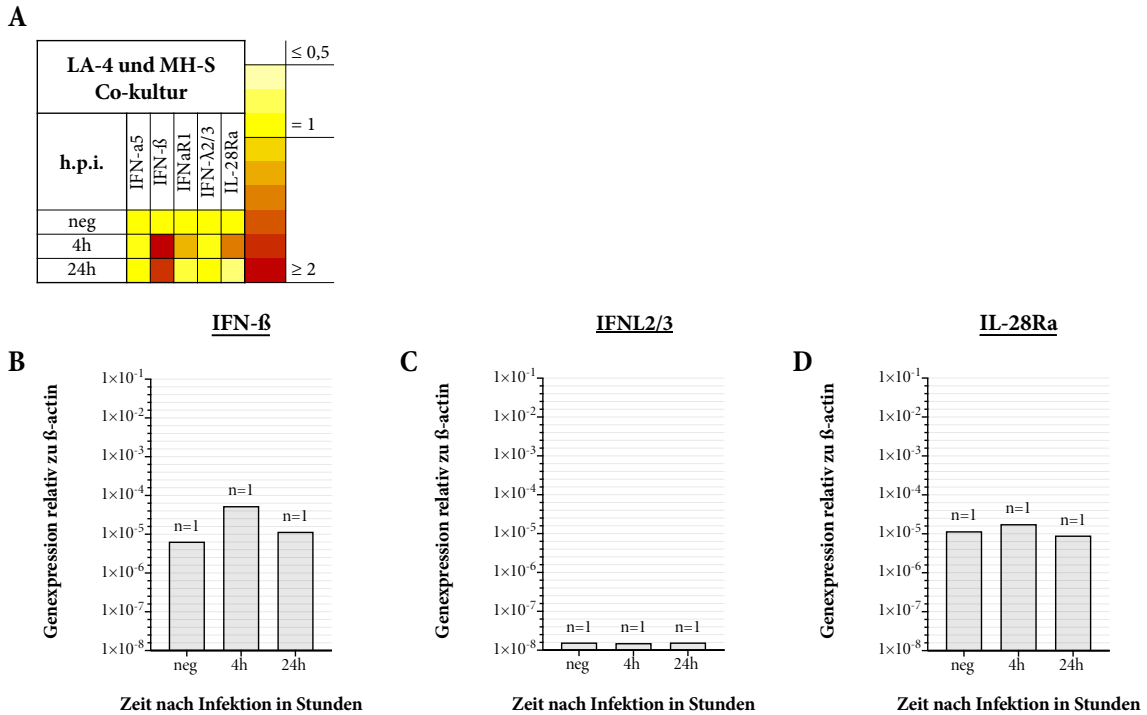


ABBILDUNG 10: GENEXPRESSION VON LA-4 UND MH-S IN CO-KULTUR NACH INFEKTION MIT MHV-68
A Heatmap des Co-Kultur-Experiments (n=1) mit LA-4 und MH-S. Farblich kodiert ist die relative Genexpression im Vergleich zur Negativkontrolle „neg“ des jeweiligen Experiments. Der Farbbereich stellt die relative Genexpression von 0,5-fach bis 2-fach im Vergleich zur Negativkontrolle dar. Als relevante Expressionsregulation wurden Werte $\leq 0,5$ und Werte ≥ 2 angesehen. Werte $\leq 0,5$ erscheinen weiß, Werte ≥ 2 erscheinen rot. **B-D** Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Genexpression von IFN- β , IFNL und IL28Ra 4h und 24h nach Infektion mit MHV-68 in einem (n=1) Experiment mit LA-4 und MH-S in Co-Kultur.

7.1.2.3. In vivo Lungengewebe

Neben den in vitro-Experimenten wurde die Expression von Interferon lambda nach Infektion mit MHV-68 auch in vivo untersucht. Wie in 3.2.1.3 beschrieben, wird angenommen, dass IFNL bei der Fibrose verschiedener Organe, wie der Leber und der Niere eine Rolle spielt. Demnach stellte sich die Frage, ob die Infektion von Lungenparenchym in vivo einen Hinweis auf die Rolle von IFNL im Rahmen der MHV-68-Infektion und der MHV-68-induzierten Lungenfibrose liefern könnte.

7.1.2.3.1. Durchführung in vivo Lungengewebe

Für das in vitro -Experiment wurde auf bereits isolierte mRNA aus homogenisiertem Lungengewebe von C57BL/6 Mäusen zurückgegriffen. Die Infektion der Mäuse mit MHV-68 und die Aufbereitung der mRNA-Proben wurde von Martin Strehle und Shinji Ohno aus der AG Adler durchgeführt. Die molekularbiologische Methodik zur Darstellung der Genexpression mittels qRT-PCR wurde bereits in 6.3.3 erklärt. Wie oben beschrieben stammte die mRNA aus zwei unterschiedlichen Reihen von

Experimenten. Im ersten Experiment wurden Wildtyp-Mäuse mit 50.000 PFU MHV-68 infiziert. Die Mäuse wurden an Tag 3 und Tag 5 nach Infektion geerntet, die Lungen entnommen und homogenisiert. Im zweiten Experiment wurden zwei Gruppen von Mäusen infiziert. Wildtyp-Mäuse (WT) und Interferon-gamma-Rezeptor-Knockout-Mäuse (IFN γ RKo). IFN γ RKo-Mäuse sind genetisch veränderte C57BL/6-Mäuse, deren Zellen nicht in der Lage sind, den Interferon-gamma-Rezeptor zu bilden. Wie in 3.3.7 beschrieben, bilden IFN γ RKo-Mäuse nach MHV-68-Infektion eine Lungenfibrose aus und eignen sich daher für diese Arbeit als in vivo-Modell. Im zweiten Experiment wurden nicht-infizierte Mäuse an Tag 20 und Tag 63 sowie infizierte Mäuse an Tag 14, Tag 54 und Tag 100 nach Infektion geerntet. Auch die mRNA des zweiten Experiments wurde mittels qRT-PCR analysiert.

7.1.2.3.2. Ergebnisse in vivo Lungengewebe (ABBILDUNG 11)

Das Gen von IFNL war nach drei und fünf Tagen deutlich hochreguliert. An Tag 3 nach Infektion war IFNL im Verhältnis zur Negativprobe um das 16,3-fache hochreguliert, an Tag 5 um das 29,6-fache. Eine statistische Analyse wurde aufgrund der geringen Anzahl an Wiederholungen des Experiments nicht durchgeführt. Jedoch waren die Standardabweichungen der beiden Zeitpunkte verhältnismäßig gering, sodass ein drittes Experiment vermutlich ähnliche Ergebnisse erzielt hätte.

Das Gen für IL28Ra zeigte keine relevante Regulation an Tag 3 und Tag 5 nach Infektion mit MHV-68. An den Tagen 14, 54 und 100 nach Infektion zeigte sich eine relevant verminderte Expression von IFNL in den IFN γ RKo-Mäusen. An Tag 14 war die Expression von IFNL um das 0,35-fache, an Tag 54 um das 0,43-fache und an Tag 100 um das 0,29-fache im Vergleich zur Negativkontrolle erniedrigt. Hier ist zu beachten, dass zur übersichtlicheren graphischen Darstellung die Genexpression im Verhältnis zum Mittelwert der beiden Negativproben (weiß auf schwarz) gezeigt wird. In der statistischen Analyse mittels Two-Way-ANOVA wurden beide Negativproben separat berücksichtigt. Dabei ergab sich keine statistische Signifikanz für die Regulation von IFNL an Tag 14, Tag 54 und Tag 100 nach Infektion mit MHV-68 in IFN γ RKo-Mäusen.

Das Gen für IL28Ra zeigte an den Tagen 14, 54 und 100 nach Infektion keine relevante Regulation im Sinne der hier festgelegten Schwellenwerte. Trotzdem wurde ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Tag 54 und Tag 100 der Wildtyp-Mäuse festgestellt. Zwischen den beiden Tagen ergibt sich ein Anstieg der Genexpression um das 2,1-fache, von 0,62-fach auf 1,31-fach im Vergleich zur Negativprobe. Vermutlich hat diese leichte Expressionssteigerung aber keine biologische Relevanz.

7.1.3. Antivirale Wirksamkeit von IFNL

Neben der Analyse der MHV-68-induzierten Genexpression in murinen Lungenepithelzellen und Alveolarmakrophagen wurde die antivirale Wirksamkeit von IFNL untersucht. Wie in 3.2.1.3 erläutert entfaltet IFNL insbesondere in epithelzellreichen Organen wie der Lunge seine Wirkung. Mit diesem Hintergrund wurde in dieser Arbeit die antivirale Wirksamkeit von IFNL auf die Replikation von MHV-68 in murinen Lungenepithelzellen mithilfe von sogenannten Plaque-Assays untersucht. Eine Erläuterung dieser Methode findet sich in 6.4.2.

7.1.3.1. Durchführung „antivirale Wirksamkeit von IFNL“

Für Untersuchung der antiviralen Wirksamkeit von IFNL wurden die murinen Lungenepithelzelltypen LA-4 und MLE-12 verwendet.

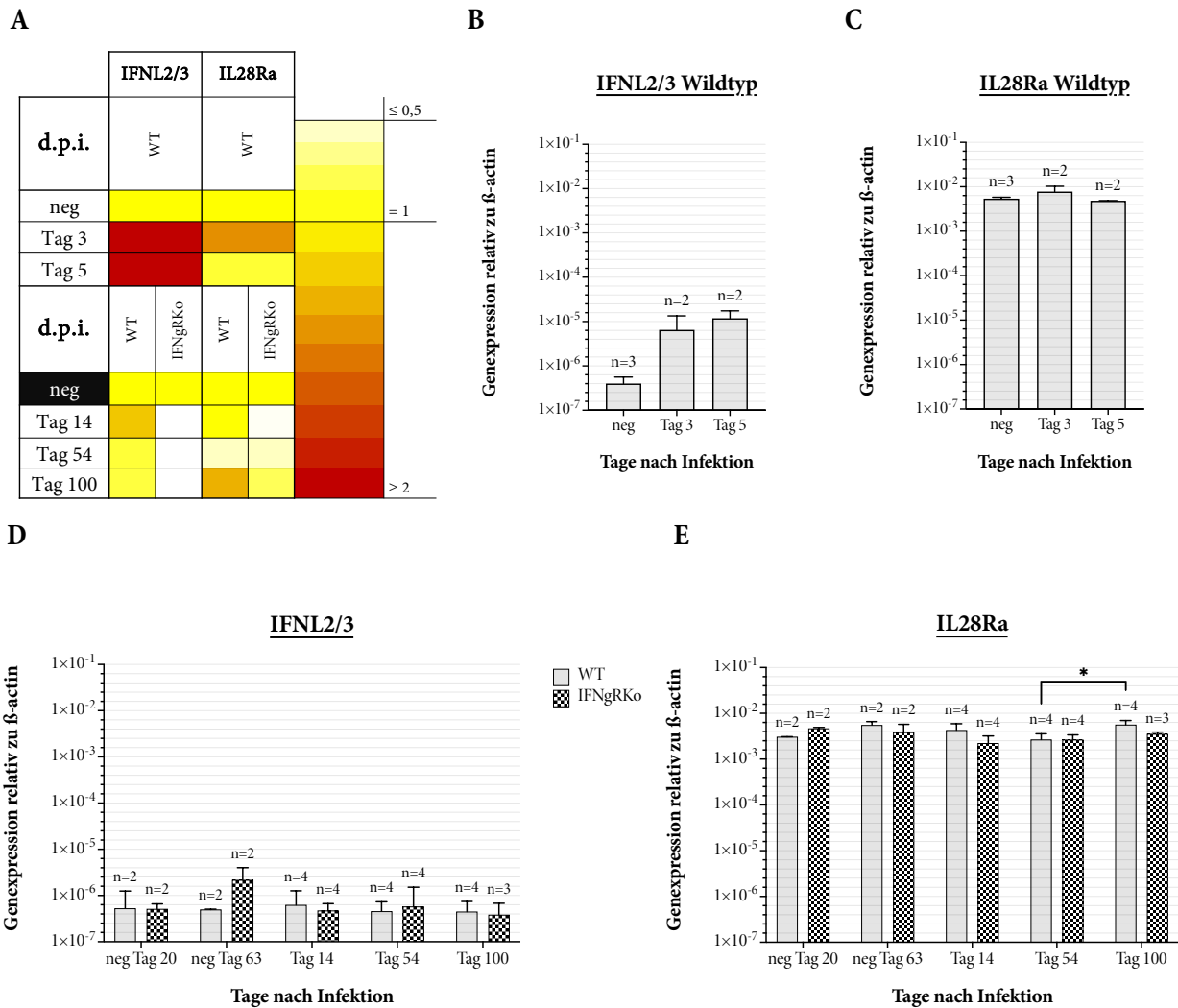


ABBILDUNG 11: EXPRESSION VON IFNL UND IL28RA IN WILDTPY-UND IFNGRKO-MÄUSEN NACH INFEKTION MIT MHV-68

A Heatmap der in vivo-Experimente von C57BL/6 Mäusen. Es wurden Wildtyp-Mäuse („WT“) und Interferon-gamma-Rezeptor-Knockout-Mäuse („IFNgRKO“) untersucht. Farblich kodiert ist die relative Genexpression im Vergleich zur Negativkontrolle „neg“ des jeweiligen Experiments. Der Farbbereich stellt die relative Genexpression von 0,5-fach bis 2-fach im Vergleich zur Negativkontrolle dar. Als relevante Expressionsregulation wurden Werte $\leq 0,5$ und Werte ≥ 2 angesehen. Werte $\leq 0,5$ erscheinen weiß, Werte ≥ 2 erscheinen rot. Die schwarz hinterlegten „neg“-Werte stellen den Mittelwert der 2 Negativproben von Tag 20 und Tag 63 dar, die annähernd gleiche Werte zeigten. Zur übersichtlicheren graphischen Darstellung wurden die zwei Negativproben zusammengefasst. **B-C** Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Genexpression von IFNL und IL28Ra nach drei und fünf Tagen in Wildtyp-Mäusen. Es wurden drei (n=3) bzw. zwei (n=2) unabhängige Experimente durchgeführt. **D-E** Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Genexpression von IFNL und IL28Ra 14, 54 und 100 Tage nach Virusinfektion in Wildtyp- und IFNgRKO-Mäusen. Je nach Gruppe wurden 2, 3 oder 4 unabhängige Experimente durchgeführt. **E** Expression von IL28Ra nach 14, 54 und 100 Tagen in Wildtyp- und IFNgRKO-Mäusen. Die Balkenmarkierung bezieht sich auf den statistisch signifikanten Unterschied der IL28Ra-Expression in zwischen Tag 54 und Tag 100 Wildtyp-Mäusen (*: $P=0,0237$).

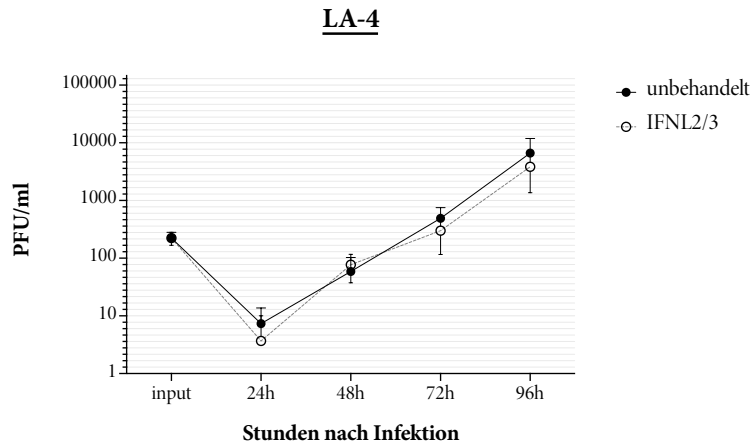
Einen Tag vor der Stimulation mit IFNL wurden die Zellen geerntet und ausgezählt. Dann wurden die Zellen in 1ml Zellsuspension und einer Konzentration von 50.000 Zellen/ml Medium in je zwei Wells pro Platte gegeben. Jede Platte enthielt ein Well für die Stimulation mit IFNL und ein Well, das nicht behandelt wurde.

Am Folgetag wurden die Wells entweder mit je 12,5ng/ml IFNL2 und IFNL3 in Kombination oder mit dem entsprechenden Volumen IFNL-Trägerlösung ohne Zytokin behandelt. Nach 6h IFNL-Vorbehandlung wurden die Zellen mit einer MOI von 0,01 mit MHV-68 infiziert. Für die Infektion wurde zunächst das IFNL-haltige Medium entfernt und bei 4°C aufbewahrt. Dann wurde 500µl Virussuspension in jedes Well gegeben und bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Die übrig gebliebene Virussuspension wurde bei -80°C als sogenannte „Input-Kontrolle“ aufbewahrt. Nach einer Stunde wurde die Virussuspension entfernt und die Wells zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen. Anschließend wurde 1ml der bei 4°C aufbewahrten IFNL-Suspension auf die Zellen gegeben und bei 37°C inkubiert. Nach 24h, 48h, 72h und 96h (oder 120h) wurden die entsprechenden Platten aus dem Inkubator genommen und bei -80°C eingefroren. Um das Virus aus den Zellen freizusetzen, wurden die Zellen vor dem Plaque-Assay insgesamt zweimal eingefroren und wieder aufgetaut. Dieser Prozess wurde auch mit der Input-Kontrolle durchgeführt, weil sich bei jedem Einfriervorgang die Viruskonzentration reduziert. Anschließend wurde mit den Schritten des Plaque-Assay fortgefahren.

7.1.3.2. Ergebnisse antivirale Wirksamkeit von IFNL (ABBILDUNG 12)

Für LA-4 zeigte sich im Zeitverlauf für die behandelte und für die unbehandelte Gruppe ein Anstieg der PFU/ml. Die sogenannten Plaque-Forming-Units sind ein Maß für die Anzahl infektiöser Virionen. Der Anstieg der PFU/ml im Zeitverlauf zeigte die zunehmende Anzahl von infektiösen Virionen im Rahmen der Virusreplikation. Die input-Kontrolle stellte die Viruskonzentration der unverdünnten Virussuspension zum Zeitpunkt der Infektion dar. Im Vergleich zwischen der behandelten und der unbehandelten Gruppen stellte sich heraus, dass beide Gruppen annähernd gleiche Viruskonzentrationen aufweisen. Somit ist davon auszugehen, dass die Behandlung von LA-4 mit IFNL keine Reduktion der Virusreplikation von MHV-68 bewirkt. Diese Annahme bestätigte sich in der statistischen Analyse. Der Two-Way-ANOVA-Test zeigte keinen Unterschied zwischen der behandelten und der nicht-behandelten Gruppe ($p=0,442$). Für die Viruskonzentration im Zeitverlauf ergab sich dagegen ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Zeitpunkten ($p<1 \times 10^{-4}$). Obwohl die Behandlung keine Wirkung auf die Virusreplikation hatte, zeigte sich trotzdem, dass MHV-68 in LA-4 Zellen repliziert. Dies ist ein wichtiger Hinweis für alle Infektionsexperimente von LA-4 in dieser Arbeit.

A



B

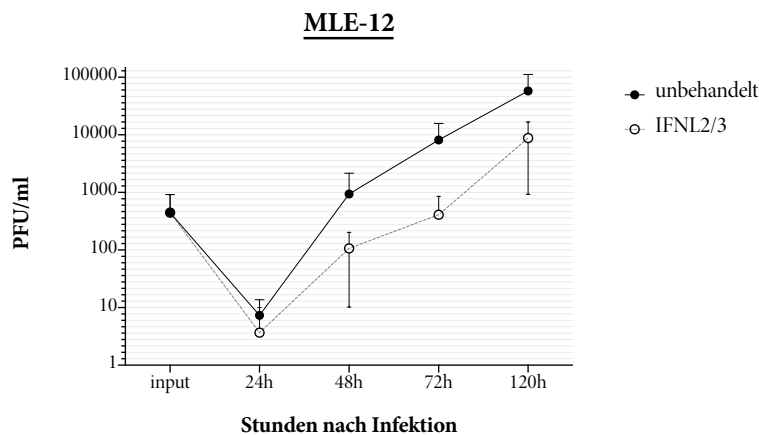


ABBILDUNG 12: DARSTELLUNG DER ANTIVIRALEN WIRKSAMKEIT VON IFNL IN LA-4 UND MLE-12

A Gezeigt werden die Mittelwerte und Standardabweichungen des Viruswachstums anhand der PFU/ml nach 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden. Zusätzlich wird die Viruskonzentration der Input-Kontrolle gezeigt. Es werden zwei Gruppen unterschieden; Die unbehandelte Gruppe als Negativkontrolle und die Gruppe, die mit IFNL 2 und IFNL 3 behandelt wurde. In der Two-Way-ANOVA ist $p=0,442$ für den Faktor Behandlung (also unbehandelt vs. IFNL2/3), für den Faktor Zeit ist $p<0,0001$. **B** analog zu A, jedoch wurde der Zeitpunkt 96h durch 120h ersetzt. - In der Two-Way-ANOVA gilt für den Faktor Behandlung $p=0,041$, für den Faktor Zeit ist $p=0,0003$.

Für MLE-12 zeigte sich ebenfalls ein Anstieg der PFU/ml im Zeitverlauf. Jedoch war die Viruskonzentration in der unbehandelten Gruppe deutlich höher als in der behandelten Gruppe. Hier ist die Reduktion der Viruskonzentration von MHV-68 durch die antivirale Wirkung von IFNL graphisch sehr gut erkennbar. Die statistische Analyse bestätigt diese Beobachtung. Der Two-Way-ANOVA-Test zeigt einen signifikanten Unterschied sowohl zwischen den beiden Gruppen ($p=0,041$) als auch zwischen den Zeitpunkten ($p=3 \times 10^{-4}$). Demnach kam es zu einer Virusreplikation und es konnte eine antivirale Wirkung von IFNL in MHV-68-infizierten MLE-12 nachgewiesen werden.

7.2. Stimulationsexperimente

7.2.1. Übersicht Stimulationsexperimente (ABBILDUNG 13)

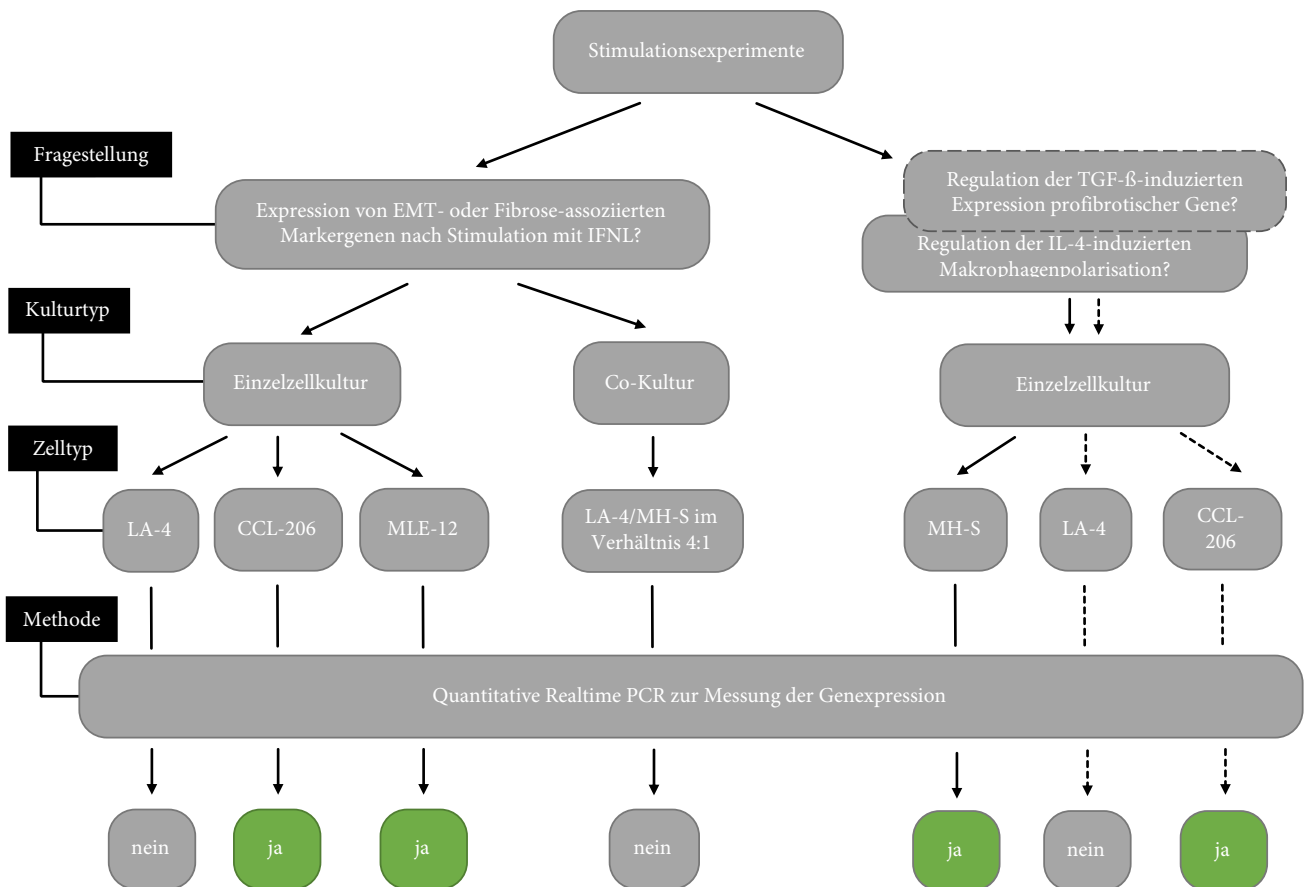


ABBILDUNG 13: FLUSSDIAGRAMM STIMULATIONSEXPERIMENTE

Gezeigt ist der Ablauf der Stimulationsexperimente anhand eines Flussdiagramms. Weiß auf schwarz sind die Oberbegriffe der einzelnen Zeilen, d.h. Fragestellung, Kulturtyp, Zelltyp und Methode aufgelistet. Die letzte Zeile beantwortet mit „ja“ oder „nein“ die initiale Fragestellung unter Berücksichtigung der statistischen Analyse. Nur statistisch signifikante Ergebnisse wurden mit „ja“ versehen. Rechts sind die Experimente zur Makrophagenpolarisation (durchgezogene Linien) und die Experimente zur Stimulation mit TGF-β aufgeführt (gestrichelte Linien). Hier wurden zweimal die Attribute „ja“ vergeben, obwohl noch keine statistische Analyse durchgeführt werden konnte. Grund hierfür ist, dass nur jeweils zwei Experimente durchgeführt wurden. Die Analyse der Genexpression aller Stimulationsexperimente erfolgte mittels qRT-PCR.

In dieser Serie von Experimenten wurden zunächst verschiedene Zelltypen in Einzelzellkultur und in Co-Kultur mit IFNL stimuliert und anschließend die Expression ausgewählter Gene analysiert. Ein besonderer Fokus lag dabei auf Genen, die bei EMT und Fibrose vermehrt exprimiert werden. Hierbei

sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen IFNL und der Synthese von extrazellulärer Matrix sowie der EMT aufgedeckt werden. Beide Mechanismen sind an der Entstehung der IPF beteiligt. Hierfür wurden unterschiedliche Zelltypen in Einzel- und Co-Kultur mit IFNL behandelt.

Zudem wurde untersucht, ob IFNL die durch das M2-Zytokin TGF-β ausgelöste Aktivierung profibrotischer Gene beeinflusst. Auch der Einfluss von IFNL auf die IL-4-induzierte Makrophagenpolarisation wurde überprüft.

Die Genexpression aller Stimulationsexperimente wurden mittels qRT-PCR analysiert und graphisch dargestellt. Für die Interpretation der qRT-PCR-Ergebnisse wurden Werte von ≤ 0,5-fach und von ≥ 2-fach im Verhältnis zur Negativprobe als relevante Regulation angesehen.

7.2.2. Einzelzellkulturexperimente

Wie in 3.2.1.3 erläutert, geht man davon aus, dass IFNL vor allem in epithelzellreichen Organen eine Rolle spielt. Die EMT und die Fibrose betreffen ebenfalls vor allem Epithelzellen und Fibroblasten der Lunge. Deswegen wurden die murinen Lungenepithelzellen LA-4 und MLE-12 und die murinen Lungenfibroblasten CCL-206 für die Stimulationsexperimente verwendet.

Gen	Bezeichnung	Funktion
USP18	Ubiquitin-Specific-Protease-18	Antivirale ISGs (Interferon-Stimulated-Genes), bei Virusinfektion vermehrt exprimiert, Positivkontrolle
IFI44	Interferon-Induced-Protein-44	
ISG15	Interferon-Stimulated-Gene 15	
RSAD2	Viperin	
E-Cadherin	Epitheliales Cadherin, E-Cad	Epithelialer Marker, ↓ bei EMT [24], [25]
N-Cadherin	Neuronales Cadherin, N-Cad	
Fibronectin	Fibronectin, Fn	Mesenchymale Marker, ↑ bei EMT [25], [191]
Vimentin	Vimentin, Vim	
Colla1	Collagen-1-a-1, Typ-1 Collagen	IPF-Fibroblasten exprimieren vermehrt
α-SMA	Alpha-Smooth-Muscle-Actin	Typ-1-Kollagen und alpha-SMA [38], [39]
Arginase-1	Arginase-1	↑ bei M2-Polarisation, Positivkontrolle
TGF-β1	Transforming-Growth-Factor-beta-1	↑ bei M2-Polarisation und Fibrose
TGF-β2	Transforming-Growth-Factor-beta-2	↑ bei M2-Polarisation und Fibrose

TABELLE 14: UNTERSUCHTE GENE DER STIMULATIONSEXPERIMENTE

Diese Tabelle zeigt die untersuchten Gene der Stimulationsexperimente. Hier wird der Name für das jeweilige Gen, alternative Bezeichnungen und dessen Funktion gezeigt. Die Primer der hier aufgelisteten Gene werden in TABELLE 5 gezeigt.

7.2.2.1. Durchführung Dosisfindungsexperimente

Zunächst wurden Experimente zur Bestimmung der geeigneten Dosis von IFNL 2 und IFNL3 durchgeführt. Dabei wurden LA-4 und CCL-206 mit 25ng, 12,5ng, 6,25ng, 3,125ng und 1,56ng IFNL stimuliert. Für jedes Gen wurde die Dosis mit dem höchsten Effekt auf die Genexpression ausgewählt und für sogenannte „Timecourse-Experimente“ herangezogen.

Die Zellen wurden geerntet und ausgezählt. Danach wurde eine Zellsuspension mit ca. 50.000 Zellen pro Milliliter Medium hergestellt und davon ein Milliliter in jedes Well gegeben. Für jedes Experiment wurde eine Negativkontrolle angelegt, die mit der Trägerlösung von IFNL behandelt wurde. 24h vor der Stimulation wurden die Zellen bei 37°C inkubiert. Am Folgetag waren die Zellen adhären und die Stimulation mit IFNL konnte durchgeführt werden. Dabei wurde die jeweilige Dosis IFNL in Suspension mit 250µl Medium auf die Zellen gegeben. Die Dosis von IFNL wurde dabei jeweils so gewählt, dass die finale Konzentration im Well jeweils 25ng/ml, 12,5ng/ml, 6,25ng/ml, 3,125 ng/ml und 1,56ng/ml betrug. Nach der Zugabe von IFNL wurde einige Male vorsichtig gemischt, um das Zytokin gleichmäßig im Well zu verteilen. Dabei wurde darauf geachtet die adhären Zellen nicht vom Boden des Wells zu lösen.

Die Ernte der Experimente zur Dosisfindung erfolgte nach 24h. Der Überstand der IFNL-Medium-Suspension wurde entnommen und bei -80°C gelagert. Das Zellpellet wurde durch Zentrifugation vom Rest der Flüssigkeit getrennt und ebenfalls bei -80°C gelagert. Anschließend wurde die mRNA der Zellen isoliert und für die qRT-PCR verwendet.

7.2.2.2. Durchführung Timecourse Experimente

„Timecourse“ bedeutet hier die Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Genexpression in Stunden nach Stimulation mit IFNL. Aufgrund der großen Varianz der Dosisfindungsexperimente wurde für die Timecourse-Experimente 25ng/ml als die Dosis mit der wahrscheinlich höchsten Wirksamkeit ausgewählt. In einigen Timecourse-Experimenten wurde zusätzlich mit IFNL2 und IFNL3 in Kombination stimuliert. Dabei wurden die Zellen für 48h mit jeweils 12,5ng/ml IFNL2 und IFNL3 behandelt. Dies ist in den Graphen durch die Bezeichnung „comb“ gekennzeichnet.

Die Timecourse-Experimente wurden mit LA-4, CCL-206 und MLE-12 durchgeführt, wobei für MLE-12 die gleiche Dosis wie für LA-4 verwendet wurde. Im Unterschied zu den Dosisfindungsexperimenten wurden für LA-4 nur E-Cadherin, N-Cadherin, Vimentin und Fibronectin untersucht und für CCL-206 nur Col1a1, Fibronectin und α -SMA (**TABELLE 14**). Diese Auswahl wurde in der Annahme getroffen, dass Epithelzellen vor allem bei der EMT und Fibroblasten vor allem bei der Bildung extrazellulärer Matrix (ECM) eine Rolle spielen. Zur Überprüfung der Funktionalität von IFNL wurden auch MH-S stimuliert und die Expression der ISGs IFI44 und USP18 gemessen.

Die Zellen wurden geerntet und ausgezählt. Danach wurde eine Zellsuspension mit ca. 50.000 Zellen pro Milliliter Medium hergestellt und davon ein Milliliter in jedes Well gegeben. Für jedes Experiment wurde eine Negativkontrolle angelegt, die mit der Trägerlösung von IFNL behandelt wurde. 24h vor der Stimulation wurden die Zellen bei 37°C inkubiert. Am Folgetag waren die Zellen adhären und die Stimulation mit IFNL wurde durchgeführt. Dabei wurde IFNL in Suspension mit 250 μ l Medium auf die Zellen gegeben. Die Dosis von IFNL wurde dabei jeweils so gewählt, dass die finale Konzentration im Well 25ng/ml betrug. Nach der Zugabe von IFNL wurde einige Male vorsichtig gemischt, um das Zytokin gleichmäßig im Well zu verteilen. Dabei wurde darauf geachtet, die adhären Zellen nicht vom Boden des Wells zu lösen.

Die Ernte der Timecourse-Experimente erfolgte nach den, für jedes Experiment individuell ausgewählten, Zeitpunkten im Bereich von 2h bis 96h nach Stimulation. Die Ernte der Negativkontrolle erfolgte nach 0h (direkt nach der Stimulation). Der Überstand der IFNL-Medium-Suspension wurde entnommen und bei -80°C gelagert. Das Zellpellet wurde durch Zentrifugation vom Rest der Flüssigkeit getrennt und ebenfalls bei -80°C gelagert.

Anschließend wurde die mRNA der Zellen isoliert und für die qRT-PCR verwendet.

7.2.2.3. Ergebnisse Dosisfindungsexperimente (ABBILDUNG 14 und ABBILDUNG 15)

Durch die Experimente zur Dosisfindung konnte für LA-4 keine relevante Regulation der untersuchten Gene festgestellt werden. Lediglich Fibronectin schien sowohl durch IFNL2 als auch durch IFNL3 in LA-4 leicht vermehrt exprimiert zu werden. Der höchste Wert bleibt hier IFNL2 und IFNL3 mit 1,57-facher und 1,6-facher Erhöhung unter dem Schwellenwert von 2-facher Expression. Interessanterweise wurde E-Cadherin nach IFNL-Stimulation scheinbar vermindert exprimiert. Dabei ergaben sich für IFNL2 minimal eine 0,2-fache und für IFNL3 minimal eine 0,31-fache Expression im Vergleich zur Negativkontrolle.

In der statistischen Analyse ist jedoch keine der untersuchten Genregulationen signifikant verändert. Somit muss davon ausgegangen werden, dass die gewählte Konzentration von IFNL in diesen Experimenten keinen Einfluss auf die Genexpression der hier untersuchten Gene hatte.

Als Positivkontrolle wurden in den Experimenten zur Dosisfindung auch die murinen Alveolarmakrophagen MH-S mit IFNL 2 und IFNL3 stimuliert und die Expression der Gene für IFI44 und für USP18 gemessen. Beide Gene kodieren für ISGs und sind im Rahmen der IFNL-vermittelten Immunantwort erhöht. Diese Erhöhung zeigte sich in den Experimenten zur Dosisfindung mit statistischer Signifikanz und kann damit als Beweis der Funktionalität des IFNL-Rezeptors auf MH-S gesehen werden.

IFI44 erreichte in MH-S durch Stimulation mit 25ng/ml IFNL 2 den Maximalwert von 3,11-fach im Vergleich zur Negativkontrolle. Durch Stimulation mit 12,5ng/ml IFNL3 wurde der Maximalwert für IFNL3 mit einer 3,10-facher Erhöhung im Vergleich zur Negativkontrolle erreicht.

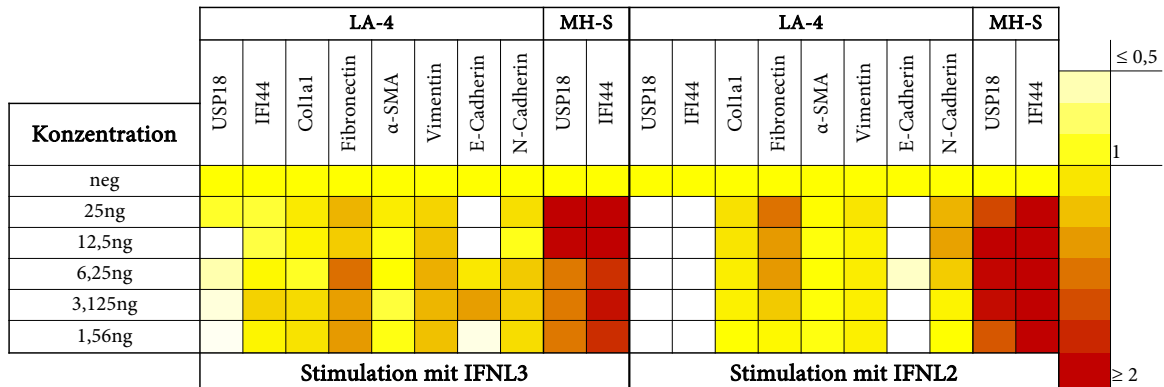
USP18 war durch Stimulation mit 12,5ng/ml IFNL2 maximal um das 2,2-fache erhöht. Die Stimulation mit IFNL2 und IFNL3 zeigte in LA-4 keine statistische Signifikanz.

Im Hinblick auf die Ergebnisse der Positivkontrollgene kann davon ausgegangen werden, dass die Stimulation mit IFNL 2 und INFL 3 funktionierte. Die fehlende Reaktion von LA-4 kann nicht anhand der fehlerhaften Durchführung dieses Experiments oder einer gestörten Funktionalität des Zytokins erklärt werden. Die Vermutung, dass LA-4 keine oder zu wenige funktionale IFNL-Rezeptoren auf der Zelloberfläche ausbildet wurde durch die später durchgeführte FACS-Analyse bestätigt (siehe 7.3).

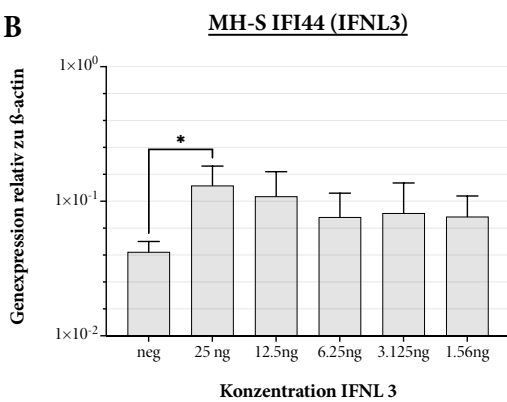
Die Experimente zur Dosisfindung wurden in gleicher Weise auch mit CCL-206 Zellen durchgeführt (**ABBILDUNG 15**). Dabei ergaben sich nur für die Expression von E-Cadherin signifikante Unterschiede zur Negativprobe. Nach Stimulation mit 1,56ng IFNL2 war E-Cadherin signifikant um das 4,8-fache und nach Stimulation mit 3,125ng IFNL3 um das 4,96-fache erhöht.

Dieses Ergebnis könnte ein Hinweis für die MET sein, weil während diesem Prozess E-Cadherin in der Regel vermehrt exprimiert wird. Dieser Zusammenhang wird in **8.2.1.1** im Detail diskutiert.

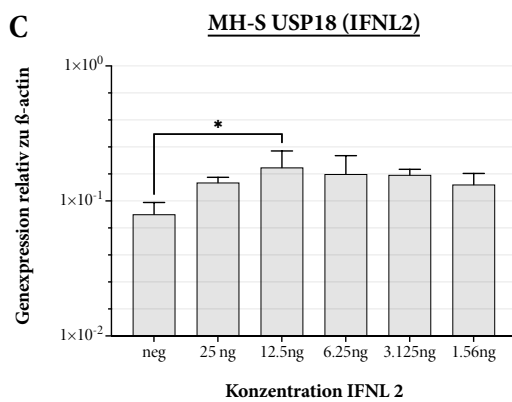
A



B



C



D

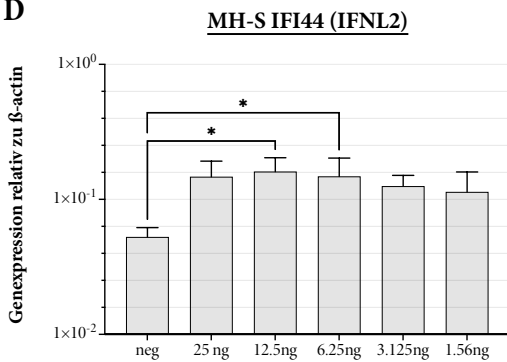
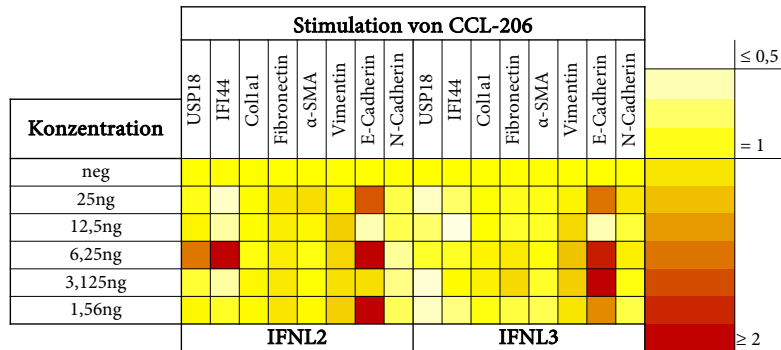


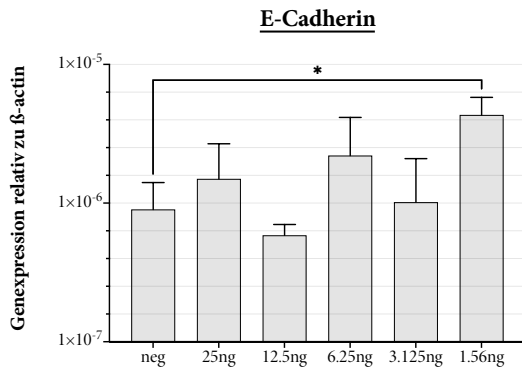
ABBILDUNG 14: DOSISFINDUNG VON IFNL2 UND IFNL3 IN LA-4 UND MH-S

A Heatmap der Einzelzellkulturexperimente von jeweils vier unabhängigen Experimenten mit LA-4 und MH-S zur Dosisfindung. Farblich kodiert ist die relative Genexpression im Vergleich zur Negativkontrolle „neg“ des jeweiligen Experiments. Der Farbbereich stellt die relative Genexpression von 0,5-fach bis 2-fach im Vergleich zur Negativkontrolle dar. Als relevante Expressionsregulation wurden Werte $\leq 0,5$ und Werte ≥ 2 angesehen. Werte $\leq 0,5$ erscheinen weiß, Werte ≥ 2 erscheinen rot. **B-D** Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils vier unabhängigen Experimenten. Die statistisch signifikanten Expressionsregulationen wurden mit Balken und Sternchen markiert. **B** Expression von IFI44 nach Stimulation von MH-S mit IFNL3 ($p = 0,0409$). **C** Expression von USP18 nach Stimulation von MH-S mit IFNL2 ($p = 0,0292$). **D** Expression von IFI44 nach Stimulation von MH-S mit IFNL2 (neg vs. 12,5ng: $p = 0,0249$ und neg vs. 6,25ng: $p = 0,0497$).

A



B



C

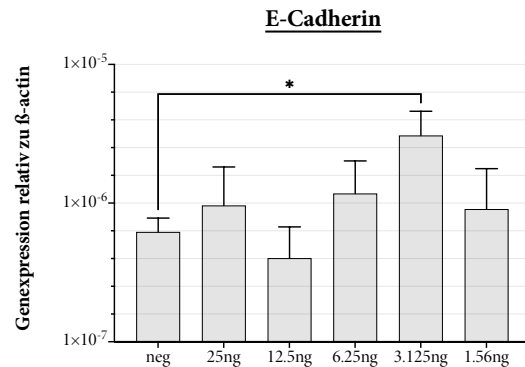


ABBILDUNG 15: DOSISFINDUNG VON IFNL2 UND IFNL3 IN CCL-206 ZELLEN

A Heatmap der Einzelzellkulturexperimente von drei unabhängigen Experimenten mit CCL-206 zur Dosisfindung. Farblich kodiert ist die relative Genexpression im Vergleich zur Negativkontrolle „neg“ des jeweiligen Experiments. Der Farbbereich stellt die relative Genexpression von 0,5-fach bis 2-fach im Vergleich zur Negativkontrolle dar. Als relevante Expressionsregulation wurden Werte $\leq 0,5$ und Werte ≥ 2 angesehen. Werte $\leq 0,5$ erscheinen weiß, Werte ≥ 2 erscheinen rot. B-C Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Expressionsregulationen sind mit Balken und Sternchen markiert. B Expression von E-Cadherin nach Stimulation mit IFNL2 ($p=0,0186$). C Expression von E-Cadherin nach Stimulation mit IFNL3 ($p=0,0203$).

7.2.2.4. Ergebnisse Timecourse-Experimente von LA-4 und CCL-206 (ABBILDUNG 16)

7.2.2.4.1. CCL-206

Zu beachten ist, dass die Werte für „comb“ aus einem einzigen Experiment und alle weiteren Werte aus zwei Experimenten stammen. Somit sind die Ergebnisse nicht statistisch auswertbar, können aber erste Hinweise für den Zeitverlauf der untersuchten Gene nach IFNL-Stimulation liefern.

Auf den ersten Blick fällt auf, dass das Positivkontrollgen für CCL-206 gut auf IFNL anspricht. Die stark erhöhte Expression von ISG15 in CCL-206 zeigte, dass die Stimulation mit IFNL erfolgreich war. Für IFNL2 ergab sich eine maximale Erhöhung von 59,6-fach nach 48h und für IFNL3 maximal 31,1-fach nach 96h. Interessanterweise stieg die Genexpression nach IFNL3-Stimulation später an als nach IFNL2-Stimulation. Beispielsweise erreichte die Expression von ISG15 nach 48h durch IFNL2-Stimulation den Maximalwert von 59,6-fach, durch IFNL3-Stimulation nach 48h dagegen nur 3,19-fach.

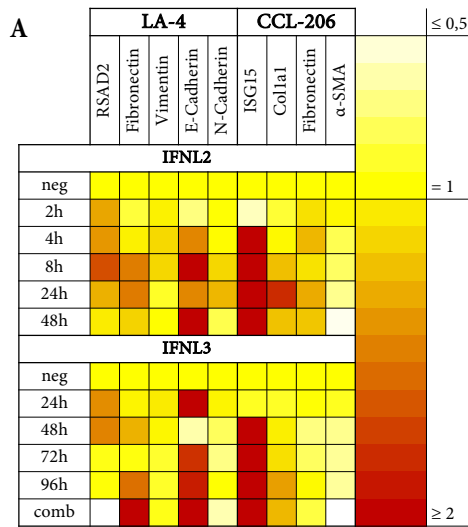
Die erhöhte Expression von Col1a1 in CCL-206 blieb mit einem Maximalwert von 1,81-fach unter dem Grenzwert. Alpha-SMA wird in CCL-206 scheinbar etwas vermindert exprimiert, blieb aber zu jedem

Zeitpunkt oberhalb des Grenzwerts von 0,5-fach. Somit zeigte sich hier keine relevante Regulation der Fibrose-Markergene.

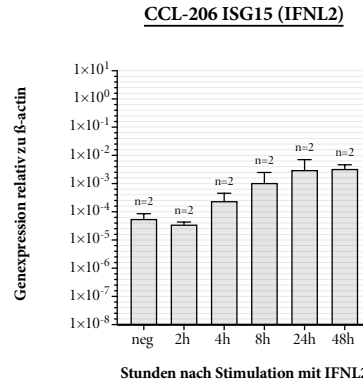
7.2.2.4.2. LA-4

Im Gegensatz zur starken Reaktion des Positivkontrollgens Lungenfibroblasten auf IFNL reagierte RSAD2 in LA-4 schwach auf IFNL und über- oder unterschritt die hier festgelegten Grenzwerte nicht. Fibronectin schien in LA-4 durch Stimulation von IFNL2 und IFNL3 in Kombination stark hochreguliert zu sein, allerdings wurde hier nur ein Experiment mit „comb“ ausgeführt. Hier sollten weitere Experimente durchgeführt werden, um eine Regulationsänderung von Fibronectin in LA-4 durch IFNL-Kombinationsstimulation aufzudecken.

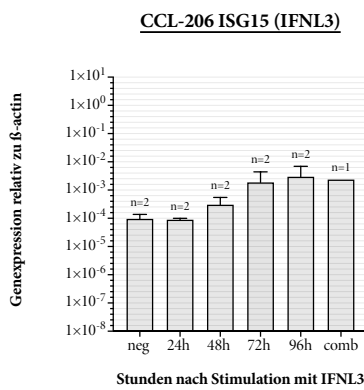
E-Cadherin wurde in LA-4 sowohl nach Stimulation mit IFNL2 als auch mit IFNL3 erhöht exprimiert und erreichte für IFNL2 den maximal 4,01-fachen und für IFNL3 den maximal 2,02-fachen Wert im Vergleich zur Negativprobe. Das Expressionsniveau bewegte sich für E-Cadherin in einem relativ geringen Bereich von 1×10^{-8} bis 1×10^{-6} , was ein Hinweis darauf sein kann, dass die scheinbar erhöhte Expression von E-Cadherin in diesem Experiment eher eine zufällige Fluktuation darstellt und daher keine biologische Relevanz hat.



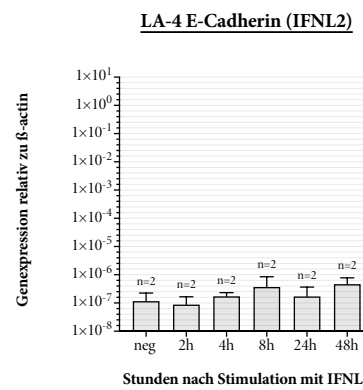
B



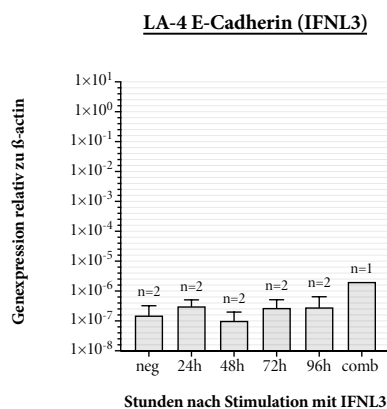
C



D



E



F

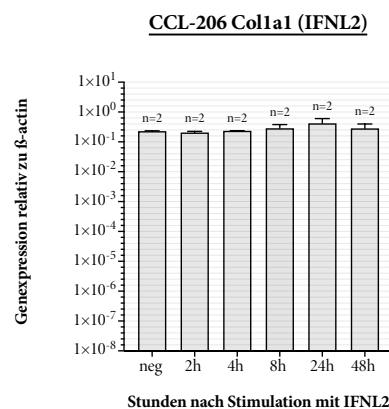


ABBILDUNG 16: TIMECOURSE DER STIMULATION VON CCL-206 UND LA-4 MIT IFNL2 UND IFNL3

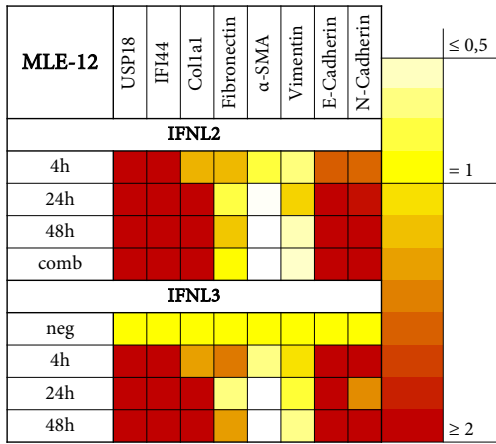
A Heatmap von zwei unabhängigen Timecourseexperimenten mit CCL-206 und LA-4. Farblich kodiert ist die relative Genexpression im Vergleich zur Negativkontrolle „neg“ des jeweiligen Experiments. Der Farbbereich stellt die relative Genexpression von 0,5-fach bis 2-fach im Vergleich zur Negativkontrolle dar. Als relevante Expressionsregulation wurden Werte $\leq 0,5$ und Werte ≥ 2 angesehen. Werte $\leq 0,5$ erscheinen weiß, Werte ≥ 2 erscheinen rot. **B-F** Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten. **B** Expression von ISG15 in CCL-206 nach Stimulation mit IFNL2. **C** Expression von ISG15 in CCL-206 nach Stimulation mit IFNL3. **D** Expression von E-Cadherin in LA-4 nach Stimulation mit IFNL2. **E** Expression von E-Cadherin in LA-4 nach Stimulation mit IFNL3. **F** Expression von Coll1a1 in CCL-206 nach Stimulation mit IFNL2.

7.2.2.5. Ergebnisse des Timecourse-Experiments mit MLE-12 (ABBILDUNG 17)

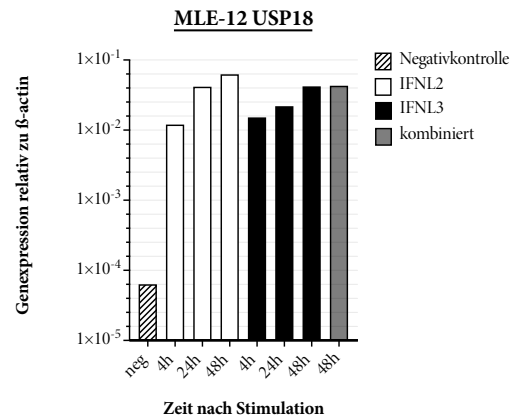
Nachdem IFNL keine nennenswerten Effekte auf die Genexpression von LA-4 zeigte, wurde zusätzlich ein Timecourse-Experiment mit der Zell-Linie MLE-12 durchgeführt. MLE-12 schien auf die Stimulation deutlich sensibler zu reagieren als LA-4. Sowohl die Positivkontrollgene USP18 und IFI44 als auch einige Markergene für EMT wurden nach Stimulation erhöht exprimiert. Dabei wurden für USP18 eine maximal 989-fache und für IFI44 eine maximal 261-fach erhöhte Expression im Vergleich zur Negativprobe gemessen. Col1a1 zeigte eine maximal um das 2,66-fache erhöhte Expression 48h nach IFNL 3-Stimulation. E-Cadherin wurde nach 48h durch kombinierte Stimulation von IFNL2 und IFNL3 am stärksten exprimiert (5,58-fach). N-Cadherin wurde 48h nach INFL3-Stimulation um das 2,71-fache exprimiert. Durch die Expressionserhöhung von Col1a1 und N-Cadherin könnte ein Hinweis auf Epitheliale-Mesenchymale-Transition vorliegen. Gegen die EMT spricht jedoch die Hochregulation von E-Cadherin. Dieses überraschende Ergebnis wird in **8.2.1.1** ausführlich diskutiert.

Zusammenfassend konnte in den Einzelzellkulturexperimenten kein eindeutiger Hinweis auf die Induktion der EMT oder von extrazellulärer Matrix in Lungenepithelzellen beziehungsweise Lungenfibroblasten gefunden werden. Die erhöhte Expression der Positivkontrollgene ISG15 und IFI44 in den Alveolarmakrophagen und Lungenfibroblasten zeigte, dass die Stimulation mit IFNL funktionierte. LA-4 zeigten jedoch keine Reaktion auf IFNL. Um eine genauere Aussage der Stimulierbarkeit von Lungenepithelzellen in vitro treffen zu können, wurde ein einzelnes Experiment mit MLE-12 durchgeführt. Dieses Experiment lieferte starke Hinweise darauf, dass IFNL eine relevante Genexpression in Lungenepithelzellen auslösen kann. Obwohl hier nur ein einziges Experiment mit MLE-12 durchgeführt wurde, kann angenommen werden, dass MLE-12 eher stark auf IFNL reagieren, LA-4 dagegen eine eher schwache oder nicht messbare Reaktion zeigen.

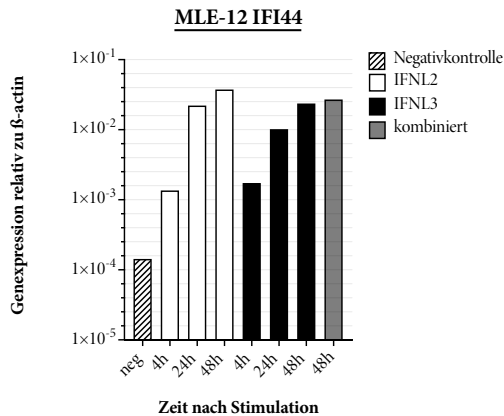
A



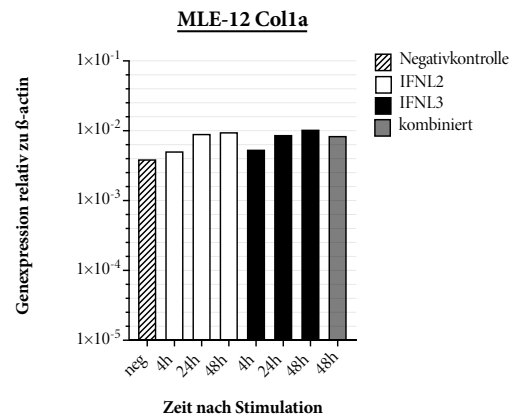
B



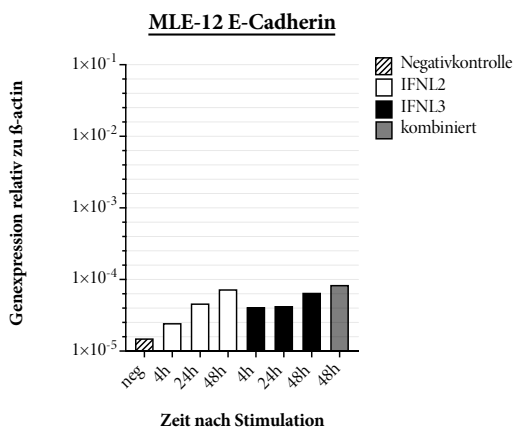
C



D



E



F

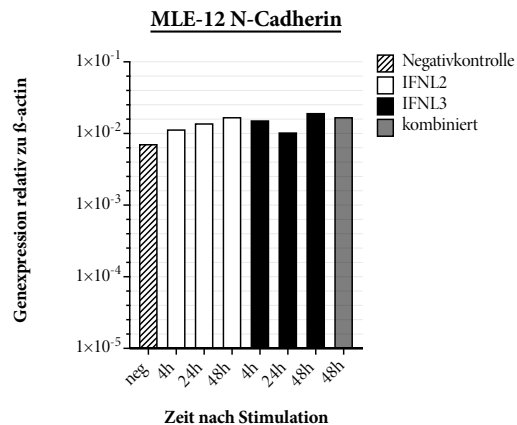


ABBILDUNG 17: TIMECOURSE DER STIMULATION VON MLE-12 MIT IFNL2 UND IFNL3

A Heatmap eines Timecourseexperiments mit MLE-12. Farblich kodiert ist die relative Genexpression im Vergleich zur Negativkontrolle „neg“ des jeweiligen Experiments. Der Farbbereich stellt die relative Genexpression von 0,5-fach bis 2-fach im Vergleich zur Negativkontrolle dar. Als relevante Expressionsregulation wurden Werte $\leq 0,5$ und Werte ≥ 2 angesehen. Werte $\leq 0,5$ erscheinen weiß, Werte ≥ 2 erscheinen rot. **B-F** Gezeigt sind die Werte als Säulengraphen für die Negativgruppe (gepunktet), die Stimulation mit IFNL2 (weiß), die Stimulation mit IFNL3 (schwarz) und die kombinierte Stimulation von IFNL 2 und IFNL3 (grau). **B** Expression von USP18 in MLE-12 nach Stimulation. **C** Expression von IFI44 in MLE-12 nach Stimulation. **D** Expression von Col1a1 in MLE-12 nach Stimulation. **E** Expression von E-Cadherin in MLE-12 nach Stimulation. **F** Expression von N-Cadherin in MLE-12 nach Stimulation.

7.2.3. Co-Kulturrexperiment

Nachdem die Stimulation der murinen Lungenepithelzell-Linie LA-4 keine relevante Genexpressionsregulation zeigte, wurde anhand von Stimulationsexperimenten in Co-Kultur von MH-S und LA-4 überprüft, ob die Interaktion dieser beiden Zelltypen einen Einfluss auf die Expression Fibrose-relevanter Gene hat.

7.2.3.1. Durchführung Co-Kulturrexperimente

Die LA-4/MH-S Co-Kultur wurde analog zu 7.1.2.2.1 angelegt und geerntet. Die Aussaat und die Stimulation mit IFNL2, IFNL3 und der Kombination aus IFNL2 und IFNL3 wurde analog zu 7.2.2.2 durchgeführt. Es wurde ein einzelnes Co-Kultur Experiment durchgeführt.

7.2.3.2. Ergebnisse Co-Kulturrexperimente (ABBILDUNG 18)

USP18 und IFI44 sprachen als Positivkontrolle mit einer Expressionserhöhung von maximal 8,75-fach für USP18 (4h, IFNL3) und von maximal 2,00-fach für IFI44 (24h, IFNL3) gut auf die Stimulation mit IFNL an. E-Cadherin wurde 24h nach IFNL2-Stimulation maximal 58,9-fach und 24h nach IFNL3-Stimulation maximal 131-fach exprimiert. USP18, IFI44 und E-Cadherin reagierten im LA-4-Einzelzellkulturrexperiment nicht relevant auf die IFNL-Stimulation und es muss davon ausgegangen werden, dass hier entweder eine Interaktion zwischen LA-4 und MH-S stattfindet oder diese starke Expressionserhöhung allein durch die Alveolarmakrophagen verursacht wird (siehe dazu **ABBILDUNG 14**). Weitere Stimulationsexperimente in Co-Kultur sind notwendig, um zu klären, ob diese eher untypische E-Cadherin Hochregulation direkt durch die Alveolarmakrophagen oder indirekt über eine Interaktion durch die Lungenepithelzellen verursacht wird. Zudem muss eine E-Cadherin-Expression von Alveolarmakrophagen nach IFNL-Stimulation weiter untersucht werden. Dieser Zusammenhang wird in 8.2.1.2 im Detail diskutiert.

7.2.4. Stimulation mit TGF- β

Profibrotische Zytokine wie TGF- β spielen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der IPF (siehe 3.1.2). Auch im Mausmodell der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose ist TGF- β , neben Fibrose-assoziierten Genen wie alpha-SMA oder Collagen Typ 1, erhöht [192]. In vitro induziert TGF- β eine Überaktivierung von Fibroblasten, die zu einer vermehrten Produktion extrazellulärer Matrix, der Transformation von Fibroblasten zu Myofibroblasten und anderen fibrosetypischen Prozessen führt [7], [193]. Auch Zellen des Lungenepithels wie AT2-Zellen nehmen im Rahmen des TGF- β -Signalwegs eine wichtige Rolle bei der Entstehung der IPF ein [194]. Dabei zählt TGF- β zu den wichtigsten Auslösern der EMT von Lungenepithelzellen. Beispielsweise unterdrückt dieses Zytokin die Expression von Proteinen, die für die Ausbildung von Zellkontakten zuständig sind. Dazu gehört unter anderem E-Cadherin und ZO-1, die für Adhärenskontakte (adherens junctions) und für verschließende Kontakte (tight junctions) zuständig sind. Mit dem Verlust dieser Zellkontakte lösen sich die Zellen von der Basalmembran. Dabei geht die Polarität und die Barrierefunktion des Epithels verloren [191]. Diese Zellen nehmen dann einen mesenchymalen Phänotyp ein und exprimieren unter anderem N-Cadherin und Vimentin [25].

Deshalb wurde in diesen Experimenten untersucht, ob IFNL die profibrotische Wirkung von TGF- β auf Genexpressionsebene beeinflusst. Dazu wurden die murinen Lungenfibroblasten CCL-206 und die murinen Lungenepithelzellen LA-4 in vitro untersucht.

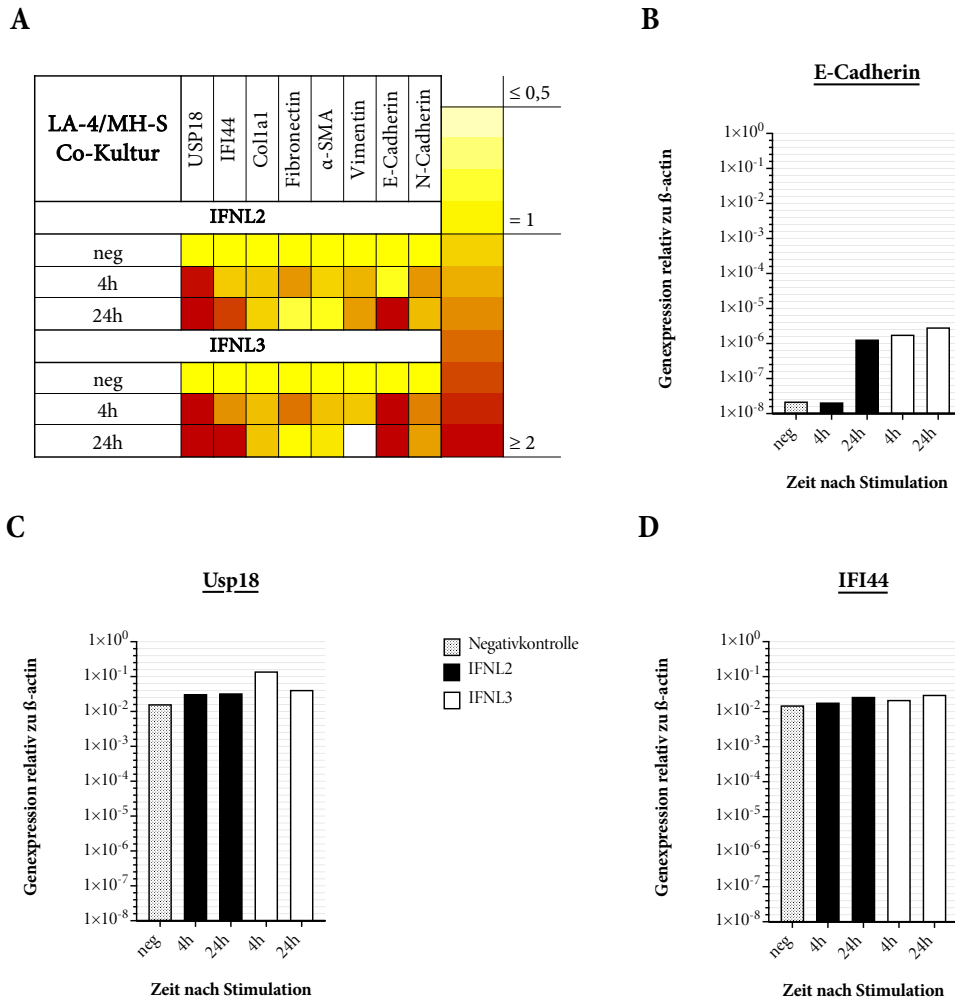


ABBILDUNG 18: STIMULATION DER LA-4 UND MH-S ZELLEN MIT IFNL IN CO-KULTUR
A Heatmap eines Co-Kulturrexperiments mit LA-4 und MH-S. Farblich kodiert ist die relative Genexpression im Vergleich zur Negativkontrolle „neg“ des jeweiligen Experiments. Der Farbbereich stellt die relative Genexpression von 0,5-fach bis 2-fach im Vergleich zur Negativkontrolle dar. Als relevante Expressionsregulation wurden Werte $\leq 0,5$ und Werte ≥ 2 angesehen. Werte $\leq 0,5$ erscheinen weiß, Werte ≥ 2 erscheinen rot. **B-D** Gezeigt sind die Einzelwerte der Negativkontrolle (gepunktet), der Stimulation mit IFNL2 (schwarz) und der Stimulation mit IFNL3 (weiß) als Säulengraphen. **B** Expression von E-Cadherin nach Stimulation. **C** Expression von USP18 nach Stimulation. **D** Expression von IFI44 nach Stimulation.

7.2.4.1. Durchführung

Die Zellen wurden geerntet, ausgezählt und 48h vor der Stimulation mit TGF- β in einer Zell-Medium-Suspension mit der Konzentration von 50.000 Zellen/ml in die Wells gegeben. 24h vor dem Experiment wurden die Zellen mit 25ng/ml IFNL2, 25ng/ml IFNL3 oder jeweils mit 12,5ng/ml IFNL2 und 12,5ng/ml IFNL3 in Kombination stimuliert. Dabei wurden vier Wells als Negativkontrolle mit Medium und der Trägerlösung von IFNL behandelt. Danach wurden alle Wells mit Ausnahme der Negativkontrolle mit 10ng/ml TGF- β 1 stimuliert [192], [193]. Die Negativkontrolle wurde mit der TGF- β 1-Trägerflüssigkeit behandelt. Nach 4h, 24h und 48h wurde die Zellen geerntet und für die qRT-PCR vorbereitet.

7.2.4.2. Ergebnisse (ABBILDUNG 19)

7.2.4.2.1. CCL-206

ISG15 fungierte hier erneut als Positivkontrollgen für die IFNL-Simulation von CCL-206. Zum Zeitpunkt 48h stieg die Expression von ISG15 durch die kombinierte IFNL-Stimulation auf das 20-fache im Vergleich zur Negativprobe. Auch ohne IFNL erhöhte sich die Expression dieses Gens relevant um das 2,46-fache. Interessanterweise wurde ISG15 24h nach TGF- β -Stimulation unabhängig von IFNL vermindert exprimiert.

TGF- β 1 löste in den Lungenfibroblasten CCL-206 eine deutliche Expressionssteigerung der Fibrosemarker aus. Fibronectin war 48h nach TGF- β 1-Singlestimulation um das 3,72-fache erhöht, 48h nach IFNL2&3-TGF- β -Co-Stimulation um das 2,8-fache. Hier zeigte sich demnach eine leichte Expressionsminderung durch IFNL.

Colla1 war 48h nach TGF- β Stimulation um das 2,93-fache erhöht, wobei die Expression 48h nach IFNL/TGF- β -Co-Stimulation mit 2,51-facher Erhöhung etwas geringer ausfiel. Auch die Expression von α -SMA nach 48h wurde vom 2,78-Fachen nach TGF- β -Singlestimulation auf das 1,70-Fache durch IFNL2&3-TGF- β -Co-Stimulation herunterreguliert. Ob diese Expressionsminderung durch IFNL relevant ist, muss in zukünftigen Experimenten überprüft werden.

7.2.4.2.2. LA-4

In LA-4 zeigte sich durch IFNL-Stimulation eine 2,01-fache Erhöhung des Positivkontrollgens RSAD2. LA-4 reagierte analog zu den anderen Experimenten dieser Arbeit schwach bis gar nicht auf die IFNL-Stimulation. Auch für die EMT-Markergene ergab sich hier kein relevanter Unterschied durch die Stimulation mit IFNL. Im direkten Vergleich zeigten sich hier Differenzen von weniger als 0,2-fach im Vergleich der IFNL2&3-TGF- β -Gruppe zur TGF- β -Gruppe. Beispielhaft wurde in **ABBILDUNG 19: STIMULATION VON LA-4 UND CCL-206 MIT TGF- β UND IFNL**, **D** das Gen für Fibronectin aufgeführt. Grund für die ausbleibende Regulation in LA-4 ist wahrscheinlich der fehlende IFNL-Rezeptor auf der Zelloberfläche (siehe 7.3)

7.2.5. Makrophagenpolarisation durch IL-4

In diesem Experiment sollte der Fokus auf der M2-Polarisation liegen. Wie in **3.1.2.1** beschrieben, nehmen alternativ aktivierte Makrophagen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Lungenfibrose ein. Dazu wurden die murinen Alveolarmakrophagen MH-S mithilfe von IL-4 zu M2-Makrophagen differenziert und zusätzlich mit IFNL stimuliert. Dabei sollte die Auswirkung von IFNL auf die M2-Polarisation und die Produktion von TGF- β untersucht werden. Als Kontrollgen der M2-Polarisation diente hierbei das Gen für Arginase-1[58].

7.2.5.1. Durchführung Makrophagenpolarisation

MH-S Zellen wurden geerntet, ausgezählt und in einer Konzentration von 50.000 Zellen/ml Medium in Wells gegeben. Nach 24h waren die Makrophagen adhärent und wurden zunächst für 4h mit jeweils 25ng/ml IFNL2, 25n/ml IFNL3 oder jeweils 12,5ng/ml IFNL2 und IFNL3 behandelt. Danach wurden die Zellen mit 10ng/ml IL-4 stimuliert und nach 4h, 24h und 48h geerntet. Das IFNL wurde nach Stimulation mit IL-4 in den Wells belassen. Bei diesem Experiment wurde für jedes Zytokin eine Negativkontrolle angelegt.

Zur Veranschaulichung der Expressionsregulation des Positivkontrollgens Arginase-1 (**ABBILDUNG 20, A**) wurde nach 4h, 24h und 48h mit IL-4 und der Trägerlösung von IFNL stimuliert und die Genexpression mittels qRT-PCR untersucht. Die Wells der Negativkontrolle „neg“ wurden mit den

Trägerlösungen von IFNL und IL-4 ohne das jeweilige Zytokin behandelt und direkt im Anschluss bzw. nach 0h geerntet.

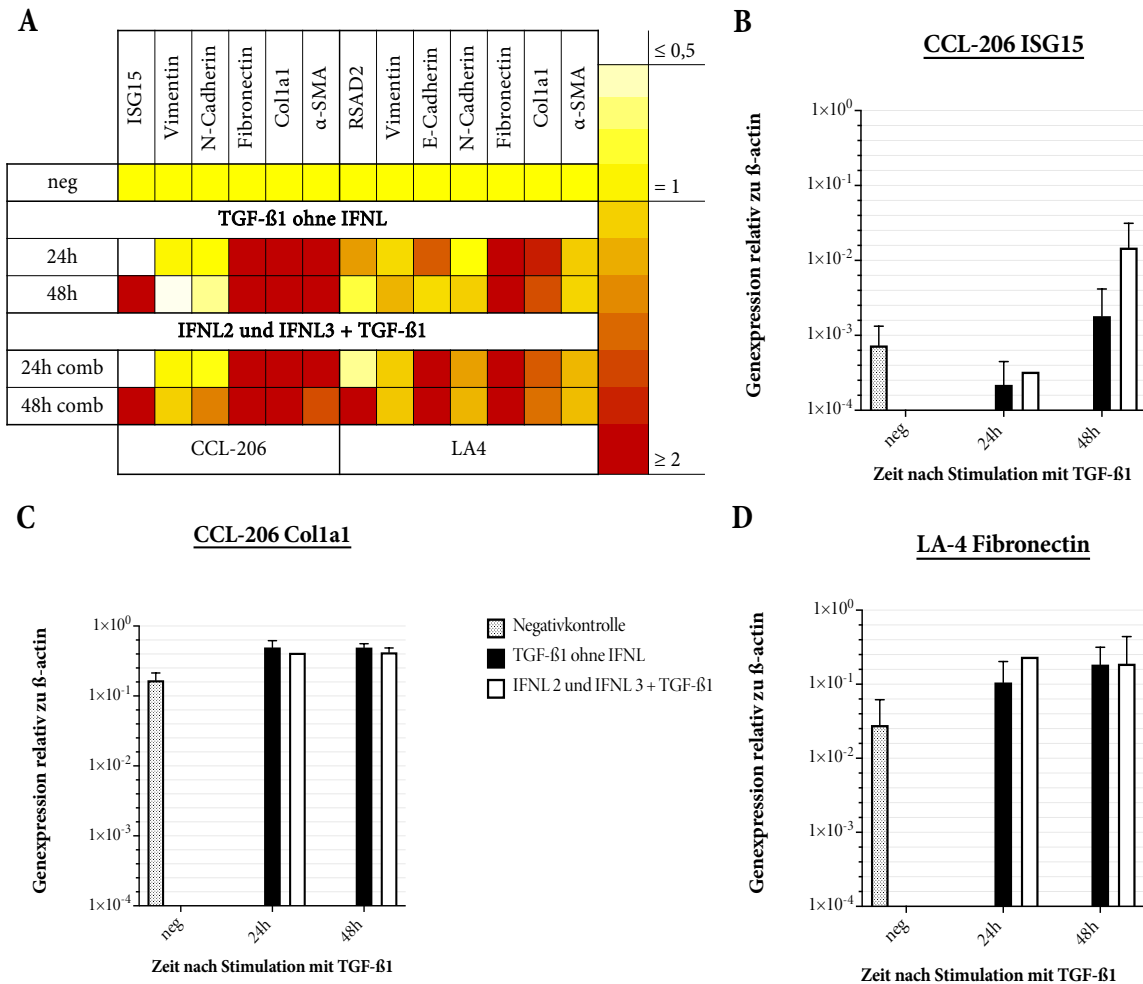


ABBILDUNG 19: STIMULATION VON LA-4 UND CCL-206 MIT TGF- β UND IFNL
A Heatmap von zwei unabhängigen Stimulationsexperimenten. Farblich kodiert ist die relative Genexpression im Vergleich zur Negativkontrolle „neg“ des jeweiligen Experiments. Der Farbbereich stellt die relative Genexpression von 0,5-fach bis 2-fach im Vergleich zur Negativkontrolle dar. Als relevante Expressionsregulation wurden Werte $\leq 0,5$ und Werte ≥ 2 angesehen. Werte $\leq 0,5$ erscheinen weiß, Werte ≥ 2 erscheinen rot. **B-D** Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten. Farblich markiert ist die Negativkontrolle (gepunktet), die Stimulation mit TGF- β 1 ohne IFNL (schwarz) und IFNL2 und IFNL 3 + TGF- β 1 (weiß). Zum Zeitpunkt 24h wurde für die Stimulation mit IFNL2 und IFNL3 + TGF- β 1 nur ein Experiment durchgeführt. Negativkontrolle“ bedeutet, dass nur mit der Trägerlösung von TGF- β 1 stimuliert wurde. Die Bezeichnung „IFNL comb“ meint die Stimulation mit jeweils 12,5ng/ml IFNL2 und 12,5ng IFNL3 in Kombination. **B** Expression von ISG15 in CCL206 nach Stimulation. **C** Expression von Col1a1 in CCL-206 nach Stimulation. **D** Expression von Fibronectin in LA-4 nach Stimulation.

Außerdem wurde der Einfluss von IFNL auf die Genexpression von bereits mit IL-4 stimulierten Makrophagen nach 4h, 24h und 48h untersucht (**ABBILDUNG 20, D**). Die Wells der Negativkontrollen „4h neg“, „24h neg“ und „48h neg“ wurden mit der Trägerlösung von IFNL und mit dem Zytokin IL-4 behandelt und nach 4h, 24h und 48h geerntet. Die anderen Wells wurden entweder mit IL-4+IFNL2 („I2“), IL-4+IFNL3 („I3“) oder der Kombination aus IL-4, IFNL2 und IFNL3 („comb“) behandelt. Anschließend wurden die mRNA der Zellen isoliert und für die qRT-PCR vorbereitet.

7.2.5.2. Ergebnisse Makrophagenpolarisation (ABBILDUNG 20)

In den folgenden Experimenten sollte die Induktion von Arginase-1 in MH-S durch IL-4 gezeigt werden (**ABBILDUNG 20, A-B**). Die Expression von Arginase-1 war nach Stimulation mit IL-4 und der Trägerlösung von IFNL nach 4h um das 1,4-fache, nach 24h um das 136-fache und nach 48h um das 3318-fache erhöht. Dieses Ergebnis veranschaulicht die starke Induktion von Arginase-1 durch IL-4 in MH-S. Die Gene für TGF- β 1 und TGF- β 2 zeigten keine relevante Genregulation in diesen Experimenten.

Zudem sollte eine mögliche Wirkung von IFNL auf die IL-4-induzierte Expression von Arginase-1 untersucht werden (**ABBILDUNG 20, D-G**). Im Folgenden wird die X-fache Genexpression im Vergleich zur jeweiligen Negativkontrolle nach 4h, 24h und 48h angegeben. Beispielweise wird „4h neg“ (IL-4+Trägerlösung IFNL) ausschließlich mit den entsprechenden Werten 4h nach Stimulation mit IL-4+IFNL2, IL-4+IFNL3 und IL-4+IFNL2/3 Kombinationsstimulation verglichen. Diese Art der Berechnung lässt einen Vergleich der Wirkung der einzelnen Zytokinkonstellationen innerhalb der Gruppen 4h, 24h und 48h nach Stimulation zu. Alle relevanten Genregulationen innerhalb der entsprechenden Gruppen wurden in der **ABBILDUNG 20, E-G** mit einem Pfeil nach oben markiert.

Arginase-1 war im Vergleich zur jeweiligen Negativkontrolle 4h nach IFNL2-Stimulation um das 4,12-fache sowie 24h nach IFNL2-Stimulation um das 1,98-fache erhöht. 4h nach IFNL2&3-Kombinationsstimulation wurde das Gen für Arginase-1 im Vergleich zur Negativkontrolle um das 3,21-fache erhöht exprimiert.

TGF- β 1 war 24h und 48h nach Stimulation mit IFNL2 um das 2,28-fache und um das 1,83-fache erhöht.

TGF- β 2 war 24h nach Stimulation mit INFL2 um das 2,83-fache erhöht sowie 4h, 24h und 48h nach Stimulation mit INFL3 um das 2,32-fache, um das 2,51-fache und um das 2,27-fache.

Eine relevante Minderung der Expression ergab sich in diesem Experiment für keines der Gene. Vielmehr zeigten sich bei allen drei untersuchten Genen erhöhte Expressionswerte nach IFNL-Stimulation. Die Expressionserhöhung von Arginase-1, TGF- β 1 und TGF- β 2 würde am ehesten einer stärkeren Polarisierung der Makrophagen in Richtung M2 entsprechen. Im Hinblick auf die IPF könnte das eine Stimulation fibrogener Mechanismen im Lungengewebe und damit eine Verstärkung der IPF-Progression bedeuten.

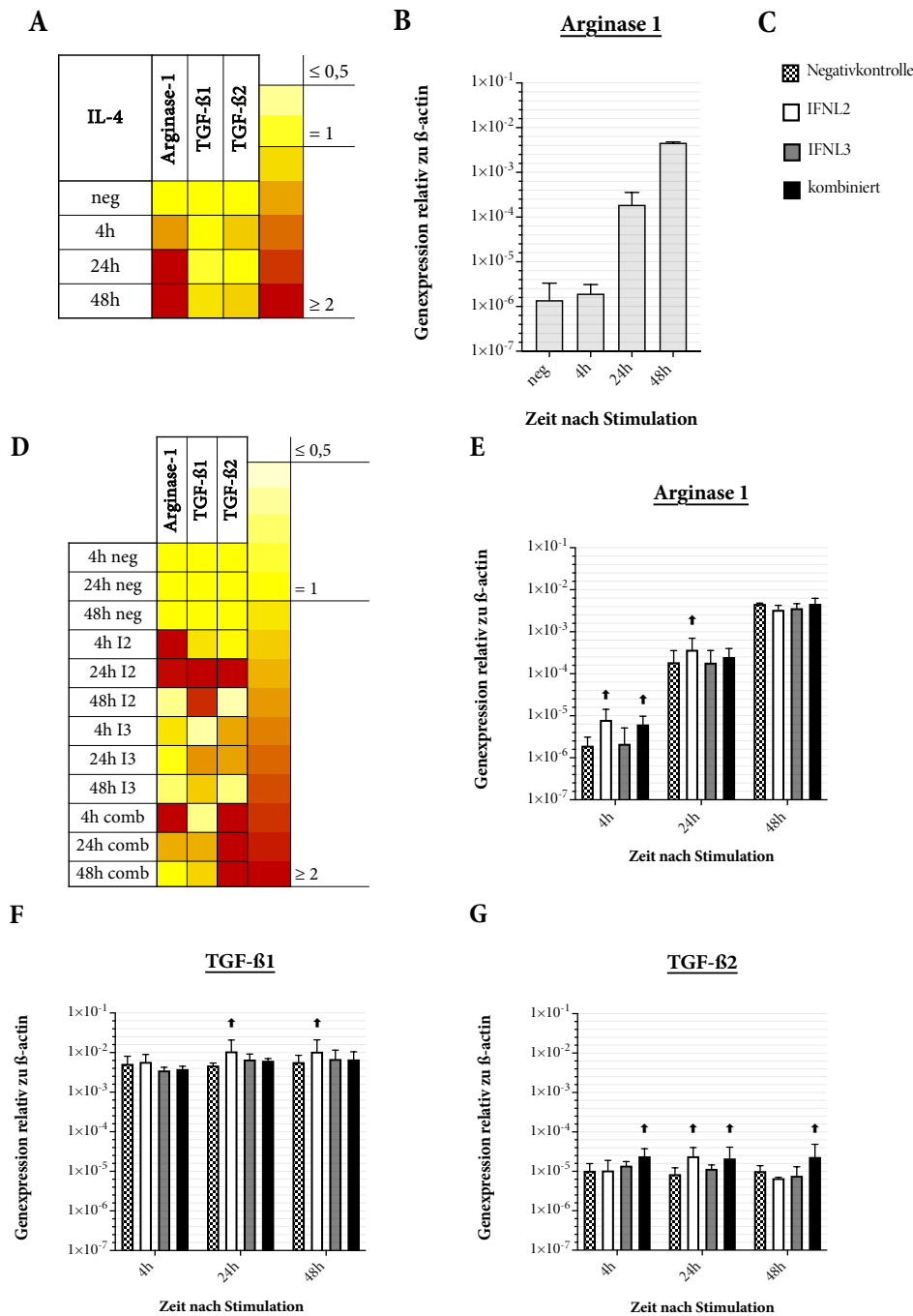


ABBILDUNG 20: STIMULATION VON MH-S MIT IL-4 UND IFNL

Gezeigt sind Heatmaps und Säulengraphen von zwei unabhängigen Experimenten. Die Heatmaps zeigen durch farbliche Kodierung die relative Genexpression im Vergleich zur Negativkontrolle „neg“ des jeweiligen Experiments. Der Farbbereich stellt die relative Genexpression von 0,5-fach bis 2-fach im Vergleich zur Negativkontrolle dar. Als relevante Expressionsregulation wurden Werte $\leq 0,5$ und Werte ≥ 2 angesehen. Werte $\leq 0,5$ erscheinen weiß, Werte ≥ 2 erscheinen rot. Die Säulengraphen zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen. Mit Pfeilen sind nur die Säulen markiert, die in der Heatmap als relevant hochreguliert (rot) erscheinen. **A** Heatmap der Genexpression nach Stimulation mit IL-4 allein. **B** Expression von Arginase-1 4h, 24h und 48h nach Stimulation mit IL-4 und der IFNL-Trägerlösung. **C** Legende für E-G. **D** Heatmap von zwei unabhängigen Stimulationsexperimenten mit IL-4 und IFNL2 („I2“), IFNL3 („I3“) und IFNL2 und 3 in Kombination („comb“) nach 4h, 24h und 48h. Die Negativkontrollen „4h neg“, „24h neg“ und „48h neg“ wurden mit IL-4 und der IFNL-Trägerlösung stimuliert. **E-G** Expression von Arginase-1, TGF- β 1 und TGF- β 2 nach Stimulation mit IFNL2, IFNL3 und „comb“ zusammen mit IL-4.

7.3. IFNL-Rezeptor-Darstellung mittels FACS

Aufgrund der unerwartet schwachen Reaktion von LA-4 Zellen auf IFNL stellte sich die Frage, ob LA-4 überhaupt den IFNL-Rezeptor exprimieren. In den Infektionsexperimenten zeigte sich in LA-4 ein relativ niedriges IL28Ra-Expressionsniveau im Bereich von 1×10^{-7} bis 1×10^{-6} . Im Vergleich dazu war das IL28Ra-Expressionsniveau in MH-S zwischen 1×10^{-4} und 1×10^{-3} , in MLE-12 im Bereich von 1×10^{-4} bis 1×10^{-3} und in vivo zwischen 1×10^{-3} und 1×10^{-2} jeweils deutlich höher (siehe **ABBILDUNG 23**). Das Expressionsniveau in MH-S und MLE-12 korrelierte mit einer starken ISG-Expression als Reaktion auf die IFNL-Stimulation. In vivo fand die stärkste IL28Ra-Expression statt, wobei eine deutliche IFNL-Expression nach der MHV-68-Infektion festgestellt wurde. Diese Ergebnisse erhärteten den Verdacht, dass LA-4 möglicherweise keinen IFNL-Rezeptor exprimieren. Diese Hypothese wurde mittels Durchflusszytometrie für MH-S, MLE-12 und LA-4 überprüft. Zunächst wurde dabei die Rezeptorbindung der hier verwendeten Antikörper mithilfe von murinen Granulozyten und Monozyten aus Mausblut überprüft. Murine Granulozyten exprimieren den IFNL-Rezeptor IL28Ra [195]. Sie wurden aus Mausvollblut isoliert und dienten für dieses Experiment als Positivkontrolle (**ABBILDUNG 21**).

7.3.1. Durchführung FACS-Analyse

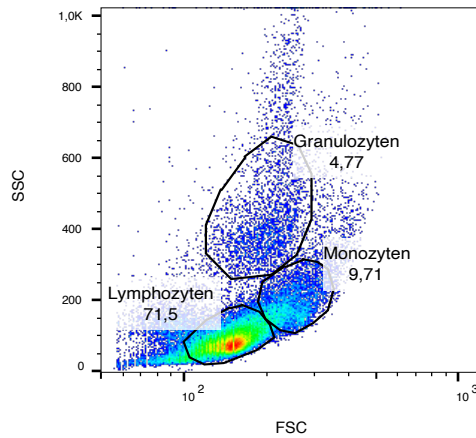
Die genaue Methodik der FACS-Analyse von in vitro Zellen wurde bereits in **6.5** erläutert. Für die Untersuchung wurden LA-4, MH-S, MLE-12 und Mausvollblut verwendet. Bei den MH-S-Zellen wurde vor der Färbung für die FACS-Analyse die Fc-Rezeptoren blockiert (siehe **6.5.2**).

Die Untersuchung von Mausvollblut aus C57BL/6-Mäusen diente als Positivkontrolle für den hier verwendeten primären und sekundären Antikörper (siehe **ABBILDUNG 21**). Das Mausvollblut wurde aus drei Wildtyp-C57BL/6-Mäusen mittels Venenpunktion gewonnen und in EDTA-beschichtete Röhrchen gegeben. Davon wurde 1ml Mausvollblut in 20ml Ammoniumchlorid-Kalium-Lysepuffer (ACK-Puffer) gegeben und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der ACK-Puffer lysiert die Erythrozyten, wobei die Leukozyten und Thrombozyten erhalten bleiben. Dadurch wird die Untersuchung der murinen Leukozyten erleichtert. Die Proben wurden bei 300xg für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen, wobei ein Flüssigkeitsfilm auf dem Pellet belassen wurde, um keine Zellen zu verwerfen. Mit diesem Flüssigkeitsfilm wurde das Pellet resuspendiert und anschließend mit 5ml kaltem PBS gemischt. Anschließend wurde die Suspension bei 300xg und einer Temperatur von 2-8°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet erneut mit kaltem PBS vermischt. Diese Suspension wurde dann für die Färbung zur FACS-Analyse verwendet.

Die ungefärbten murinen Blutzellen wurden zunächst mithilfe der Software FlowJo™ in die Subpopulationen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten unterteilt. Dieses Verfahren nennt man auch „Gating“. Dabei wird die Gesamtpopulation der untersuchten Zellen graphisch anhand eines sogenannten „Scatterplots“ in einzelne Bereiche unterteilt. Diese Bereiche sind für verschiedene Zelltypen charakteristisch. Beispielsweise geht man davon aus, dass Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten anhand des Side- und des Forward-Scatters graphisch unterschieden werden können. Diese Unterteilung wird dann für die Scatterplots der Zellen, die mit dem primären und sekundären Antikörper gefärbt wurden, beibehalten.

Das Histogramm zeigt die Zellzahl gegen die Fluoreszenzstärke nach dem Gating. Dabei lassen sich gefärbte von nicht-gefärbten Zellen anhand des Mittelwerts der Fluoreszenzstärke unterscheiden. Eine funktionale Bindung des Antikörperkomplexes aus primärem und sekundärem Antikörper erzeugt ein stärkeres Fluoreszenzsignal als der 2. Antikörper allein. Deshalb wird die Färbung mit dem 2. Antikörper allein auch als Negativkontrolle verwendet.

A



B

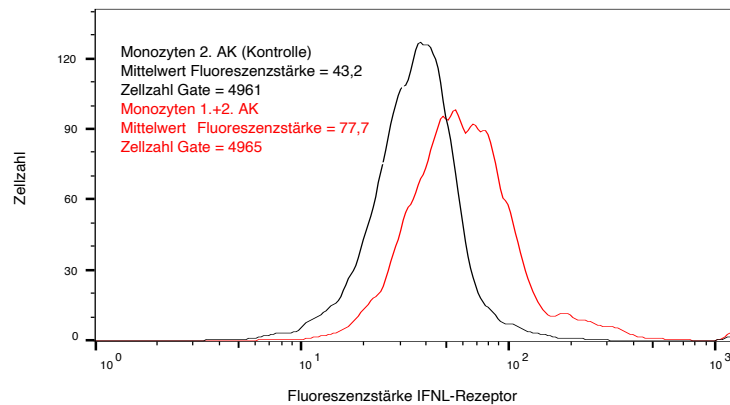
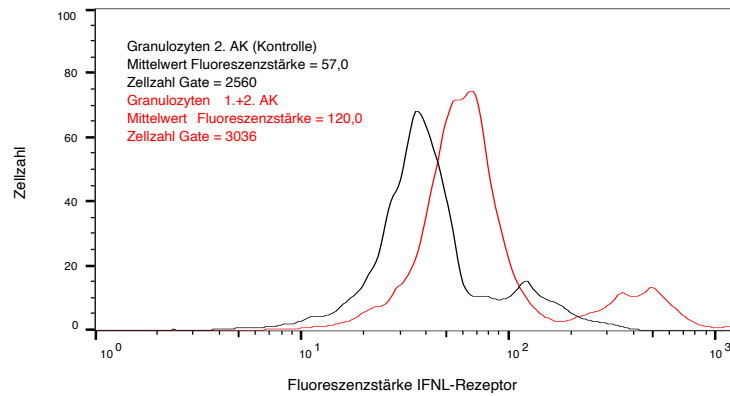


ABBILDUNG 21: FACS-ANALYSE VON MURINEN LEUKOZYTEN

Gezeigt ist ein Scatterplot von ungefärbten Zellen aus Mausvollblut, der Forwardscatter (FSC) gegen Sidescatter (SSC) abbildet. Die Gatingbereiche definieren auch die Leukozytenpopulationen nach Fluoreszenzfärbung. Die FACS-Analyse wurde nach Lyse der murinen Erythrozyten mittels ACK-Puffer durchgeführt. **A** In den drei Gatingbereichen finden sich Leukozytenpopulationen ohne Antikörper-Färbung. Markiert sind die Anteile von Granulozyten (4,77%), Lymphozyten (71,5%) und Monozyten (9,71%). **B** Granulozyten und Lymphozyten mit 2. (schwarz)- oder 1.+2. Antikörper (rot) als Histogramm dargestellt. Das Histogramm zeigt die Zellzahl gegenüber der Fluoreszenzstärke des Interferon-lambda-Rezeptors IL28Ra. Die Populationen, die für die Histogramme definiert wurden, entsprechen dem jeweiligen Gating-Bereich für Monozyten und Granulozyten in **A**. Der Text beschreibt den Mittelwert der Fluoreszenzstärke sowie die Zellzahl des jeweiligen Gatingbereichs.

7.3.2. Ergebnisse FACS-Analyse (ABBILDUNG 22)

Granulozyten und Monozyten aus Mausvollblut zeigen einen deutlichen Fluoreszenzunterschied zwischen der Färbung mit dem 2. Antikörper und der Kombination aus 1. – und 2. Antikörper. Dieser Fluoreszenzunterschied wird durch die Bindung des 1. Antikörpers an den IFNL-Rezeptor IL28Ra verursacht. Dieses Ergebnis zeigt, dass auf der Zelloberfläche von Granulozyten und Monozyten aus Mausvollblut IL-28Ra exprimiert wird und der hier verwendete Antikörperkomplex daran bindet. Somit eignete sich dieser Antikörper auch für die Untersuchung des IFNL-Rezeptorstatus auf anderen Zelltypen wie LA-4 und MLE-12.

Zudem besitzen die Granulozyten eine Subpopulation mit stärkerem Fluoreszenzsignal, was die große Differenz der Mittelwerte der Fluoreszenzstärke dieser Gruppe verursacht. Auch die Monozyten scheinen eine Subpopulation mit etwas stärkerem Fluoreszenzsignal aufzuweisen. Es scheint also bei beiden Zelltypen eine Subpopulation mit erhöhter Rezeptordichte oder Bindungsaffinität zu geben.

Für LA-4 zeigt das Histogramm keinen Unterschied der Fluoreszenzstärke zwischen der Färbung mit dem 2. Antikörper und der Kombination aus 1. – und 2. Antikörper. Folglich muss davon ausgegangen werden, dass LA-4 Zellen keine oder eine sehr geringe Anzahl von IL28Ra exprimieren.

Für MLE-12 zeigt das Histogramm einen Unterschied der Fluoreszenzstärke zwischen der Färbung mit dem 2. Antikörper und der Kombination aus 1. – und 2. Antikörper. Dieser Fluoreszenzunterschied wird durch die Bindung des 1. Antikörpers an den IFNL-Rezeptor IL28Ra verursacht. Dabei ist die Differenz der Fluoreszenzstärken der beiden Gruppen nicht so groß wie bei den Granulozyten oder

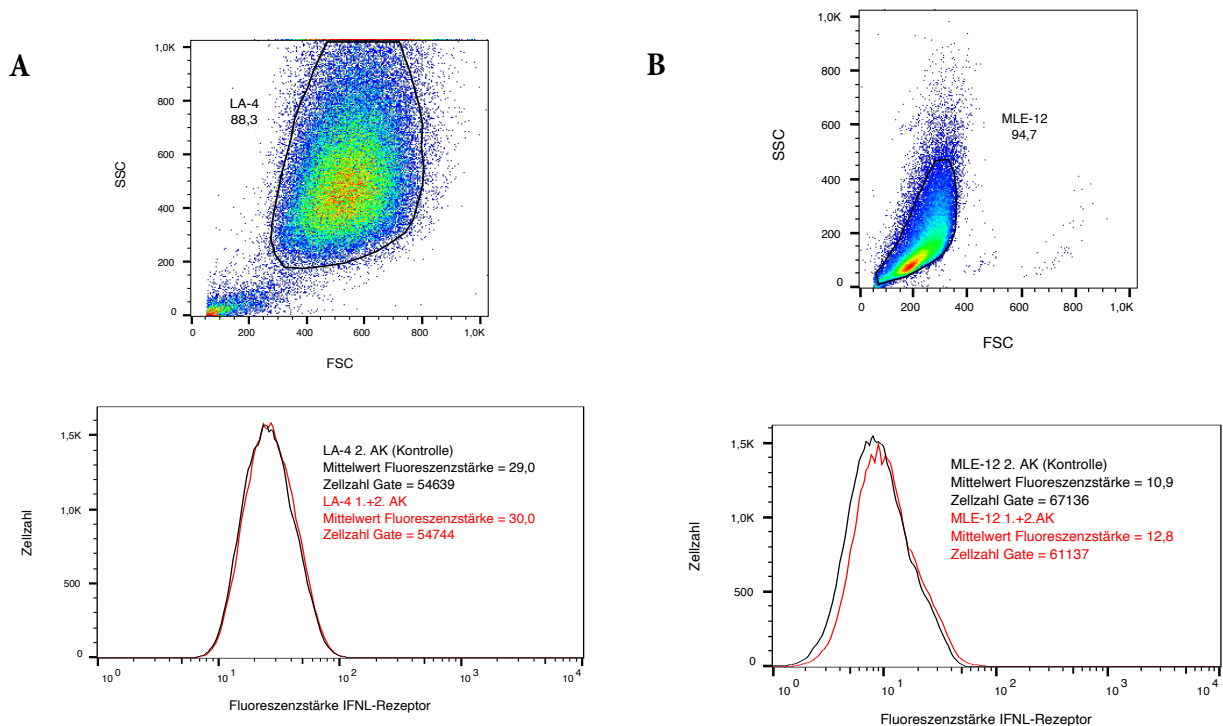


ABBILDUNG 22: FACS-ANALYSE VON LA-4 UND MLE-12

Gezeigt sind Scatterplots von LA-4 und MLE-12, welche die jeweiligen Gatingbereiche für die darunter abgebildeten Histogramme definieren. **A** LA-4 ohne Antikörper mit Gatingbereich, der 88,3% der ungefärbten Zellen einschließt. Dabei ist der Side-Scatter (SSC) gegen die den Forward-Scatter (FSC) aufgetragen. Das Histogramm zeigt die Zellzahl gegenüber der IFNL-Rezeptor-Fluoreszenzstärke der Zellen des definierten Gatingbereichs. Der Text innerhalb der Histogramme beschreibt den Mittelwert der Fluoreszenzstärke sowie die Zellzahl des jeweiligen Gatingbereichs. **B** MLE-12 analog zu **A**.

Monozyten aus Mausvollblut. Vermutlich bindet der IL28Ra-Antikörper eher schwach an MLE-12 oder es wird nur eine geringe Anzahl von Rezeptoren exprimiert. Die Hypothese der schwachen Rezeptorbindung erscheint im Hinblick auf das hohe Expressionsniveau von IL28Ra in MLE-12 wahrscheinlicher (siehe **ABBILDUNG 23**).

Zusammenfassend ergeben sich mehrere Erkenntnisse. Zunächst konnte gezeigt werden, dass die Rezeptorbindung der hier verwendeten Antikörper funktionierte. Sowohl die murinen Leukozyten als auch die murinen Lungenepithelzellen MLE-12 besitzen Rezeptoren des Typs IL28Ra. Dabei zeigten MLE-12 eine schwächere Rezeptorbindung als die murinen Leukozyten. Im Gegensatz dazu bilden LA-4 diesen Rezeptor offenbar nicht aus. Diese Erkenntnis bestätigt die Ergebnisse aus den Expressionsanalysen der Infektionsexperimente und den Untersuchungen zur antiviralen Wirksamkeit. Bei diesen Experimenten zeigte sich eine geringe Expression des Gens für IL28Ra in LA-4. Zudem fehlte die antivirale Wirkung von IFNL in LA-4-Zellen im Gegensatz zu MLE-12-Zellen.

8. Diskussion & Ausblick

„Interferon spielt bei der Entstehung der idiopathischen Lungenfibrose im Rahmen der MHV-68-Infektion der Lunge eine wichtige Rolle.“

So lautete die Hypothese zu Beginn dieser Arbeit. Im nachfolgend letzten Abschnitt soll diese Hypothese im Hinblick auf die hier erzielten Ergebnisse diskutiert werden. Zusätzlich soll ein Ausblick für mögliche Forschungsarbeiten in der Zukunft zu diesem Thema gegeben werden. In **TABELLE 15** ist eine Übersicht der Erkenntnisse dieser Arbeit dargestellt.

Erkenntnis	Zelltyp	Methode
IFNL hat eine antivirale Wirkung in murinen Lungenepithelzellen in vitro	MLE-12	Plaque-Assay
MHV-68 induziert eine starke IFNL-Expression in der murinen Lunge	In vivo Lungengewebe	qRT-PCR
Bestimmte murine Lungenepithelzellen exprimieren keinen funktionalen IFNL-Rezeptor	LA-4	qRT-PCR, FACS, Plaque-Assay
In vitro induziert eine MHV-68-Infektion keine IFNL-Expression	LA-4, MLE-12, MH-S	qRT-PCR
IFNL hemmt die Expression TGF- β -induzierter Gene in murinen Lungenfibroblasten	CCL-206	qRT-PCR
IFNL2 fördert die IL-4-induzierte Expression von Arginase-1, TGF- β 1 und TGF- β 2 in murinen Alveolarmakrophagen	MH-S	qRT-PCR
IFNL erhöht die Expression von Collagen, E-Cadherin und N-Cadherin in murinen Lungenepithelzellen	MLE-12	qRT-PCR
IFNL erhöht die Expression von E-Cadherin in murinen Lungenfibroblasten	CCL-206	qRT-PCR

TABELLE 15: ÜBERSICHT ÜBER DIE ERKENNTNISSE DIESER ARBEIT

Gezeigt ist eine zusammenfassende Übersicht der Erkenntnisse dieser Arbeit. Für jede Erkenntnis wurde der untersuchte Zelltyp und die Methode aufgelistet. Besonders wichtige Erkenntnisse sind oben in der Tabelle aufgeführt. Dabei konnten **fett markierte Erkenntnisse** statistisch abgesichert werden. Für Zelltypen und Methoden gilt die statistische Absicherung nur für fett markierte. Die Experimente, die weniger als dreimal wiederholt wurden, konnten keiner statistischen Analyse unterzogen werden. Diese sind hier in normaler Schrift dargestellt. Zu beachten ist, dass MLE-12 in der vierten Zeile von oben nicht fett markiert ist. Dieses Experiment wurde mit diesem Zelltyp nur einmal durchgeführt und konnte daher nicht statistisch ausgewertet werden.

8.1. Infektionsexperimente

Für die Infektionsexperimente wurden murine Lungeneithelzellen und Alveolarmakrophagen verwendet. Diese Zelltypen wurden ausgewählt, weil sie die Hauptvertreter der Zellen in den Alveolen darstellen. In den 300-400 Millionen Alveolen bilden Pneumozyten etwa 100m² respiratorisches Epithel, welches in der menschlichen Lunge für den Gasaustausch zuständig ist. Dabei bilden Typ-I-Pneumozyten etwa 90% und Typ-II-Pneumozyten ca. 7% der Alveolaroberfläche [196]. Daneben bilden Endothelzellen die alveolären Kapillaren und die Alveolarmakrophagen funktionieren als Abwehrsystem gegen Keime, die über die Atemluft in die Alveolen gelangen. Die Lunge stellt eine der ersten Barrieren für exogene Pathogene dar und ist besonders auf eine funktionsfähige Immunantwort angewiesen. Als Teil der antiviralen Abwehrmechanismen ist über die Funktion von IFNL im Rahmen der Infektion der Lunge durch MHV-68 nicht viel bekannt. In diesen Experimenten sollte die Expression von IFNL und dessen Rezeptor auf genetischer Ebene untersucht werden. Außerdem wurde der Frage nachgegangen, ob IFNL eine Wirkung auf die Replikation von MHV-68 in Lungeneithelzellen hat.

8.1.1. Die Expression von IFNL oder dem IFNL-Rezeptor nach Infektion

8.1.1.1. Einzelzellkulturexperimente

Im Rahmen der Einzelzellkulturexperimente wurden murine Lungeneithelzellen und Alveolarmakrophagen mit MHV-68 infiziert und die Expression ausgewählter Gene untersucht. Dazu gehörten die Gene für IFNL und für den IFNL-Rezeptor IL28Ra als auch die Gene für die Typ-I-Interferone und deren Rezeptor. Die Gene der Typ-I-Interferone (IFNa5 und IFN β) und deren Rezeptor (IFNaR1) dienten hier als Positivkontrolle für die Virusinfektion. Typ-I-Interferone spielen unter anderem bei der Kontrolle der Latenz und Reaktivierung von MHV-68 eine Rolle (siehe 0). Folglich galt die Hochregulation dieser Gene als Bestätigung für eine erfolgreich abgelaufene Infektion dieser Zellen mit MHV-68.

Die murinen Lungeneithelzellen LA-4 stellen ein etabliertes in vitro Modell zur Untersuchung von Infektionen der Lunge mit MHV-68 dar [114] und konnten auch in diesen Experimenten erfolgreich mit diesem Virus infiziert werden. Dies zeigte sowohl die erhöhte Expression der Typ-I-Interferone nach Infektion als auch der Anstieg der PFU/ml im Zeitverlauf der Experimente zur antiviralen Wirksamkeit von IFNL. Trotz der Virusinfektion konnte in LA-4 weder für IFNL noch für den IFNL-Rezeptor eine relevant veränderte Regulation nachgewiesen werden. Zudem fiel auf, dass das Expressionsniveau des IFNL-Rezeptors in diesem Zelltyp nach Infektion verhältnismäßig niedrig ausfiel (siehe **ABBILDUNG 23**). Im Vergleich dazu war die Expression dieses Rezeptors in infizierten MH-S bis zu 300-fach höher. Auch der Lungeneithelzelltyp MLE-12 zeigte nach Infektion eine bis zu 370-fach höhere Expression des IFNL-Rezeptors im Vergleich zu LA-4. Für MLE-12 konnte auch eine antivirale Wirkung von IFNL mit Hilfe der Plaque-Assays nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis bestätigte sich in der FACS-Analyse durch den Nachweis von IFNL-Rezeptoren auf der Oberfläche von MLE-12 und durch den fehlenden Nachweis dieser Rezeptoren auf LA-4. Somit ist davon auszugehen, dass das Expressionsniveau von IL28Ra in LA-4 auch im Kontext der MHV-68-Infektion für die Expression funktionaler IFNL-Rezeptoren zu niedrig ist. Demnach kann IFNL im Rahmen der Virusabwehr gegen MHV-68 in LA-4 keine bedeutende Rolle spielen.

Trotz der fehlenden IFNL-Rezeptorausbildung auf LA-4 sollte dieser Zelltyp im Kontext der Typ-I-Interferon-vermittelten Virusabwehr weiterhin im Fokus der Forschung stehen. Beispielsweise konnte schon vor mehr als einem Jahrzehnt gezeigt werden, dass Typ-I-Interferone die intrazelluläre Virusreplikation in LA-4 stark hemmen [197]. Dabei scheint MHV-68 mit Hilfe des Open-Reading-Frame-36 (ORF36) bereits einen Mechanismus entwickelt zu haben, der es dem Virus ermöglicht, der

Typ-I-Interferon-Wirkung zu entgehen [140]. Typ-I-Interferone konnten außerdem mit der Regulation von Latenz und Reaktivierung von MHV-68 in Verbindung gebracht werden. Dabei wurde für diese Interferone ein inhibierender Effekt auf die Reaktivierung während des Latenzstadiums von MHV-68 nachgewiesen [141].

Auch in den Lungenepithelzellen MLE-12 konnten in einem ersten Experiment keine Hinweise auf eine Regulation von IFNL nach MHV-68-Infektion gefunden werden. Allerdings offenbarte sich in den Untersuchungen zur antiviralen Wirksamkeit ein starker Abwehrmechanismus dieser Lungenepithelzellen gegen MHV-68. Damit erscheint die Überlegung plausibel, dass IFNL zwar nicht von MLE-12-Zellen selbst gebildet wird, diese Zellen aber über IFNL-Rezeptoren und IFNL-abhängige Mechanismen zur Virusabwehr verfügen. Hierbei könnten insbesondere die Interferon-Stimulated-Genes eine Rolle spielen. Die ISG-Expression nach MHV-Infektion in MLE-12 sollte in zukünftigen Experimenten untersucht werden.

Natürlich macht die Überlegung Sinn, dass nicht alle IFNL-sensitiven Zellen dieses Zytokin auch bilden können müssen. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, finden sich Effektorzellen für die IFNL-Wirkung vorwiegend in epithelzellreichen Organen [154], [198]. Dagegen stehen bei der Expression dieses Zytokins nicht primär Epithelzellen, sondern hauptsächlich Immunzellen wie Makrophagen und dendritische Zellen, im Vordergrund [199]. Somit ist es denkbar, dass MLE-12 nicht an der Produktion von IFNL teilnehmen, sondern die Rolle von Effektorzellen der IFNL-induzierten Immunantwort einnehmen.

Die Funktion von Lungenepithelzellen bei der IFNL-vermittelten Immunantwort auf eine MHV-68-

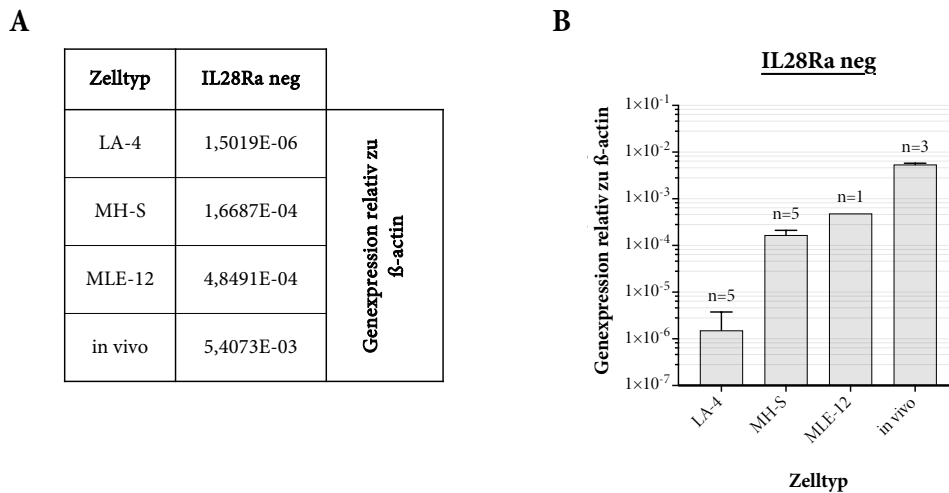


ABBILDUNG 23: GEN-EXPRESSIONSNIVEAU DES IFNL-REZEPTORS IL28RA

Gezeigt sind die Mittelwerte der Expression des IFNL-Rezeptors IL28Ra relativ zum Housekeeper β -actin in den Zellen LA-4, MH-S, MLE-12 und in Lungengewebe in vivo nach Infektion mit MHV-68. Dabei werden die Mittelwerte der Negativproben „neg“ repräsentativ für das Expressionsniveau von IL28Ra in den jeweiligen Zellen gezeigt. MH-S und MLE-12 besitzen nachweislich einen funktionalen IFNL-Rezeptor (siehe 7.2.2.3 für MH-S und 7.1.3.2 für MLE-12) **A** Mittelwerte der Expression von IL28Ra relativ zum Housekeeper der jeweiligen Negativprobe „neg“ nach MHV-68-Infektion. **B** Gezeigt sind die Mittelwerte aus **A** als Säulengraphen mit der Standardabweichung und der Angabe von n unabhängigen Experimenten.

Infektion bleibt hinsichtlich der vorliegenden Ergebnisse ungeklärt. Trotzdem liegt die Vermutung nahe, dass IFNL eine zentrale Rolle bei respiratorischen Virusinfektionen einnimmt. Diese Vermutung gründet sich auf eine Reihe von Erkenntnissen, die in den letzten Jahren gemacht wurden; Wie in 3.2.1.3 beschrieben, verursacht die Infektion von humanen Lungenepithelzellen mit Rhinoviren oder Influenza A eine stark erhöhte Expression von IFNL [90]. Mordstein et al. zeigte schon im Jahr 2010 die

unverzichtbare antivirale Funktion von IFNL in virusinfizierten Mäusen. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass in Mäusen mit einem genetisch induzierten IFNL- und Typ-I-Interferon-Rezeptordefekt sowohl deutlich höhere Viruskonzentrationen als auch eine deutlich höhere Virulenz vorlagen. Diese Beobachtung galt gleichermaßen für die Infektion mit dem Influenza A Virus, dem Influenza B Virus, dem Respiratory-Syncytial-Virus und einem Coronavirus [86]. Auch im Hinblick auf die Therapie der Infektion von SARS-COV-2 wurden Typ-III-Interferone bereits näher untersucht. Dabei könnte IFNL sogar als Therapeutikum in Frage kommen. In einer Placebo-kontrollierten, randomisierten Studie (RCT) mit 60 Patienten untersuchte Feld et al. den Effekt von 180µg subkutan injiziertem Peg-IFNL1 auf den Krankheitsverlauf ambulanter Patienten. Hier konnte eine deutliche Abnahme der Viruslast ab dem dritten Tag der Behandlung bei den Patienten der IFNL1-Gruppe im Vergleich zur Placebogruppe festgestellt werden. Dabei war der Effekt des Zytokins bei Patienten mit einer initial hohen Viruslast besonders stark. Hier war der Anteil an Patienten der IFNL1-Gruppe ohne nachweisbares Virus am siebten Tag etwa doppelt so hoch wie der Anteil der Patienten der Placebogruppe [200]. In einer weiteren RCT mit vergleichbarem Studiendesign kam Jagannathan et al. jedoch zu einem anderen Ergebnis. Die 120 untersuchten Patienten zeigten im Krankheitsverlauf keine signifikanten Unterschiede zwischen der IFNL1-Gruppe und der Placebogruppe [201]. Trotz dieser heterogenen Ergebnisse verdichten sich die Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der IFNL-Expression bzw. der IFNL-Serumkonzentration und der Schwere des Krankheitsverlaufs von COVID-19. Mehrmals konnte bereits eine erniedrigte IFNL-Serumkonzentration bei Patienten mit einem schweren Verlauf dieser Erkrankung festgestellt werden [202], [203]. Auf mRNA-Ebene wurde ebenfalls eine erniedrigte Expression für diese Patientengruppe beobachtet [204]. In Anbetracht der Forschungsergebnisse in der oben aufgeführten Literatur und der antiviralen Aktivität von IFNL in MLE-12 (siehe 7.1.3.2) kann die Hypothese einer bedeutenden Funktion dieses Zytokins in Lungenepithelzellen nicht von der Hand gewiesen werden. Zukünftige Arbeiten werden zu einem besseren Verständnis der Funktionen von IFNL im Kontext von respiratorischen Virusinfektionen beitragen.

Wie bereits im ersten Absatz der Diskussion (siehe 8.1) beschrieben sind Alveolarmakrophagen ein essenzieller Bestandteil der pulmonalen Pathogenabwehr. Deswegen wurden im Rahmen dieser Arbeit murine Alveolarmakrophagen MH-S *in vitro* mit MHV-68 infiziert und auf die Expression von IFNL und den IFNL-Rezeptor IL28Ra untersucht.

Auf den ersten Blick zeigten MH-S eine Hochregulation von IFNL nach MHV-68-Infektion. Diese Regulation fand jedoch auf einem vergleichsweise niedrigen Expressionsniveau von unter 1×10^{-7} im Vergleich zum Housekeeper β -actin statt. Auch die statistische Analyse ergab keine Signifikanz. Folglich konnte in diesem Zelltyp keine relevante Expressionsregulation des Zytokins durch die Virusinfektion festgestellt werden.

Trotz dieses Ergebnisses könnte es sein, dass eine antivirale Aktivität durch die Infektion von MH-S ausgelöst wurde, hier aber nicht nachgewiesen werden konnte. Begründen lässt sich diese Annahme anhand der Erkenntnisse aus Forschungsarbeiten der vergangenen Jahre. Hier konnte beispielsweise eine antivirale Wirkung von IFNL gegen das PRRSV-Virus in primären Alveolarmakrophagen von Schweinen nachgewiesen werden [94]. Zudem ist IFNL vermutlich ein wichtiges Bindeglied zwischen Makrophagen und Lymphozyten im Rahmen der Pathogen-Abwehr [95], was sie als Teil der Immunantwort unverzichtbar macht.

In ersten Experimenten zu diesem Thema könnte in Zukunft die antivirale Aktivität von IFNL in MH-S oder anderen Alveolarmakrophagen gemessen werden. Dieser Ansatz ist insofern vielversprechend, als dass in dieser Arbeit bereits ein funktionaler IFNL-Rezeptor durch die IFNL-induzierte ISG-Expression in MH-S nachgewiesen werden konnte (siehe 7.2.2.3). Als etablierte Methode kommt hier beispielsweise der Plaque-Assay in Frage. So könnte mit Hilfe der Darstellung des Viruswachstums untersucht werden, ob IFNL in MH-S eine signifikante antivirale Aktivität gegen MHV-68 auslöst.

8.1.1.2. Co-Kultorexperimente

Das Experiment mit LA-4 und MH-S in Co-Kultur lieferte im Vergleich zu den Einzelzellkultorexperimenten keine neuen Erkenntnisse. Auch in Co-Kultur funktionierte die Infektion mit MHV-68, was durch die Hochregulation der Positivkontrollgene bestätigt wurde. Es fand jedoch keine relevante Regulation von IFNL statt.

Im Hinblick auf die starke IFNL-Expression in murinem Lungengewebe nach MHV-68-Infektion und die ausbleibende Regulation von IFNL in Einzelzellkultur und in Co-Kultur könnte das in vitro-Modell eine Limitation für Experimente dieser Art darstellen. Aufgrund der bedeutenden Vorteile bezüglich der Komplexität, der Kosten und des Zeitaufwandes sollten in vitro Experimente in diesem Zusammenhang jedoch nicht gänzlich verworfen werden. Unter Berücksichtigung aktueller Forschungsarbeiten und der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist es durchaus denkbar, dass andere Epithel- und Makrophagenzelltypen eine Regulation von IFNL nach MHV-68-Infektion zeigen.

8.1.1.3. In vivo Lungengewebe

Die erste wichtige Entdeckung dieser Arbeit lieferte die Gen-Expressionsanalyse von homogenisiertem murinem Lungengewebe nach MHV-68-Infektion. Die starke Hochregulation von IFNL an Tag 3 und Tag 5 nach Infektion ist der erste experimentelle Nachweis einer MHV-68-induzierten IFNL-Produktion in der Lunge in vivo.

Allerdings ist nicht klar, welcher Zelltyp für die IFNL-Expression verantwortlich ist. Auch die genaue Funktion dieser Zytokin-Antwort wurde noch nicht untersucht. In Anbetracht der bisher bekannten Eigenschaften von IFNL ist es jedoch wahrscheinlich, dass das Zytokin eine Funktion bei der Immunantwort gegen MHV-68 einnimmt [82], [86], [90]. Weitere in vivo Experimente dieser Art sollten durchgeführt werden, um die MHV-induzierte IFNL-Expression zu validieren. Zudem könnten Experimente zur antiviralen Wirksamkeit von IFNL in murinem Lungengewebe durchgeführt werden. Dabei könnte untersucht werden, ob eine intranasale oder intratracheale IFNL-Behandlung der Mäuse einen Effekt auf die intrapulmonale Virusreplikation hat. Als Methode könnte dafür der Plaque-Assay dienen.

Aufgrund der beachtlichen Hochregulation von IFNL nach MHV-68-Infektion stellt sich zudem die Frage, ob dieses Zytokin auch im Rahmen von degenerativ-fibrotischen Prozessen in der Lunge von Bedeutung ist. Wie bereits in 3.3.7 erläutert, haben Typ-II-Interferone eine durchaus entscheidende Rolle bei der Fibroseentstehung im Mausmodell [20]. Zudem zeigen jüngste Forschungsergebnisse, dass auch IFNL eine Rolle bei der Fibroseentstehung einnehmen könnte [7]–[9]. Zudem besteht der Verdacht, dass Virusinfektionen an der IPF-Pathogenese beteiligt sind (siehe 3.1.2).

Auffallend ist, dass das Gen für IFNL schon in den ersten Tagen nach Infektion erhöht exprimiert wurde aber nach Wochen und Monaten keine weitere Regulation zeigte. Die Lungenfibrose im Rahmen einer MHV-68-Infektion erfolgt im Mausmodell erst nach Wochen bis Monaten [20], [21] und macht eine bedeutende Rolle von IFNL in diesem Zusammenhang eher unwahrscheinlich. Somit ist die akute Virusabwehr durch IFNL hier möglicherweise relevanter als ein fibrotischer Prozess. Ob IFNL an fibrotischen Prozessen unabhängig von der MHV-68-Infektion partizipiert, wird in Zusammenhang mit den Stimulationsexperimenten diskutiert (siehe 8.2).

8.1.2. Die antivirale Wirksamkeit von IFNL

Nachdem die Expressionsanalyse von in vivo Lungengewebe einen offensichtlichen Zusammenhang zwischen Virusinfektion und der gesteigerten IFNL-Expression ergab, erschien auch eine antivirale Wirkung von IFNL gegen MHV-68 naheliegend. Dabei kamen Lungenepithelzellen am ehesten als Effektoren der IFNL-Wirkung in Frage [154], [198]. Aus diesem Grund wurden die Lungenepithelzellen LA-4 und MLE-12 mit Hilfe des Plaque-Assay bezüglich des Einflusses von IFNL auf die Virusreplikation bis zum 5. Tag nach Infektion untersucht.

Interessanterweise lieferten die Experimente der beiden Lungenepithelzelltypen sehr unterschiedliche Ergebnisse. In LA-4 konnte die lytische Virusreplikation und die Infektion benachbarter Zellen durch IFNL nicht gehemmt werden. Im Kontrast dazu bewirkte IFNL in MLE-12 eine deutliche Reduktion der Viruslast ab dem 2. Tag nach Infektion. Beide dieser Beobachtungen konnte durch die statistische Analyse bestätigt werden.

Grund für die fehlende Wirkung des Zytokins in LA-4 war sicherlich eine sehr schwache oder die nicht vorhandene IFNL-Rezeptorexpression. Diese Annahme begründet sich auf den folgenden zwei Beobachtungen; Erstens war das Expressionsniveau des IFNL-Rezeptors IL28Ra in LA-4 etwa um das 300-fache niedriger als in MLE-12. Das Expressionsniveau liegt somit wahrscheinlich in einem Bereich, der für die Expression einer, für die Funktionalität ausreichenden, Anzahl von Rezeptoren an der Zelloberfläche zu niedrig ist. Zweitens konnte in der FACS-Analyse gezeigt werden, dass LA-4 keine oder nur sehr wenige IFNL-Rezeptoren auf der Zelloberfläche exprimiert, da keine Färbung mit dem IL28Ra-Antikörper erzielt wurde.

Somit eignen sich LA-4 Zellen nicht für Stimulationsexperimente mit IFNL. MLE-12 Zellen könnten dagegen als Zelltyp für zukünftige Stimulationsexperimente wichtige Erkenntnisse bei der Erforschung der Effekte von IFNL in vitro liefern. Hinsichtlich der ausgeprägten antiviralen Wirkung von IFNL gegen MHV-68 sollte diese Erkenntnis in weiteren Experimenten in vivo überprüft werden. Dabei könnte, (wie in 7.1.2.3 gezeigt) das etablierte MHV-68-Mausmodell und der Plaque-Assay genutzt werden.

8.2. Stimulationsexperimente

In diesen Experimenten sollte der Einfluss der Typ-III-Interferone auf murine Lungenepithelzellen, murine Lungenfibroblasten und murine Alveolarmakrophagen untersucht werden. Hierfür wurden die Zellen mit IFNL und teils zusätzlich mit TGF- β und IL-4 stimuliert und mit Hilfe der qRT-PCR auf deren Genexpression untersucht.

8.2.1. Die Expression von EMT- und Fibrosemarkern durch Stimulation mit IFNL

Zunächst wurden Experimente durchgeführt, die einen Zusammenhang zwischen IFNL-Stimulation und der Expression von EMT- und Fibrosemarkergenen aufdecken sollten. Entsprechend der Erkenntnis, dass sich die IFNL-Wirkung vor allem in Epithelzellen entfaltet [154], [198], wurden für diese Experimente die Lungenepithelzellen MLE-12 und LA-4 herangezogen. Zusätzlich wurden die Stimulationsexperimente mit murinen Lungenfibroblasten CCL-206 durchgeführt. Hierbei sollte auf genetischer Ebene untersucht werden, ob Lungenfibroblasten auf die IFNL-Stimulation mit der Produktion von extrazellulärer Matrix reagieren und ob Lungenepithelzellen im Rahmen der EMT das Genexpressionsmuster eines mesenchymalen Zelltyps annehmen.

8.2.1.1. Einzelzellkulturexperimente

Für die Stimulation einzelner Zelltypen mit IFNL wurden in dieser Arbeit murine Lungenepithelzellen und murine Lungenfibroblasten verwendet. Diese Zelltypen sind für die Pathogenese der Fibrose besonders wichtig und sollten in diesen Experimenten zunächst auf ihre Genregulation untersucht werden. Hierfür wurden EMT- und fibrose-typische Gene ausgewählt (siehe **TABELLE 14**). Zu Beginn wurden Experimente zur Dosisfindung durchgeführt. Dabei stellte sich 25ng/ml IFNL als Dosis mit dem wahrscheinlich größten Effekt heraus, die dann für alle folgenden Experimente verwendet wurde.

Der Lungenepithelzelltyp LA-4 zeigte keine Regulationsänderung im Rahmen der IFNL-Stimulation. Es konnte weder eine optimale Dosis noch eine relevante Genregulation im Zeitverlauf festgestellt werden. Erst nach den Stimulationsexperimenten in Einzelzellkultur wurde mithilfe der FACS-Analyse der negative IFNL-Rezeptorstatus festgestellt, der die fehlende Reaktion dieses Zelltyps erklärte. Dieser Befund ist durchaus überraschend, weil der Zelltyp LA-4 zur in vitro Grundlagenforschung im Kontext von Lungenerkrankungen in vielen Arbeitsgruppen etabliert ist [164]. Zudem stellen LA-4 ein verbreitetes in vitro Modell zur Untersuchung von Herpesvirusinfektionen der Lunge sowie der Latenz und Reaktivierung von MHV-68 dar [114]. Auch im Kontext der antiviralen Wirkung von Typ-I-Interferonen werden diese Zellen herangezogen. Dabei sind LA-4 mit Hilfe der Interferone in der Lage, antivirale Mechanismen zu aktivieren und die Viruslast deutlich zu senken [197].

Somit erschien zu Beginn dieser Arbeit auch die Wirksamkeit von Interferon lambda in LA-4 plausibel. Die Erkenntnis der FACS-Analyse über die fehlenden IFNL-Rezeptoren zeigt hier exemplarisch eine der Limitationen von in vitro Modellen. In vitro Zelllinien besitzen nicht alle Eigenschaften von primären Zellen. Die Aussagekraft von in vitro-Experimenten ist daher begrenzt. LA-4 kann folglich nicht für Experimente, die die Wirkung von IFNL in murinen Lungenepithelzelltypen untersuchen sollen, verwendet werden.

Im Hinblick auf zukünftige Arbeiten mit Interferonen sollte in diesem Zusammenhang eine Erkenntnis aus den vergangenen Jahren berücksichtigt werden. Auch bei homogen angelegten Zellpopulationen scheint es Unterschiede bezüglich der Reagibilität auf Interferone zu geben. Trotz nachweislicher IFN-Rezeptor-Expression und identischen Kulturbedingungen kommt es vor, dass die Zellen einer Kultur unterschiedlich auf Interferone reagieren. Diese Beobachtungen wurde mit Typ-I- und Typ-III-Interferonen in unterschiedlichen Epithelzellen und Fibroblasten gemacht. Diese heterogene Interferon-Antwort scheint mit der fluktuierenden Konzentration an Substraten der Interferon-Signalkaskade wie IRF9 oder ISGF3 zusammenzuhängen [70], [205]–[210].

Im Gegensatz zu LA-4 reagierte der Lungenepithelzelltyp MLE-12 sensibel auf IFNL. Zunächst konnte durch die Hochregulation der Positivkontrollgene die Funktionalität des rekombinanten IFNL bestätigt werden. Auch die Markergene der EMT, Collagen Typ-1 und N-Cadherin, waren nach Stimulation erhöht. Die Expression von E-Cadherin war ebenfalls erhöht. Dieses Expressionsmuster ist ein überraschendes Ergebnis, weil die Expression der beiden Cadherine im Normalfall nicht gleichgerichtet ist. In der Regel wird E-Cadherin im Rahmen der EMT erniedrigt exprimiert, weil die betroffenen Epithelzellen die Zellkontakte zu benachbarten Zellen und zur Basalmembran verlieren [24], [25]. Bei der EMT kommt es klassischerweise zur Umwandlung von Epithelzellverbänden in mesenchymale Zellen, die von einer Erniedrigung des Adhäsionsproteins E-Cadherin und einer Erhöhung der N-Cadherin- und Collagenexpression begleitet wird [26]–[29]. Eine gleichsinnig erhöhte Expression der beiden Cadherine könnte für ein Übergangsstadium sprechen, das beispielsweise in Krebszellen beobachtet werden konnte. In diesem Stadium sind sowohl epitheliale als auch mesenchymale Marker erhöht und eine eindeutige Phänotypisierung dieser Zellen ist nicht möglich. Beispielsweise können Tumorzellen dieses Übergangsstadium dazu nutzen, um als lockere Zellverbände in die Blutbahn überzugehen und anderenorts Metastasen auszubilden [30], [40].

Ob dieser Effekt nur zufällig vorlag oder repräsentativ für diesen Zelltyp nach IFNL-Stimulation ist, muss in weiteren Wiederholungen dieses Experiments untersucht werden.

Auch die untersuchten Lungenfibroblasten CCL-206 zeigten eine Regulation der untersuchten Gene nach IFNL-Stimulation. Die Positivkontrollgene reagierten sowohl in den Dosisfindungsexperimenten als auch in den Timecourse-Experimenten sensibel auf IFNL. Zudem konnte eine signifikante Hochregulation von E-Cadherin nach 24h festgestellt werden.

Diese Hochregulation ist überraschend, weil E-Cadherin im Normalfall nicht in Fibroblasten, sondern in Epithelzellen zur Aufrechterhaltung der Zellkontakte eine Rolle spielt. Im Epithel wird es bei der EMT und Fibrose erniedrigt exprimiert und ist so für die Loslösung der Epithelzellen von der Basalmembran und deren Umwandlung in einen mesenchymalen Phänotyp mitverantwortlich [25]. Wird E-Cadherin erhöht exprimiert, werden vermehrt Zellkontakte ausgebildet, sodass die Zellen im Verlauf einen polaren, epithelialen Phänotyp annehmen. Dieser Mechanismus passt zur sogenannten MET (Mesenchymal-Epithelial-Transition), dem Gegenstück zur EMT, bei dem unpolare Mesenchymzellen die Eigenschaften von baso-apikal polarisierten Epithelzellen annehmen.

Auch in der Literatur finden sich Hinweise auf eine erhöhte Expression von E-Cadherin im Rahmen der MET. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass E-Cadherin im Rahmen einer MET-Induktion in humanen Brustkrebszellen hochreguliert war [31], [32]. Allerdings scheint es auch Mischformen in bestimmten Krebszellen zu geben, sodass nicht immer von einem rein epithelialen oder mesenchymalen Phänotyp gesprochen werden kann [30].

Bezüglich Fibroblasten, die im Rahmen der MET E-Cadherin exprimieren, finden sich in der Literaturrecherche nur wenige Arbeiten. Beispielsweise konnte im Jahr 2006 die MET mit einer Erhöhung von E-Cadherin in embryonalen Mausfibroblasten in Zusammenhang gebracht werden [36]. Murine Lungenfibroblasten wurden in diesem Zusammenhang noch nicht untersucht. Der Fokus von zukünftigen Experimenten sollte daher auf der Analyse der Genexpression von murinen Lungenfibroblasten im Rahmen der MET-Induktion liegen. Auch die Frage nach der biologischen Relevanz, die sich im Hinblick auf die hier fehlende Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit ergibt, könnte durch weitere Experimente beantwortet werden.

8.2.1.2. Co-Kultorexperiment

Das Co-Kultorexperiment von LA-4 und MH-S zeigte ähnliche Ergebnisse wie die Monokultur beider Zelltypen. Allerdings fiel eine relevante Erhöhung der Expression von E-Cadherin in diesem Experiment auf.

Demnach stellte sich die Frage, welcher Zelltyp für die erhöhte Expression dieses Adhäsionsproteins verantwortlich ist. Der Blick auf die bisherigen Ergebnisse macht klar, dass die E-Cadherin-Expression in LA-4 durch IFNL-Stimulation weder in Einzelzellkultur noch in Co-Kultur reguliert wird. E-Cadherin wurde in den Dosisfindungsexperimenten nur in LA-4 untersucht, wobei sich nur eine nicht signifikant erniedrigte Expression dieses Adhäsionsproteins zeigte. In den Timecourse-Experimenten war es in LA-4 relevant erhöht, eine statistische Analyse konnte aufgrund der geringen Wiederholungszahl jedoch nicht durchgeführt werden. Das niedrige Expressionsniveau spricht in diesen Experimenten jedoch am ehesten für eine biologisch nicht relevante Expressionserhöhung.

Folglich kann die E-Cadherin-Expressionserhöhung dieses Experiments nur durch MH-S verursacht worden sein. Auch in der Forschungsliteratur finden sich einige Arbeiten, die die Bedeutung von E-Cadherin als Adhäsionsmolekül in Alveolarmakrophagen bestätigen. Schon im Jahr 2009 konnte E-Cadherin als Marker für die alternative Aktivierung von murinen wie humanen Makrophagen identifiziert werden [211]. Dabei ermöglicht es zusammen mit β -Catenin und p120-Catenin weiteren M2-Makrophagen an der Zelloberfläche haften zu bleiben und mit ihnen zu verschmelzen [212]. Bei

diesem Fusionsvorgang entstehen die sogenannten mehrkernigen Riesenzellen, die für granulomatöse Erkrankungen typisch sind [213]. E-Cadherin ist somit für die immunologische Funktion von Makrophagen essentiell und kann als Markergen für die M2-Polarisation verwendet werden.

Im Hinblick auf die E-Cadherin-Erhöhung nach IFNL-Stimulation im Co-Kulturrexperiment ist dies ein interessantes Ergebnis. Die Alveolarmakrophagen scheinen durch IFNL alternativ aktiviert worden zu sein und könnten damit durch die Bildung profibrotischer Zytokine wie TGF- β eine direkte Verbindung zur Entstehung der IPF darstellen. Erste Hinweise auf diesen Zusammenhang lieferten bereits die Experimente zur IL-4-induzierten Makrophagenpolarisation (siehe 8.2.3)

Dieses Ergebnis muss überprüft werden. Dabei könnten zunächst MH-S in vitro mit IFNL stimuliert werden und die Expression von M2-Markergenen wie Arginase-1 und E-Cadherin bestimmt werden. Zudem sollte überprüft werden, ob die Expression profibrotischer Zytokine wie TGF- β durch alleinige IFNL-Stimulation reguliert wird.

8.2.2. Inhibition der pro-fibrotischen Wirkung von TGF- β

TGF- β stellt eines der Schlüssel-Zytokine in der IPF-Pathogenese dar [59], [60]. Dabei spielt das Zytokin sowohl bei der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten als auch bei der EMT eine essentielle Rolle [12], [13]. In diesen Experimenten wurde durch Stimulation mit TGF- β die Expression von EMT- und Fibrose-Markern in Lungenfibroblasten und Lungenepithelzellen induziert. Dabei wurde untersucht, ob die gleichzeitige Stimulation mit IFNL die TGF- β induzierte Regulation dieser Gene beeinflusst und folglich eine Auswirkung auf die IPF-Pathogenese haben könnte.

In den TGF- β -stimulierten Lungenepithelzellen LA-4 löste IFNL keine Expressionsänderung der untersuchten Gene aus. Dies lässt sich durch die fehlende Rezeptorexpression von LA-4 erklären. Die Wirkung von IFNL auf die Regulation der TGF- β -induzierten Gene in Lungenepithelzellen bleibt demnach unbeantwortet und sollte in Zukunft anhand eines IFNL-sensiblen Lungenepithelzelltyps wie MLE-12 untersucht werden.

In den Lungenfibroblasten löste TGF- β eine deutliche Expressionssteigerung der Fibrosemarker aus. Dabei zeigte sich ein leichter Effekt von IFNL auf die Expression von Fibronectin, Collagen Typ-1 und alpha-SMA. Fibronectin und Collagen Typ-1 wurden nach IFNL-Stimulation weiterhin erhöht exprimiert, es zeigte sich aber eine leichte Reduktion des Expressionsniveaus. Die Expression von alpha-SMA wurde durch IFNL von einer relevanten Hochregulation auf eine nicht-relevante Regulation reduziert. Der Begriff „relevante Regulation“ bezieht sich in dieser Arbeit auf eine Regulationserhöhung um ≥ 2 oder eine Regulationsminderung um $\leq 0,5$, jeweils im Vergleich zur Negativprobe. Eine nicht-relevante Regulation bewegt sich demnach im Bereich $> 0,5$ und < 2 im Vergleich zur Negativprobe.

In der Literatur finden sich bis heute keine Erkenntnisse bezüglich der Funktion von IFNL im Rahmen der TGF- β -induzierten Expression von Fibrosemarkern in murinen Lungenfibroblasten. Somit könnten dies die ersten Hinweise auf eine anti-fibrotische Wirkung von IFNL in murinen Lungenfibroblasten sein, weil diese Zellen im Rahmen der Lungenfibrose Fibronectin, alpha-SMA und Collagen erhöht exprimieren. Grund hierfür ist die vermehrte Bildung extrazellulärer Matrix und die Umwandlung von Fibroblasten zu Myofibroblasten im Rahmen der IPF.

Zur Validierung dieser Ergebnisse sind weitere Experimente dieser Art nötig. Wie bereits erwähnt, wurde in den Stimulationsexperimenten mit IFNL eine Hochregulation von E-Cadherin in Lungenfibroblasten durch Stimulation mit IFNL festgestellt. Dieser Hinweis auf die MET sollte deswegen auch in zukünftigen Experimenten mit Lungenfibroblasten weiter untersucht werden.

8.2.3. Inhibition der IL-4 induzierten Makrophagenpolarisation

Wie in 3.1.2.1 erläutert, spielt die alternative Aktivierung (M2-Polarisierung) von Alveolarmakrophagen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der IPF. Zudem konnte gezeigt werden, dass Induktoren der M2-Polarisierung wie das Th2-Zytokin IL-13 die Produktion von IFNL hemmen können [8]. Die Zusammenhänge zwischen der alternativen Makrophagen-Aktivierung, der Expression fibrotypischer Gene und dem Zytokin IFNL sollten im Rahmen dieser Experimente untersucht werden. Dazu wurden MH-S zunächst mithilfe von IL-4 zu M2-Makrophagen polarisiert und dann mit IFNL stimuliert. Mittels qRT-PCR wurde im Anschluss die Expression der Gene für Arginase-1, TGF- β 1 und TGF- β 2 analysiert.

Durch IL-4 Single-Stimulation zeigte sich eine starke Induktion des Gens für Arginase-1, aber keine relevante Regulation von TGF- β 1 oder TGF- β 2. Die Hochregulation von Arginase-1 ist typisch für M2-polarisierte Makrophagen und bestätigt damit die Wirksamkeit von IL-4 in diesen Experimenten.

Die Stimulation mit IFNL ergab einen interessanten Effekt. Die Expression aller drei Gene wurde durch IFNL2 und durch die Kombination aus IFNL2&3 erhöht, nicht aber durch IFNL3 allein. Eine relevante Erhöhung der Expression von Arginase-1 entspricht in diesem Zusammenhang am ehesten einer agonistischen Wirkung von IFNL auf die M2-Polarisierung. Die Expressionssteigerung von TGF- β 1 und TGF- β 2 ist als Zeichen einer profibrotischen Aktivität von IFNL zu sehen. Die überraschende Erkenntnis, dass IFNL3 im Gegensatz zu IFNL2 keine Expressionserhöhung der drei genannten Gene auslöst, wurde durch eine Literaturrecherche überprüft. Hierbei fanden sich Hinweise auf spezielle Funktionen einzelner IFNL-Subtypen;

Es ist bereits bekannt, dass zwischen den IFNL-Subtypen in der Maus wie im Menschen teils große Unterschiede hinsichtlich der Expression und Wirkungsweise bestehen. In der Maus exprimieren beispielsweise von den vier existierenden IFNL-Genen nur die Gene für IFNL2 und IFNL3 funktionale Proteine [80]. Die Kenntnis über unterschiedliche Funktionen der beiden murinen Zytokine bleibt jedoch limitiert. Im Menschen wurde dagegen von einer speziellen Funktion von IFNL4 berichtet. Dabei haben spezielle Single-Nukleotid-Polymorphismen des IFNL4-Gens großen Einfluss auf die Expression und Wirkung des Zytokins im Rahmen einer Infektion mit Hepatitis C [214], [215].

In Anbetracht dieser Erkenntnisse ist es denkbar, dass die beiden funktionellen IFNL-Subtypen in der Maus heterogene Expressions- und Wirkmechanismen besitzen. Das oben beschriebene Ergebnis könnte somit ein Hinweis darauf sein, dass nur IFNL2 eine Rolle bei der Makrophagen-Polarisation einnimmt. Entsprechend der Expressionserhöhung von Arginase-1, TGF- β 1 und TGF- β 2 wäre IFNL2 am ehesten eine Wirkung zugunsten fibrotischer Prozesse und der alternativen Makrophagen-Aktivierung zuzuschreiben. Allerdings wurde hier nur eine geringe Anzahl von Genen (Arginase-1, TGF- β 1 und TGF- β 2) untersucht, wodurch die Aussagekraft dieser Experimente limitiert ist. Jüngste Forschungsergebnisse zeigen, dass humanes, rekombinantes IFNL 3 und IFNL4 die M1-Polarisation in menschlichen Makrophagen auslösen können [71], [216]. Über eine Funktion von IFNL im Rahmen der alternativen Aktivierung von Makrophagen wurde jedoch noch nicht berichtet. Somit könnte dieses Ergebnis der erste Hinweis auf eine verstärkende Wirkung von IFNL auf die alternative Aktivierung von Makrophagen sein. Dieser Hinweis wird durch die nachgewiesene Expressionserhöhung von E-Cadherin untermauert. E-Cadherin ist ein Marker der M2-Polarisierung und bestätigte in dem oben genannten Co-Kulturexperiment möglicherweise die alternative Aktivierung von MH-S durch IFNL (siehe 8.2.1.2).

In der Zusammenschau mit den Stimulationsexperimenten mit TGF- β ergibt sich ein heterogener Effekt von IFNL in Alveolarmakrophagen und Lungenfibroblasten. Das Zytokin verstärkt einerseits die

TGF- β -Expression in bereits M2-polarisierten Makrophagen, andererseits hemmt es die TGF- β -induzierte Genexpression in Lungenfibroblasten.

Eine mögliche Ursache dieser heterogenen Wirkung von IFNL könnte darin begründet sein, dass im Zeitverlauf unterschiedliche Zelltypen an der Fibrogenese beteiligt sind, die sich gegenseitig bei der TGF- β -Produktion ablösen. Somit müsste es einerseits stimulierende als auch inhibierende Effekte auf die Bildung dieses Zytokins geben.

Während der IPF-Pathogenese wird TGF- β vor allem von Makrophagen, Lungenepithelzellen und Fibroblasten gebildet. Dabei konnte im Bleomycin-Mausmodell gezeigt werden, dass in den ersten Tagen der Fibroseentstehung zunächst Lungenepithelzellen und Makrophagen die TGF- β -Produktion übernehmen. Danach war das Zytokin vor allem in Myofibroblasten und Fibroblasten zu finden [217]–[219]. Der genaue zeitliche Ablauf der IPF-Pathogenese außerhalb des Bleomycin-Mausmodells wird jedoch nach wie vor kontrovers diskutiert [220]. Auch Infektionen der Lunge mit Gammaherpesviren wie dem Epstein-Barr-Virus stehen im Verdacht, die TGF- β -Produktion zu verstärken [221]. Hierbei könnte wiederum IFNL als beeinflussender Faktor in Frage kommen.

Zusammenfassend findet sich in der Literatur keine eindeutige Erklärung für die heterogene Wirkung von IFNL in diesen Experimenten. Somit bleibt die genaue Charakterisierung von IFNL in diesem Kontext Aufgabe zukünftiger Forschungsarbeiten. Dabei könnten *in vivo*-Experimente am Mausmodell Aufschluss darüber geben, ob IFNL einen agonistischen oder antagonistischen Effekt auf die IPF-Pathogenese hat.

Die Aussagekraft dieses Experiments ist durch die geringe Auswahl an untersuchten Genen limitiert. Daher sollten zukünftige Experimente den Fokus auf die Expressionsanalyse weiterer Gene legen, die mit der Fibroseentstehung und der M2-Polarisation in Zusammenhang stehen. Außerdem sollte der heterogene Einfluss der IFNL-Subtypen auf die Makrophagenpolarisation und deren Expressionsregulation *in vitro* untersucht werden.

9. Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Betreuer und Doktorvater Prof. Dr. Heiko Adler für das Vertrauen und die Möglichkeit der Anfertigung dieser Arbeit danken. Besonderes das enge und angenehme Betreuungsverhältnis haben mir sehr geholfen Problemstellungen und Fragen zügig zu klären.

Auch Beatrix Steer gilt mein besonderer Dank für die Einarbeitung und Hilfestellung bei praktischen Tätigkeiten im Labor. Trotzdem meine tausend Fragen zu Beginn überwältigend schienen, hatte ich durch sie stets eine erfahrene Ansprechpartnerin an der Werkbank.

Auch meinem Kollegen Zakir Chew danke ich für die Einarbeitung und die Erläuterung der Funktion einiger Laborgeräte sowie für den regen und freundschaftlichen Austausch.

Zudem möchte ich dem Helmholtz Zentrum München und dem Comprehensive Pneumology Center München für die finanzielle Förderung und die Möglichkeit danken im CPC bioarchive mitwirken zu dürfen. Auch PD Dr. Claudia Staab-Weijnitz und allen Beteiligten an der CPC research school möchte ich meinen Dank aussprechen. Die Teilnahme an der research school war für mich eine der größten Lernerfahrungen in dieser Zeit.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die es mir ermöglichte, diesen Bildungsweg zu wählen. Ohne sie hätte ich dieses Niveau meiner akademischen Ausbildung niemals erreicht. Zuletzt möchte ich meiner Frau für die unermüdliche Geduld und die Entbehrungen danken, die Sie mir während meiner Promotion entgegengebracht hat.

10. Abkürzungsverzeichnis

A

ACK-Puffer _____ Ammoniumchlorid-Kalium-Lysepuffer
 AEC-II _____ alveoläre Epithelzellen Typ 2
 AIP _____ akute interstitielle Pneumonie
 AT2 _____ alveolar type 2 cells

B

BHK-21 _____ baby hamster kidney cell 21
 BOP _____ bronchiolitis obliterans
 BSA _____ bovines Serumalbumin

C

CAM _____ Chorio-Allantios-Membranen
 cDNA _____ complementary DNA
 CMV _____ Zytomegalievirus
 COP _____ kryptogene organisierende Pneumonie
 COVID-19 _____ coronavirus disease 2019
 CPE _____ zytopathischer Effekt

D

ddH₂O _____ doppelt destilliertes Wasser
 DIP _____ desquamative interstitielle Pneumonie
 DMSO _____ Dimethylsulfoxid
 DNA _____ Desoxyribonukleinsäure
 dNTPs _____ Desoxynukleotidtriphosphate
 dsDNA _____ doppelsträngige-DNA
 dsRNA _____ doppelsträngige RNA

E

EBV _____ Epstein-Barr-Virus
 EEHV-1 _____ Proboscivirus
 EMT _____ epitheliale-mesenchymale-Transition
 ER _____ endoplasmatisches
 Retikulum

F

FACS _____ fluorescence-activated-cell-sorting
 FBS _____ fetal bovine serum
 Fc-Rezeptoren _____ Rezeptoren für das "crystalline fragment"
 FCS _____ fetal calf serum
 FSC _____ forward-scatter

G

GAF _____ gamma-interferon-activation-factor
 GAS _____ gamma-interferon-activation-site

H

HBV _____ Hepatitis-B-Virus
 HCC _____ hepatozelluläres Karzinom
 HHV-6 _____ Roseolovirus oder humanes Herpesvirus 6
 HRCT _____ hochauflösenden Computertomographie
 HSV _____ Herpes-simplex-Virus

I

IAV	Influenza-A-Virus
IBV	Influenza-B-Virus
IFI44	interferon-induced protein 44
IFIT	IFN-induced-proteins-with-tetratricopeptide-repeats
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon-alpha-Rezeptor
IFNGR	Interferon-Gamma-Rezeptor
IFNgRKO	Typ-II-Interferon-Rezeptor-Knockout
IFNL	Interferon lambda
IgG	Immunglobulin G
IL-10R	Interleukin-10-Rezeptor
IL-13	Interleukin-13
IL-28Ra	Interleukin-28-Rezeptor-alpha
ILE	interstitielle Lungenerkrankung
iMEL	hitze-inaktiviertes Melbourne Influenza A -Virus
IPF	idiopathische Lungenfibrose
IRF7	interferon-regulatory-factor-7
IRF9	IFN-regulatory-factor-9
ISG	interferon-stimulated-genes
ISG15	interferon-stimulated-gene 15
ISGF3	Interferon-stimulated gene factor 3
ISRE	interferon-sensitive-response-element

J

JAK1	Janus-aktivierte-Kinase-1
------	---------------------------

K

KSHV	Kaposi's-Sarkoma-associated-herpesvirus
------	---

L

LPS	Lipopolysaccharide
-----	--------------------

M

MCMV	Muromegalovirus
MET	mesenchymale-epitheliale-Transition
MHV-68	murines Gammaherpesvirus 68
MOI	multiplicity of infection
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MuHV-4	murines Herpesvirus 4

N

NADPH	Nicotinamadeninindinukleotidphosphat
NF-κB	nuclear-factor-kappa-light-chain-enhancer-of-activated-B-cells
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NSIP	Nicht-spezifische interstitielle Pneumonie

O

ORF36	open-reading-frame 36
-------	-----------------------

P

PAMPs	pathogen-associated-molecular-patterns
PBS	phosphate-buffered saline
PFU	plaque forming units
PPP-RNA	RNA, die eine 5'-Triphosphat-Gruppe enthält
PRR	pattern-recognition-receptor
PRRSV	porcine-reproductive-and-respiratory-syndrome virus

R

RB-ILD _____ Respiratory-Bronchiolitis-Interstitial-Lung-Disease
REF _____ Rabbit-Embryo-Fibroblast-Zellen
resuspendiert _____ Vermischung einer Suspension mithilfe wiederholten Pipettierens
RLR _____ RIG-I-Like-Rezeptoren
ROS _____ reactive oxygen species
RSAD2 _____ radical SAM domain-containing 2
RSV _____ Respiratory-Syncytial-Virus

S

SNPs _____ single-nucleotide-polymorphisms
SSC _____ side-scatter
STAT1 _____ signal-transducer-and-activator-of-transcription 1

T

TGF- β _____ transforming-growth-factor-beta
TK2 _____ Tyrosinkinase 2
TNF-alpha _____ Tumornekrosefaktor-alpha

U

UIP _____ usual interstitial pneumonitis
UPR _____ unfolded protein response
USP18 _____ ubiquitin specific peptidase 18

V

VZV _____ Varizella Zoster Virus

11. Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: ÜBERSICHT DER IDIOPATHISCHEN INTERSTITIELLEN PNEUMONIEN, ANGEPASST AUS [46].	17
TABELLE 2: ÜBERSICHT ÜBER DIE SYNONYME DER INTERFERON-FAMILIE	21
TABELLE 3: ÜBERSICHT ÜBER DIE INTERFERON-REZEPTOREN, DEREN UNTEREINHEITEN UND ABKÜRZUNGEN	26
TABELLE 4: GERÄTE GELISTET NACH MODELL UND HERSTELLER	35
TABELLE 5: PRIMERSEQUENZEN MIT DER JEWELIGEN LITERATURANGABE „M“= MURIN	36
TABELLE 6: SOFTWARE GELISTET NACH NAME, ANWENDUNG UND HERSTELLER	36
TABELLE 7: REAGENZIEN GELISTET NACH HERSTELLER	37
TABELLE 8: VERBRAUCHSMATERIALIEN GELISTET NACH HERSTELLER	38
TABELLE 9: ZELLTYPEN, DEREN MORPHOLOGIE, ZUGEHÖRIGKEIT ZU GEWEBETYPEN UND ORGANISMEN SOWIE DEREN EIGENSCHAFTEN	39
TABELLE 10: ZELLTYPEN, DEREN NÄHRMEDIEN SOWIE DIE ZUSAMMENSETZUNG	40
TABELLE 11: REAGENZIEN UND DEREN VOLUMINA PRO	44
TABELLE 12: ABLAUF EINER PCR UND DEREN EINTEILUNG IN STADIUM,	45
TABELLE 13: UNTERSUCHTE GENE DER INFEKTIONSEXPERIMENTE	52
TABELLE 14: UNTERSUCHTE GENE DER STIMULATIONSEXPERIMENTE	61
TABELLE 15: ÜBERSICHT ÜBER DIE ERKENNTNISSE DIESER ARBEIT	80

12. Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: BESCHREIBUNG DER IPF-PATHOGENESE	19
ABBILDUNG 2: TYP-I, TYP-II UND TYP-III-INTERFERON INDUZIERTER REZEPTORAKTIVIERUNG UND DER JAK-STAT-SIGNALWEG	22
ABBILDUNG 3: SCHEMATISCHE ÜBERSICHT ÜBER DIE ANTIVIRALE WIRKUNG EINIGER ISGS (ROT).	27
ABBILDUNG 4: DARSTELLUNG EINES HERPES-VIRIONS AM BEISPIEL VON MHV-68.	30
ABBILDUNG 5: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES INFEKTIONSZYKLUS VON MHV-68.	31
ABBILDUNG 6: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES FACS CALIBUR STANDARD OPTIKSYSTEMS.	48
ABBILDUNG 7: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINER PIPETTIERVORLAGE FÜR DIE FACS-ANALYSE	49
ABBILDUNG 8: FLUSSDIAGRAMM DER INFEKTIONSEXPERIMENTE	51
ABBILDUNG 9: GENEXPRESSION VON LA-4, MH-S UND MLE-12 NACH INFEKTION MIT MHV-68	54
ABBILDUNG 10: GENEXPRESSION VON LA-4 UND MH-S IN CO-KULTUR NACH INFEKTION MIT MHV-68	55
ABBILDUNG 11: EXPRESSION VON IFNL UND IL28RA IN WILD-TYP-UND IFN γ KO-MÄUSEN NACH INFEKTION MIT MHV-68	57
ABBILDUNG 12: DARSTELLUNG DER ANTIVIRALEN WIRKSAMKEIT VON IFNL IN LA-4 UND MLE-12	59
ABBILDUNG 13: FLUSSDIAGRAMM STIMULATIONSEXPERIMENTE	60
ABBILDUNG 14: DOSISFINDUNG VON IFNL2 UND IFNL3 IN LA-4 UND MH-S	64
ABBILDUNG 15: DOSISFINDUNG VON IFNL2 UND IFNL3 IN CCL-206 ZELLEN	65
ABBILDUNG 16: TIMECOURSE DER STIMULATION VON CCL-206 UND LA-4 MIT IFNL2 UND IFNL3	67
ABBILDUNG 17: TIMECOURSE DER STIMULATION VON MLE-12 MIT IFNL2 UND IFNL3	69
ABBILDUNG 18: STIMULATION DER LA-4 UND MH-S ZELLEN MIT IFNL IN CO-KULTUR	71
ABBILDUNG 19: STIMULATION VON LA-4 UND CCL-206 MIT TGF- β UND IFNL	73
ABBILDUNG 20: STIMULATION VON MH-S MIT IL-4 UND IFNL	75
ABBILDUNG 21: FACS-ANALYSE VON MURINEN LEUKOZYTEN	77
ABBILDUNG 22: FACS-ANALYSE VON LA-4 UND MLE-12	78
ABBILDUNG 23: GEN-EXPRESSIONSNIVEAU DES IFNL-REZEPTORS IL28RA	82

13. Literaturverzeichnis

- [1] L. Ye, D. Schnepf, and P. Staeheli, "Interferon- λ orchestrates innate and adaptive mucosal immune responses," *Nature Reviews Immunology*, vol. 19, no. 10, pp. 614–625, Oct. 2019, doi: 10.1038/s41577-019-0182-z.
- [2] S. Koch and S. Finotto, "Role of Interferon- λ in allergic asthma," *Journal of Innate Immunity*, vol. 7, no. 3, pp. 224–230, 2015, doi: 10.1159/000369459.
- [3] M. Contoli *et al.*, "Role of deficient type III interferon- λ production in asthma exacerbations," *Nature Medicine*, vol. 12, no. 9, pp. 1023–1026, 2006, doi: 10.1038/nm1462.
- [4] B. Rauff, A. Amar, S. A. Chudhary, S. Mahmood, G. U. N. Tayyab, and R. Hanif, "Interferon- λ rs12979860 genotype association with liver fibrosis in chronic hepatitis C (CHC) patients in the Pakistani population," *Archives of Virology*, 2021, doi: 10.1007/s00705-020-04901-2.
- [5] N. Moqueet *et al.*, "Responder Interferon λ Genotypes Are Associated with Higher Risk of Liver Fibrosis in HIV-Hepatitis C Virus Coinfection," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 214, no. 1, pp. 80–86, 2016, doi: 10.1093/infdis/jiw088.
- [6] M. Eslam, G. Ahlenstiel, and J. George, "Interferon Lambda and Liver Fibrosis," *Journal of Interferon and Cytokine Research*, vol. 39, no. 10, pp. 627–635, 2019, doi: 10.1089/jir.2018.0175.
- [7] M. Metwally *et al.*, "IFNL3 genotype is associated with pulmonary fibrosis in patients with systemic sclerosis," *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, pp. 1–5, 2019, doi: 10.1038/s41598-019-50709-9.
- [8] A. Moriwaki *et al.*, "IL-13 suppresses double-stranded RNA-induced IFN- λ production in lung cells," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 404, no. 4, pp. 922–927, 2011, doi: 10.1016/j.bbrc.2010.12.082.
- [9] R. L. Gieseck, M. S. Wilson, and T. A. Wynn, "Type 2 immunity in tissue repair and fibrosis," *Nature Reviews Immunology*, vol. 18, no. 1, pp. 62–76, 2018, doi: 10.1038/nri.2017.90.
- [10] F. H. Epstein, W. A. Border, and N. A. Noble, "Transforming Growth Factor β in Tissue Fibrosis," *New England Journal of Medicine*, vol. 331, no. 19, pp. 1286–1292, Nov. 1994, doi: 10.1056/NEJM199411103311907.
- [11] I. E. Fernandez and O. Eickelberg, "The Impact of TGF- β on Lung Fibrosis," *Proceedings of the American Thoracic Society*, vol. 9, no. 3, pp. 111–116, Jul. 2012, doi: 10.1513/pats.201203-023AW.
- [12] P. J. Miettinen, R. Ebner, A. R. Lopez, and R. Derynck, "TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors.," *Journal of Cell Biology*, vol. 127, no. 6, pp. 2021–2036, Dec. 1994, doi: 10.1083/jcb.127.6.2021.
- [13] B. C. Willis and Z. Borok, "TGF- β -induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease," *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 293, no. 3, pp. L525–L534, Sep. 2007, doi: 10.1152/ajplung.00163.2007.
- [14] S. Romagnani, "Th 1/Th2 Cells," *Inflammatory Bowel Diseases*, vol. 5, no. 4, pp. 285–294, 1999.
- [15] A. Shapouri-Moghaddam *et al.*, "Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 233, no. 9, pp. 6425–6440, 2018, doi: 10.1002/jcp.26429.
- [16] Y. Tang *et al.*, "Herpesvirus DNA Is Consistently Detected in Lungs of Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis Herpesvirus DNA Is Consistently Detected in Lungs of Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis," *Journal of clinical microbiology*, vol. 41, no. 6, pp. 2633–2640, 2003, doi: 10.1128/JCM.41.6.2633.
- [17] W. A., S. R.J., D. T.C., F. P.J., D. B. R.M., and N. A.G., "Cryptogenic fibrosing alveolitis: Lack of association with Epstein-Barr virus infection," *Thorax*, vol. 52, no. 10, pp. 888–891, 1997, [Online]. Available: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L27473931>

- [18] C. M. Zamò A, Poletti V, Reghellin D, Montagna L, Pedron S, Piccoli P, "HHV-8 and EBV are not commonly found in idiopathic pulmonary fibrosis," *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.*, 2005.
- [19] R. P. Naikawadi *et al.*, "Telomere dysfunction in alveolar epithelial cells causes lung remodeling and fibrosis," *JCI Insight*, vol. 1, no. 14, pp. 2–12, 2016, doi: 10.1172/jci.insight.86704.
- [20] B. Ebrahimi, B. M. Dutia, D. G. Brownstein, and A. A. Nash, "Murine gammaherpesvirus-68 infection causes multi-organ fibrosis and alters leukocyte trafficking in interferon- γ receptor knockout mice," *American Journal of Pathology*, vol. 158, no. 6, pp. 2117–2125, 2001, doi: 10.1016/S0002-9440(10)64683-4.
- [21] S. A. Tibbetts, L. F. van Dyk, S. H. Speck, and H. W. Virgin, "Immune Control of the Number and Reactivation Phenotype of Cells Latently Infected with a Gammaherpesvirus," *Journal of Virology*, vol. 76, no. 14, pp. 7125–7132, 2002, doi: 10.1128/jvi.76.14.7125-7132.2002.
- [22] M. Orecchioni, Y. Ghosheh, A. B. Pramod, and K. Ley, "Macrophage Polarization : Different Gene Signatures in M1 (LPS +) vs . Classically and M2 (LPS -) vs . Alternatively Activated Macrophages," vol. 10, no. May, pp. 1–14, 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.01084.
- [23] A. Sica and A. Mantovani, "Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 122, no. 3, pp. 787–795, Mar. 2012, doi: 10.1172/JCI59643.
- [24] S. Y. Kyung *et al.*, "Sulforaphane attenuates pulmonary fibrosis by inhibiting the epithelial-mesenchymal transition," *BMC Pharmacology and Toxicology*, vol. 19, no. 1, pp. 1–10, 2018, doi: 10.1186/s40360-018-0204-7.
- [25] N. Rout-Pitt, N. Farrow, D. Parsons, and M. Donnelley, "Epithelial mesenchymal transition (EMT): A universal process in lung diseases with implications for cystic fibrosis pathophysiology," *Respiratory Research*, vol. 19, no. 1, pp. 1–10, 2018, doi: 10.1186/s12931-018-0834-8.
- [26] J. Ma, B. Bishoff, R. R. Mercer, M. Barger, D. Schwegler-Berry, and V. Castranova, "Role of epithelial-mesenchymal transition (EMT) and fibroblast function in cerium oxide nanoparticles-induced lung fibrosis," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 323, pp. 16–25, 2017, doi: 10.1016/j.taap.2017.03.015.
- [27] O. Karicheva *et al.*, "PARP3 controls TGF β and ROS driven epithelial-to-mesenchymal transition and stemness by stimulating a TG2-Snail-E-cadherin axis," *Oncotarget*, vol. 7, no. 39, pp. 64109–64123, Sep. 2016, doi: 10.18632/oncotarget.11627.
- [28] T.-L. Hackett *et al.*, "Induction of Epithelial–Mesenchymal Transition in Primary Airway Epithelial Cells from Patients with Asthma by Transforming Growth Factor- β 1," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 180, no. 2, pp. 122–133, Jul. 2009, doi: 10.1164/rccm.200811-1730OC.
- [29] Z.-C. YANG *et al.*, "Transforming growth factor- β 1 induces bronchial epithelial cells to mesenchymal transition by activating the Snail pathway and promotes airway remodeling in asthma," *Molecular Medicine Reports*, vol. 8, no. 6, pp. 1663–1668, Dec. 2013, doi: 10.3892/mmr.2013.1728.
- [30] M. K. Jolly, "Implications of the Hybrid Epithelial/Mesenchymal Phenotype in Metastasis," *Frontiers in Oncology*, vol. 5, 2015, doi: 10.3389/fonc.2015.00155.
- [31] L. F. Castillo *et al.*, "Glypican-3 induces a mesenchymal to epithelial transition in human breast cancer cells," *Oncotarget*, vol. 7, no. 37, pp. 60133–60154, 2016, doi: 10.18632/oncotarget.11107.
- [32] K. Palen, J. Weber, M. B. Dwinell, B. D. Johnson, R. Ramchandran, and J. A. Gershan, "E-cadherin re-expression shows in vivo evidence for mesenchymal to epithelial transition in clonal metastatic breast tumor cells," *Oncotarget*, vol. 7, no. 28, pp. 43363–43375, 2016, doi: 10.18632/oncotarget.9715.

- [33] W. Xu *et al.*, “Normal Fibroblasts Induce E-Cadherin Loss and Increase Lymph Node Metastasis in Gastric Cancer,” *PLoS ONE*, vol. 9, no. 5, p. e97306, May 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0097306.
- [34] S. G.-D. de Medina *et al.*, “Relationship between E-cadherin and fibroblast growth factor receptor 2b expression in bladder carcinomas,” *Oncogene*, vol. 18, no. 41, pp. 5722–5726, Oct. 1999, doi: 10.1038/sj.onc.1202958.
- [35] D. M. Gonzalez and D. Medici, “Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition,” *Science Signaling*, vol. 7, no. 344, p. re8, Sep. 2014, doi: 10.1126/scisignal.2005189.
- [36] W. Sheng *et al.*, “Versican Mediates Mesenchymal-Epithelial Transition,” *Molecular Biology of the Cell*, vol. 17, no. 4, pp. 2009–2020, Apr. 2006, doi: 10.1091/mbc.e05-10-0951.
- [37] S. Ghavami *et al.*, “Autophagy and the unfolded protein response promote profibrotic effects of TGF- β 1 in human lung fibroblasts,” *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 314, no. 3, pp. L493–L504, Mar. 2018, doi: 10.1152/ajplung.00372.2017.
- [38] B. Hinz *et al.*, “Recent Developments in Myofibroblast Biology,” *The American Journal of Pathology*, vol. 180, no. 4, pp. 1340–1355, Apr. 2012, doi: 10.1016/j.ajpath.2012.02.004.
- [39] M. Korfei *et al.*, “Comparison of the antifibrotic effects of the pan-histone deacetylase-inhibitor panobinostat versus the IPF-drug pirfenidone in fibroblasts from patients with idiopathic pulmonary fibrosis,” *PLOS ONE*, vol. 13, no. 11, p. e0207915, Nov. 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0207915.
- [40] C. Revenu and D. Gilmour, “EMT 2.0: shaping epithelia through collective migration,” *Current Opinion in Genetics and Development*, vol. 19, no. 4, pp. 338–342, Aug. 2009, doi: 10.1016/j.gde.2009.04.007.
- [41] P. J. Wolters *et al.*, “Time for a change: is idiopathic pulmonary fibrosis still idiopathic and only fibrotic?,” *The Lancet Respiratory Medicine*, vol. 6, no. 2, pp. 154–160, Feb. 2018, doi: 10.1016/S2213-2600(18)30007-9.
- [42] G. Herold, *Herold: Innere Medizin 2016*. Köln: Dr. Gerd Herold, 2016.
- [43] J. Hutchinson, A. Fogarty, R. Hubbard, and T. McKeever, “Global incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis: A systematic review,” *European Respiratory Journal*, vol. 46, no. 3, pp. 795–806, 2015, doi: 10.1183/09031936.00185114.
- [44] G. Raghu *et al.*, “Idiopathic pulmonary fibrosis in US Medicare beneficiaries aged 65 years and older: incidence, prevalence, and survival, 2001–11,” *The Lancet Respiratory Medicine*, vol. 2, no. 7, pp. 566–572, Jul. 2014, doi: 10.1016/S2213-2600(14)70101-8.
- [45] D. J. Lederer and F. J. Martinez, “Idiopathic Pulmonary Fibrosis,” *New England Journal of Medicine*, vol. 378, no. 19, pp. 1811–1823, May 2018, doi: 10.1056/NEJMra1705751.
- [46] W. Böhm, M. ; Hallek, M. ; Schmiegel, *Innere Medizin*. München: Elsevier GmbH, 2009.
- [47] “American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias,” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 165, no. 2, pp. 277–304, Jan. 2002, doi: 10.1164/ajrccm.165.2.ats01.
- [48] *Harrisons Innere Medizin*. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag GmbH, 2015.
- [49] T. T. Arasthe, Keikawus; Baenkler, Hans-Wolf; Bieber, Christiane; Brandt, Roland; Chatterjee, *Duale Reihe: Innere Medizin*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2013.
- [50] R. Kalluri and R. A. Weinberg, “The basics of epithelial-mesenchymal transition,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 119, no. 6, pp. 1420–1428, Jun. 2009, doi: 10.1172/JCI39104.
- [51] M. Zeisberg and E. G. Neilson, “Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 119, no. 6, pp. 1429–1437, Jun. 2009, doi: 10.1172/JCI36183.

- [52] N. V. Jordan, G. L. Johnson, and A. N. Abell, "Tracking the intermediate stages of epithelial-mesenchymal transition in epithelial stem cells and cancer," *Cell Cycle*, vol. 10, no. 17, pp. 2865–2873, Sep. 2011, doi: 10.4161/cc.10.17.17188.
- [53] J. J. Egan, A. A. Woodcock, and J. P. Stewart, "Viruses and idiopathic pulmonary fibrosis," *European Respiratory Journal*, vol. 10, no. 7, pp. 1433–1437, 1997, doi: 10.1183/09031936.97.10071433.
- [54] M. Selman, C. López-Otín, and A. Pardo, "Age-driven developmental drift in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis," *European Respiratory Journal*, vol. 48, no. 2, pp. 538–552, 2016, doi: 10.1183/13993003.00398-2016.
- [55] M. Bueno *et al.*, "PINK1 deficiency impairs mitochondrial homeostasis and promotes lung fibrosis," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 125, no. 2, pp. 521–538, 2015, doi: 10.1172/JCI74942.
- [56] J. Grootjans, A. Kaser, R. J. Kaufman, and R. S. Blumberg, "The unfolded protein response in immunity and inflammation," *Nature Reviews Immunology*, vol. 16, no. 8, pp. 469–484, 2016, doi: 10.1038/nri.2016.62.
- [57] S. A. Gharib, R. S. McMahan, W. E. Eddy, M. E. Long, and W. C. Parks, "Transcriptional and functional diversity of human macrophage repolarization," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 143, no. 4, pp. 1536–1548, 2018, doi: 10.1016/j.jaci.2018.10.046.
- [58] K. Hirahara and T. Nakayama, "CD4+ T-cell subsets in inflammatory diseases : beyond the T h 1 / T h 2 paradigm," vol. 28, no. 4, pp. 163–171, 2016, doi: 10.1093/intimm/dxw006.
- [59] L. Zhu, X. Fu, X. Chen, X. Han, and P. Dong, "M2 macrophages induce EMT through the TGF- β /Smad2 signaling pathway," *Cell Biology International*, vol. 41, no. 9, pp. 960–968, 2017, doi: 10.1002/cbin.10788.
- [60] L. Zhang, Y. Wang, G. Wu, W. Xiong, W. Gu, and C. Y. Wang, "Macrophages: Friend or foe in idiopathic pulmonary fibrosis?," *Respiratory Research*, vol. 19, no. 1, pp. 1–10, 2018, doi: 10.1186/s12931-018-0864-2.
- [61] J. Hou *et al.*, "M2 macrophages promote myofibroblast differentiation of LR-MSCs and are associated with pulmonary fibrogenesis," *Cell Communication and Signaling*, vol. 16, no. 1, pp. 1–14, 2018, doi: 10.1186/s12964-018-0300-8.
- [62] T. M. Maher, A. U. Wells, and G. J. Laurent, "Idiopathic pulmonary fibrosis: Multiple causes and multiple mechanisms?," *European Respiratory Journal*, vol. 30, no. 5, pp. 835–839, 2007, doi: 10.1183/09031936.00069307.
- [63] F. J. Martinez, "Acute Exacerbations in Idiopathic Pulmonary Fibrosis," *Annals of Internal Medicine*, vol. 144, no. 3, p. 218, 2006, doi: 10.7326/0003-4819-144-3-200602070-00015.
- [64] M. R. Horton *et al.*, "Thalidomide for the Treatment of Cough in Idiopathic Pulmonary Fibrosis," *Annals of Internal Medicine*, vol. 157, no. 6, p. 398, Sep. 2012, doi: 10.7326/0003-4819-157-6-201209180-00003.
- [65] B. F. Collins and G. Raghu, "Antifibrotic therapy for fibrotic lung disease beyond idiopathic pulmonary fibrosis," *European Respiratory Review*, vol. 28, no. 153, p. 190022, 2019, doi: 10.1183/16000617.0022-2019.
- [66] A. Isaacs and J. Lindenmann, "Pillars Article : Virus Interference . I . The," *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, vol. 147, pp. 258–267, 1957.
- [67] I. Zanoni and C. Odendall, "Editorial: Interferon- λ s: New Regulators of Inflammatory Processes," *Frontiers in Immunology*, vol. 10, Sep. 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.02117.
- [68] T. Mahlaköiv, P. Hernandez, K. Gronke, A. Diefenbach, and P. Staeheli, "Leukocyte-Derived IFN- α/β and Epithelial IFN- λ Constitute a Compartmentalized Mucosal Defense System that Restricts Enteric Virus Infections," *PLoS Pathogens*, vol. 11, no. 4, pp. 1–19, 2015, doi: 10.1371/journal.ppat.1004782.

- [69] N. Ank, H. West, C. Bartholdy, K. Eriksson, A. R. Thomsen, and S. R. Paludan, "Lambda Interferon (IFN- λ), a Type III IFN, Is Induced by Viruses and IFNs and Displays Potent Antiviral Activity against Select Virus Infections In Vivo," *Journal of Virology*, vol. 80, no. 9, pp. 4501–4509, 2006, doi: 10.1128/JVI.80.9.4501-4509.2006.
- [70] M. L. Stanifer, C. Guo, P. Doldan, and S. Boulant, "Importance of Type I and III Interferons at Respiratory and Intestinal Barrier Surfaces," *Frontiers in Immunology*, vol. 11, Dec. 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.608645.
- [71] A. Egli, D. M. Santer, D. O'Shea, D. L. Tyrrell, and M. Houghton, "The impact of the interferon-lambda family on the innate and adaptive immune response to viral infections," *Emerging Microbes and Infections*, vol. 3, no. May, pp. 1–12, 2014, doi: 10.1038/emi.2014.51.
- [72] M. B. Malterer, S. J. Glass, and J. P. Newman, "Interferon-stimulated genes: A complex web of host defenses," *Annual Review of Immunology*, vol. 44, no. 3, pp. 735–745, 2014, doi: 10.1038/jid.2014.371.
- [73] P. M. Knipe, David M. ; Howley, *Fields Virology 6th edition*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013.
- [74] P. Alberts, Bruce; Jhonson, Alexander; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, *Molecular Biology Of The Cell*, 5. Edition. Garland Science, 2008.
- [75] D. Rimoin, R. Pyeritz, and B. Korf, *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics*. Elsevier B.V., 2013.
- [76] K. Murphy, *Janeways Immunobiology*, 8th editio. Garland Science, 2012.
- [77] M. Tang, L. Tian, G. Luo, and X. Yu, "Interferon-gamma-mediated osteoimmunology," *Frontiers in Immunology*, vol. 9, no. JUN, 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.01508.
- [78] A. Lasfar, H. Gogas, A. Zloza, H. L. Kaufman, and J. M. Kirkwood, "IFN- λ cancer immunotherapy: new kid on the block," *Immunotherapy*, vol. 8, no. 8, pp. 877–888, Jul. 2016, doi: 10.2217/imt-2015-0021.
- [79] E. A. Hemann, M. Gale, and R. Savan, "Interferon lambda genetics and biology in regulation of viral control," *Frontiers in Immunology*, vol. 8, no. DEC, 2017, doi: 10.3389/fimmu.2017.01707.
- [80] A. Lasfar *et al.*, "Characterization of the Mouse IFN- λ Ligand-Receptor System: IFN- λ s Exhibit Antitumor Activity against B16 Melanoma," *Cancer Research*, vol. 66, no. 8, pp. 4468–4477, Apr. 2006, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3653.
- [81] M. Hong *et al.*, "Interferon lambda 4 expression is suppressed by the host during viral infection," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 213, no. 12, pp. 2539–2552, Nov. 2016, doi: 10.1084/jem.20160437.
- [82] K. Lopusná *et al.*, "Murine gammaherpesvirus targets type I IFN receptor but not type III IFN receptor early in infection," *Cytokine*, vol. 83, pp. 158–170, 2016, doi: 10.1016/j.cyto.2016.04.013.
- [83] S. Davidson *et al.*, "IFN λ is a potent anti-influenza therapeutic without the inflammatory side effects of IFN α treatment," vol. 8, no. 9, pp. 1099–1112, 2016.
- [84] S. Kim *et al.*, "The superiority of IFN- λ as a therapeutic candidate to control acute influenza viral lung infection," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 56, no. 2, pp. 202–212, 2017, doi: 10.1165/rcmb.2016-0174OC.
- [85] H. M. Lazear, T. J. Nice, and M. S. Diamond, "Interferon- λ : Immune Functions at Barrier Surfaces and Beyond," *Immunity*, vol. 43, no. 1, pp. 15–28, 2015, doi: 10.1016/j.immuni.2015.07.001.
- [86] M. Mordstein *et al.*, "Lambda Interferon Renders Epithelial Cells of the Respiratory and Gastrointestinal Tracts Resistant to Viral Infections," *Journal of Virology*, vol. 84, no. 11, pp. 5670–5677, 2010, doi: 10.1128/jvi.00272-10.

- [87] S. Crotta *et al.*, “Type I and Type III Interferons Drive Redundant Amplification Loops to Induce a Transcriptional Signature in Influenza-Infected Airway Epithelia,” *PLoS Pathogens*, vol. 9, no. 11, p. e1003773, Nov. 2013, doi: 10.1371/journal.ppat.1003773.
- [88] H. J. Kim *et al.*, “Nasal commensal *Staphylococcus epidermidis* enhances interferon- λ -dependent immunity against influenza virus,” *Microbiome*, vol. 7, no. 1, p. 80, Dec. 2019, doi: 10.1186/s40168-019-0691-9.
- [89] N. A. Jewell *et al.*, “Lambda Interferon Is the Predominant Interferon Induced by Influenza A Virus Infection In Vivo,” *Journal of Virology*, vol. 85, no. 1, pp. 650–650, 2011, doi: 10.1128/jvi.02252-10.
- [90] M. R. Khaitov *et al.*, “Respiratory virus induction of alpha-, beta- and lambda-interferons in bronchial epithelial cells and peripheral blood mononuclear cells,” *Allergy*, vol. 64, no. 3, pp. 375–386, 2009, doi: 10.1111/j.1398-9995.2008.01826.x.
- [91] V. Espinosa *et al.*, “Type III interferon is a critical regulator of innate antifungal immunity,” *Science Immunology*, vol. 2, no. 16, p. eaan5357, Oct. 2017, doi: 10.1126/sciimmunol.aan5357.
- [92] A. Broggi *et al.*, “Type III interferons disrupt the lung epithelial barrier upon viral recognition,” *Science*, vol. 369, no. 6504, pp. 706–712, Aug. 2020, doi: 10.1126/science.abc3545.
- [93] E. Andreacos and S. Tsiodras, “ COVID -19: lambda interferon against viral load and hyperinflammation ,” *EMBO Molecular Medicine*, vol. 12, no. 6, pp. 10–13, 2020, doi: 10.15252/emmm.202012465.
- [94] J. Zhao, L. Zhu, L. Xu, J. Huang, X. Sun, and Z. Xu, “Porcine interferon lambda 3 (IFN- λ 3) shows potent anti-PRRSV activity in primary porcine alveolar macrophages (PAMs),” *BMC Veterinary Research*, vol. 16, no. 1, pp. 1–7, 2020, doi: 10.1186/s12917-020-02627-6.
- [95] S. A. Read *et al.*, “Macrophage Coordination of the Interferon Lambda Immune Response,” *Frontiers in Immunology*, vol. 10, no. November, pp. 1–16, 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.02674.
- [96] M. Eslam *et al.*, “Interferon- λ rs12979860 genotype and liver fibrosis in viral and non-viral chronic liver disease,” *Nature Communications*, vol. 6, pp. 1–10, 2015, doi: 10.1038/ncomms7422.
- [97] M. Syedbasha and A. Egli, “Interferon Lambda: Modulating immunity in infectious diseases,” *Frontiers in Immunology*, vol. 8, no. FEB, 2017, doi: 10.3389/fimmu.2017.00119.
- [98] A. Zickert, V. Oke, I. Parodis, E. Svenungsson, Y. Sundström, and I. Gunnarsson, “Interferon (IFN)- λ is a potential mediator in lupus nephritis,” *Lupus Science and Medicine*, vol. 3, no. 1, pp. 1–8, 2016, doi: 10.1136/lupus-2016-000170.
- [99] R. P. Amezcua-Guerra, Luis M. MD*†‡; Márquez-Velasco, Ricardo PhD‡; Chávez-Rueda, Adriana K. PhD§; Castillo-Martínez, Diana MD||; Massó, Felipe MD¶; Páez, Araceli MSc¶; Colín-Fuentes, Juan MD#; Bojalil, “Type III Interferons in Systemic Lupus Erythematosus,” *Journal of Clinical Rheumatology*, vol. 23, no. 7, pp. 368–375, 2017.
- [100] V. Oke *et al.*, “IFN- λ 1 with Th17 axis cytokines and IFN- α define different subsets in systemic lupus erythematosus (SLE),” *Arthritis Research and Therapy*, vol. 19, no. 1, pp. 1–12, 2017, doi: 10.1186/s13075-017-1344-7.
- [101] F. M. Veronese and A. Mero, “The Impact of PEGylation on Biological Therapies,” *BioDrugs*, vol. 22, no. 5, pp. 315–329, 2008, doi: 10.2165/00063030-200822050-00004.
- [102] S. Phillips *et al.*, “Peg-interferon lambda treatment induces robust innate and adaptive immunity in chronic hepatitis B patients,” *Frontiers in Immunology*, vol. 8, no. MAY, 2017, doi: 10.3389/fimmu.2017.00621.
- [103] C. Sarrazin *et al.*, “S3-Leitlinie „Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis-C-Virus (HCV) -Infektion“,” *Zeitschrift für Gastroenterologie*, vol. 56, no. 07, pp. 756–838, Jul. 2018, doi: 10.1055/a-0599-1320.

- [104] A. J. Muir *et al.*, “Phase 1b study of pegylated interferon lambda 1 with or without ribavirin in patients with chronic genotype 1 hepatitis C virus infection,” *Hepatology*, vol. 52, no. 3, pp. 822–832, Sep. 2010, doi: 10.1002/hep.23743.
- [105] A. J. Muir *et al.*, “A randomized phase 2b study of peginterferon lambda-1a for the treatment of chronic HCV infection,” *Journal of Hepatology*, vol. 61, no. 6, pp. 1238–1246, Dec. 2014, doi: 10.1016/j.jhep.2014.07.022.
- [106] R. Flisiak *et al.*, “Peginterferon Lambda-1a/Ribavirin with Daclatasvir or Peginterferon Alfa-2a/Ribavirin with Telaprevir for Chronic Hepatitis C Genotype 1b,” *Journal of Interferon & Cytokine Research*, vol. 36, no. 11, pp. 635–643, Nov. 2016, doi: 10.1089/jir.2015.0173.
- [107] W. Abushahba *et al.*, “Antitumor activity of Type I and Type III interferons in BNL hepatoma model,” *Cancer Immunology, Immunotherapy*, vol. 59, no. 7, pp. 1059–1071, Jul. 2010, doi: 10.1007/s00262-010-0831-3.
- [108] A. Lasfar, A. Zloza, and K. A. Cohen-Solal, “IFN-lambda therapy: current status and future perspectives,” *Drug Discovery Today*, vol. 21, no. 1, pp. 167–171, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.drudis.2015.10.021.
- [109] V. François-Newton *et al.*, “USP18-based negative feedback control is induced by type I and type III interferons and specifically inactivates interferon α response,” *PLoS ONE*, vol. 6, no. 7, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0022200.
- [110] M. L. DeDiego, A. Nogales, L. Martinez-Sobrido, and D. J. Topham, “Interferon-Induced Protein 44 Interacts with Cellular FK506-Binding Protein 5, Negatively Regulates Host Antiviral Responses, and Supports Virus Replication,” *mBio*, vol. 10, no. 4, pp. 1–20, 2019, doi: 10.1128/mbio.01839-19.
- [111] A. Pichlmair *et al.*, “IFIT1 is an antiviral protein that recognizes 5'-triphosphate RNA,” *Nature Immunology*, vol. 12, no. 7, pp. 624–630, 2011, doi: 10.1038/ni.2048.
- [112] B. Grinde, “Herpesviruses: latency and reactivation – viral strategies and host response,” *Journal of Oral Microbiology*, vol. 5, no. 1, p. 22766, 2013, doi: 10.3402/jom.v5i0.22766.
- [113] W. H. Doerr, Hans W.; Gerlich, *Medizinische Virologie: Grundlagen, Diagnostik, Prävention und Therapie viraler Erkrankungen*. 2010.
- [114] C. Sattler *et al.*, “Nanoparticle exposure reactivates latent herpesvirus and restores a signature of acute infection,” *Particle and Fibre Toxicology*, vol. 14, no. 1, pp. 1–19, 2017, doi: 10.1186/s12989-016-0181-1.
- [115] “RKI-Ratgeber für Ärzte: Windpocken (Varizellen), Gürtelrose (Herpes zoster),” *Robert Koch Institut*, 2018. https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Varizellen.html;jsessionid=F2E8D06948ABB9EF0809420E3566F2EB.2_cid363#doc2374554bodyText26 (accessed May 20, 2021).
- [116] G. Herold, “Herold: Innere Medizin 2017,” Gerd Herold, 2017.
- [117] B. Roizmann, R. C. Desrosiers, B. Fleckenstein, C. Lopez, A. C. Minson, and M. J. Studdert, “The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses.,” *Archives of virology*, vol. 123, no. 3–4, pp. 425–449, 1992, doi: 10.1007/BF01317276.
- [118] Y. K. Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, “Human Herpesviruses: Biology, Therapy, Immunoprophylaxis,” 2007.
- [119] K. G. Magden, Elisabeth R.; Mansfield, *Laboratory Animal Medicine*, Third edit. American College of Laboratory Medicine, 2015.
- [120] A. Longnecker, Richard; Neipel, Frank; Arvin, *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge University Press, 2007.

- [121] E. Barton, P. Mandal, and S. H. Speck, "Pathogenesis and Host Control of Gammaherpesviruses: Lessons from the Mouse," *Annual Review of Immunology*, vol. 29, no. 1, pp. 351–397, 2011, doi: 10.1146/annurev-immunol-072710-081639.
- [122] K. J. Williams, "Gammaherpesviruses and Pulmonary Fibrosis: Evidence From Humans, Horses, and Rodents," *Veterinary Pathology*, vol. 51, no. 2, pp. 372–384, 2014, doi: 10.1177/0300985814521838.
- [123] T. E. McManus *et al.*, "High levels of Epstein-Barr virus in COPD," *European Respiratory Journal*, vol. 31, no. 6, pp. 1221–1226, 2008, doi: 10.1183/09031936.00107507.
- [124] P. Grahame-Clarke, Cairistine; Alber, Dagmar G.; Lucas, Sebastian B.; Miller, Robert; Vallance, "Association between Kaposi's sarcoma and atherosclerosis: implications for gammaherpesviruses and vascular disease," *AIDS*, vol. Volume 15, no. Issue 14, pp. 1902–1904, 2001.
- [125] C. Casiraghi, I. Shanina, S. Cho, M. L. Freeman, M. A. Blackman, and M. S. Horwitz, "Gammaherpesvirus latency accentuates EAE pathogenesis: Relevance to Epstein-Barr virus and multiple sclerosis," *PLoS Pathogens*, vol. 8, no. 5, pp. 1–16, 2012, doi: 10.1371/journal.ppat.1002715.
- [126] H. C. Jha *et al.*, "Gammaherpesvirus infection of human neuronal cells," *mBio*, vol. 6, no. 6, pp. 1–14, 2015, doi: 10.1128/mBio.01844-15.
- [127] Y. Lv, S. Zhou, S. Gao, and H. Deng, "Remodeling of host membranes during herpesvirus assembly and egress," *Protein and Cell*, vol. 10, no. 5, pp. 315–326, 2019, doi: 10.1007/s13238-018-0577-9.
- [128] H. Granzow, B. G. Klupp, W. Fuchs, J. Veits, N. Osterrieder, and T. C. Mettenleiter, "Egress of Alphaherpesviruses: Comparative Ultrastructural Study," *Journal of Virology*, vol. 75, no. 8, pp. 3675–3684, 2001, doi: 10.1128/jvi.75.8.3675-3684.2001.
- [129] C. Villinger, G. Neusser, C. Kranz, P. Walther, and T. Mertens, "3D analysis of HCMV induced-nuclear membrane structures by FIB/SEM tomography: Insight into an unprecedented membrane morphology," *Viruses*, vol. 7, no. 11, pp. 5686–5704, 2015, doi: 10.3390/v7112900.
- [130] A. Nanbo, T. Noda, and Y. Ohba, "Epstein-barr virus acquires its final envelope on intracellular compartments with Golgi markers," *Frontiers in Microbiology*, vol. 9, no. MAR, pp. 1–13, 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.00454.
- [131] S. Turcotte, J. Letellier, and R. Lippé, "Herpes Simplex Virus Type 1 Capsids Transit by the trans-Golgi Network, Where Viral Glycoproteins Accumulate Independently of Capsid Egress," *Journal of Virology*, vol. 79, no. 14, pp. 8847–8860, 2005, doi: 10.1128/jvi.79.14.8847-8860.2005.
- [132] C. A. Harley, A. Dasgupta, and D. W. Wilson, "Characterization of Herpes Simplex Virus-Containing Organelles by Subcellular Fractionation: Role for Organelle Acidification in Assembly of Infectious Particles," *Journal of Virology*, vol. 75, no. 3, pp. 1236–1251, 2001, doi: 10.1128/jvi.75.3.1236-1251.2001.
- [133] B. G. Butt *et al.*, "Insights into herpesvirus assembly from the structure of the pUL7:PUL51 complex," *eLife*, vol. 9, pp. 1–40, 2020, doi: 10.7554/eLife.53789.
- [134] D. W. Hoang, A. N., Sandlin, R. D., Omar, A., Egan, T. J., & Wright, "Unique Structures in a Tumor Herpesvirus Revealed by Cryo-electron Tomography and Microscopy," *Bone*, vol. 23, no. 1, pp. 1–20, 2010, doi: 10.1038/jid.2014.371.
- [135] L. Peng, S. Ryazantsev, R. Sun, and Z. H. Zhou, "Three-Dimensional Visualization of Gammaherpesvirus Life Cycle in Host Cells by Electron Tomography," *Structure*, vol. 18, no. 1, pp. 47–58, 2010, doi: 10.1016/j.str.2009.10.017.
- [136] J. Blaskovic, D; Stanceková, M; Svobodová, J; Mistríková, "Isolation of five strains of herpesviruses from two species of free living small rodents.," *Acta Virologica*, p. 468, 1980.

- [137] J. Mistriková and K. Briestenská, “Murid herpesvirus 4 (MuHV-4, prototype strain MHV-68) as an important model in global research of human oncogenic gammaherpesviruses,” *Acta virologica*, vol. 64, no. 02, pp. 167–176, 2020, doi: 10.4149/av_2020_206.
- [138] C. Lawler, R. Milho, J. S. May, and P. G. Stevenson, “Rhadinovirus Host Entry by Co-operative Infection,” *PLOS Pathogens*, vol. 11, no. 3, p. e1004761, Mar. 2015, doi: 10.1371/journal.ppat.1004761.
- [139] H. Kim, J. H. Jang, Y. E. Song, and T. Seo, “Kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus viral protein kinase phosphorylates extracellular signal-regulated kinase and activates MAPK/ERK signaling pathway,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 521, no. 4, pp. 1083–1088, 2019, doi: 10.1016/j.bbrc.2019.11.038.
- [140] S. Hwang *et al.*, “Conserved Herpesviral Kinase Promotes Viral Persistence by Inhibiting the IRF-3-Mediated Type I Interferon Response,” *Cell Host and Microbe*, vol. 5, no. 2, pp. 166–178, 2009, doi: 10.1016/j.chom.2008.12.013.
- [141] E. S. Barton, M. L. Lutzke, R. Rochford, and H. W. Virgin, “Alpha/Beta Interferons Regulate Murine Gammaherpesvirus Latent Gene Expression and Reactivation from Latency,” *Journal of Virology*, vol. 79, no. 22, pp. 14149–14160, 2005, doi: 10.1128/jvi.79.22.14149-14160.2005.
- [142] N. v. Lenschow, Deborah J.; Lai, Caroline; Frias-Staheli, Natalia; Giannakopoulos, “IFN-stimulated gene 15 functions as a critical antiviral molecule against influenza, herpes, and Sindbis viruses,” *PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)*, p. Pages 1371–1376, 2007.
- [143] S. Jacobs, C. Zeippen, F. Wavreil, L. Gillet, and T. Michiels, “IFN- λ decreases murid herpesvirus-4 infection of the olfactory epithelium but fails to prevent virus reactivation in the vaginal mucosa,” *Viruses*, vol. 11, no. 8, pp. 1–18, 2019, doi: 10.3390/v11080757.
- [144] N. P. Sunil-Chandra, S. Efstathiou, and A. A. Nash, “Murine gammaherpesvirus 68 establishes a latent infection in mouse B lymphocytes in vivo,” *Journal of General Virology*, vol. 73, no. 12, pp. 3275–3279, 1992, doi: 10.1099/0022-1317-73-12-3275.
- [145] N. P. Sunil-Chandra, S. Efstathiou, J. Arno, and A. A. Nash, “Virological and pathological features of mice infected with murine gammaherpesvirus 68,” *Journal of General Virology*, vol. 73, no. 9, pp. 2347–2356, 1992, doi: 10.1099/0022-1317-73-9-2347.
- [146] E. Flaño, I.-J. Kim, J. Moore, D. L. Woodland, and M. A. Blackman, “Differential γ -Herpesvirus Distribution in Distinct Anatomical Locations and Cell Subsets During Persistent Infection in Mice,” *The Journal of Immunology*, vol. 170, no. 7, pp. 3828–3834, 2003, doi: 10.4049/jimmunol.170.7.3828.
- [147] T.-T. Wu, J. Qian, J. Ang, and R. Sun, “Vaccine prospect of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus,” *Current Opinion in Virology*, vol. 2, no. 4, pp. 482–488, Aug. 2012, doi: 10.1016/j.coviro.2012.06.005.
- [148] H. R. Kang *et al.*, “Persistent infection of a gammaherpesvirus in the central nervous system,” *Virology*, vol. 423, no. 1, pp. 23–29, 2012, doi: 10.1016/j.virol.2011.11.012.
- [149] A. L. Mora *et al.*, “Control of virus reactivation arrests pulmonary herpesvirus-induced fibrosis in IFN- γ receptor-deficient mice,” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 175, no. 11, pp. 1139–1150, 2007, doi: 10.1164/rccm.200610-1426OC.
- [150] T. A. Selvakumar *et al.*, “Identification of a predominantly interferon- λ -induced transcriptional profile in murine intestinal epithelial cells,” *Frontiers in Immunology*, vol. 8, no. OCT, 2017, doi: 10.3389/fimmu.2017.01302.
- [151] C. Mümmler, O. Burgy, S. Hermann, K. Mutze, A. Günther, and M. Königshoff, “Cell-specific expression of runt-related transcription factor 2 contributes to pulmonary fibrosis,” *FASEB Journal*, vol. 32, no. 2, pp. 703–716, 2018, doi: 10.1096/fj.201700482R.
- [152] J. L. J. van der Velden, A. S. Guala, S. E. Leggett, J. Sluimer, E. C. H. L. Badura, and Y. M. W. Janssen-Heininger, “Induction of a mesenchymal expression program in lung epithelial cells by

- Wingless protein (Wnt)/ β -catenin requires the presence of c-Jun N-terminal kinase-1 (JNK1),” *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 47, no. 3, pp. 306–314, 2012, doi: 10.1165/rcmb.2011-0297OC.
- [153] V. Gunduz, E. Kong, C. D. Bryan, and P. W. Hinds, “Loss of the Retinoblastoma Tumor Suppressor Protein in Murine Calvaria Facilitates Immortalization of Osteoblast-Adipocyte Bipotent Progenitor Cells Characterized by Low Expression of N-Cadherin,” *Molecular and Cellular Biology*, vol. 32, no. 13, pp. 2561–2569, 2012, doi: 10.1128/mcb.06453-11.
- [154] C. Sommereyns, S. Paul, P. Staeheli, and T. Michiels, “IFN-Lambda (IFN- λ) Is Expressed in a Tissue-Dependent Fashion and Primarily Acts on Epithelial Cells In Vivo,” *PLoS Pathogens*, vol. 4, no. 3, p. e1000017, Mar. 2008, doi: 10.1371/journal.ppat.1000017.
- [155] “The Massachusetts General Hospital PrimerBank.” <https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>
- [156] H. M. Lazear *et al.*, “Erratum for the research article: Interferon- λ restricts West Nile virus neuroinvasion by tightening the blood-brain barrier,” *Science Translational Medicine*, vol. 7, no. 289, pp. 1–14, 2015, doi: 10.1126/scitranslmed.aac6108.
- [157] W. Zhang *et al.*, “S100a4 is secreted by alternatively activated alveolar macrophages and promotes activation of lung fibroblasts in pulmonary fibrosis,” *Frontiers in Immunology*, vol. 9, no. JUN, pp. 1–14, 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.01216.
- [158] B. Samreen, S. Tao, K. Tischer, H. Adler, and I. Drexler, “ORF6 and ORF61 Expressing MVA Vaccines Impair Early but Not Late Latency in Murine Gammaherpesvirus MHV-68 Infection,” *Frontiers in Immunology*, vol. 10, no. December, pp. 1–17, 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.02984.
- [159] F. B. Lopes, S. Colaco, J. S. May, and P. G. Stevenson, “Characterization of Murine Gammaherpesvirus 68 Glycoprotein B,” *Journal of Virology*, vol. 78, no. 23, pp. 13370–13375, 2004, doi: 10.1128/jvi.78.23.13370-13375.2004.
- [160] Q. Jia, T.-T. Wu, H.-I. Liao, V. Chernishof, and R. Sun, “Murine Gammaherpesvirus 68 Open Reading Frame 31 Is Required for Viral Replication,” *Journal of Virology*, vol. 78, no. 12, pp. 6610–6620, 2004, doi: 10.1128/jvi.78.12.6610-6620.2004.
- [161] A. Matsuo *et al.*, “Significance of nuclear LOXL2 inhibition in fibroblasts and myofibroblasts in the fibrotic process of acute respiratory distress syndrome,” *European Journal of Pharmacology*, vol. 892, no. August 2020, p. 173754, 2021, doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173754.
- [162] J. P. Ng-Blichfeldt *et al.*, “Retinoic acid signaling balances adult distal lung epithelial progenitor cell growth and differentiation,” *EBioMedicine*, vol. 36, pp. 461–474, 2018, doi: 10.1016/j.ebiom.2018.09.002.
- [163] S. H. van Rijt *et al.*, “Applicability of avidin protein coated mesoporous silica nanoparticles as drug carriers in the lung,” *Nanoscale*, vol. 8, no. 15, pp. 8058–8069, 2016, doi: 10.1039/c5nr04119h.
- [164] R. S. Chang, S. der Wang, Y. C. Wang, L. J. Lin, S. te Kao, and J. Y. Wang, “Xiao-Qing-Long-Tang shows preventive effect of asthma in an allergic asthma mouse model through neurotrophin regulation,” *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 13, no. 1, p. 1, 2013, doi: 10.1186/1472-6882-13-220.
- [165] J. C. Hoyt, J. Ballering, H. Numanami, J. M. Hayden, and R. A. Robbins, “Doxycycline Modulates Nitric Oxide Production in Murine Lung Epithelial Cells,” *The Journal of Immunology*, vol. 176, no. 1, pp. 567–572, 2006, doi: 10.4049/jimmunol.176.1.567.
- [166] L. Yang *et al.*, “Resveratrol alleviates sepsis-induced acute lung injury by suppressing inflammation and apoptosis of alveolar macrophage cells,” *American Journal of Translational Research*, vol. 10, no. 7, pp. 1961–1975, 2018.
- [167] H. R. Park, S. K. Jo, and U. Jung, “Ionizing Radiation Promotes Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Lung Epithelial Cells by TGF- β -producing M2 Macrophages,” *In Vivo*, vol. 33, no. 6, pp. 1773–1784, 2019, doi: 10.21873/invivo.11668.

- [168] S. Li *et al.*, “ACE2 attenuates epithelial-mesenchymal transition in MLE-12 cells induced by silica,” *Drug Design, Development and Therapy*, vol. 14, pp. 1547–1559, 2020, doi: 10.2147/DDDT.S252351.
- [169] S. Soni *et al.*, “Alveolar macrophage-derived microvesicles mediate acute lung injury,” *Thorax*, vol. 71, no. 11, pp. 1020–1029, 2016, doi: 10.1136/thoraxjnl-2015-208032.
- [170] A. S. Wang *et al.*, “Sulforaphane protects MLE-12 lung epithelial cells against oxidative damage caused by ambient air particulate matter,” *Food and Function*, vol. 8, no. 12, pp. 4555–4562, 2017, doi: 10.1039/c7fo00969k.
- [171] H. Zipper, H. Brunner, J. Bernhagen, and F. Vitzthum, “Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications,” *Nucleic Acids Research*, vol. 32, no. 12, 2004, doi: 10.1093/nar/gnh101.
- [172] E. Navarro, G. Serrano-Heras, M. J. Castaño, and J. Solera, “Real-time PCR detection chemistry,” *Clinica Chimica Acta*, vol. 439, pp. 231–250, 2015, doi: 10.1016/j.cca.2014.10.017.
- [173] L. J. Marnett, “Synthesis of 5- and 6-Carboxy-X-rhodamines,” no. 6, pp. 2007–2009, 2008.
- [174] D. Martinez-Guzman *et al.*, “Transcription Program of Murine Gammaherpesvirus 68,” *Journal of Virology*, vol. 77, no. 19, pp. 10488–10503, 2003, doi: 10.1128/jvi.77.19.10488-10503.2003.
- [175] D. P. Madigan, Michael T.; Martinko, John M.; Stahl, David A.; Clark, *Brock Mikrobiologie kompakt*. Halbergmoss: Pearson Deutschland GmbH, 2015.
- [176] B. Schütt, Christine; Bröker, “Grundwissen Immunologie,” Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2011.
- [177] BD Biosciences, “BD FACSCalibur Instructions For Use.” https://www.bdbiosciences.com/documents/BD_FACSCalibur_instructions.pdf
- [178] T. B.; Glantz, Stanton A.; Slinker, Bryan K.; Neilands, “Primer of Regression & Analysis of Variance,” McGraw-Hill Education, 2016.
- [179] M. J. Blanca, R. Alarcón, J. Arnau, R. Bono, and R. Bendayan, “Datos no normales: ¿es el ANOVA una opción válida?,” *Psicothema*, vol. 29, no. 4, pp. 552–557, 2017, doi: 10.7334/psicothema2016.383.
- [180] G. v. Glass, P. D. Peckham, and J. R. Sanders, “Consequences of Failure to Meet Assumptions Underlying the Fixed Effects Analyses of Variance and Covariance,” *Review of Educational Research*, vol. 42, no. 3, pp. 237–288, 1972, doi: 10.3102/00346543042003237.
- [181] M. R. Harwell, E. N. Rubinstein, W. S. Hayes, and C. C. Olds, “Summarizing Monte Carlo Results in Methodological Research: The One- and Two-Factor Fixed Effects ANOVA Cases,” *Journal of Educational Statistics*, vol. 17, no. 4, pp. 315–339, 1992, doi: 10.3102/10769986017004315.
- [182] L. M. Lix, J. C. Keselman, and H. J. Keselman, “Consequences of assumption violations revisited: A quantitative review of alternatives to the one-way analysis of variance F test,” *Review of Educational Research*, vol. 66, no. 4, pp. 579–619, 1996, doi: 10.3102/00346543066004579.
- [183] E. Schmider, M. Ziegler, E. Danay, L. Beyer, and M. Bühner, “Is It Really Robust?: Reinvestigating the robustness of ANOVA against violations of the normal distribution assumption,” *Methodology*, vol. 6, no. 4, pp. 147–151, 2010, doi: 10.1027/1614-2241/a000016.
- [184] GraphPad Software, “The lognormal distribution.” https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/statistics/stat_the_lognormal_distribution.htm
- [185] P. Mandal *et al.*, “A gammaherpesvirus cooperates with interferon-alpha/beta-induced irf2 to halt viral replication, control reactivation, and minimize host lethality,” *PLoS Pathogens*, vol. 7, no. 11, 2011, doi: 10.1371/journal.ppat.1002371.
- [186] B. M. Dutia, D. J. Allen, H. Dyson, and A. A. Nash, “Type I interferons and IRF-1 play a critical role in the control of a gammaherpesvirus infection,” *Virology*, vol. 261, no. 2, pp. 173–179, 1999, doi: 10.1006/viro.1999.9834.

- [187] R. S. Leang *et al.*, “The anti-interferon activity of conserved viral duTPase ORF54 is essential for an effective MHV-68 infection,” *PLoS Pathogens*, vol. 7, no. 10, 2011, doi: 10.1371/journal.ppat.1002292.
- [188] S. Kletting *et al.*, “Co-culture of human alveolar epithelial (hAELVi) and macrophage (THP-1) cell lines,” *Altex*, vol. 35, no. 2, pp. 211–222, 2018, doi: 10.14573/altex.1607191.
- [189] M. Hittinger, N. A. Mell, H. Huwer, B. Loretz, N. Schneider-Daum, and C. M. Lehr, “Autologous co-culture of primary human alveolar macrophages and epithelial cells for investigating aerosol medicines. Part II: Evaluation of IL-10-loaded microparticles for the treatment of lung inflammation,” *ATLA Alternatives to Laboratory Animals*, vol. 44, no. 4, pp. 349–360, 2016, doi: 10.1177/026119291604400405.
- [190] R. Wottrich, S. Diabaté, and H. F. Krug, “Biological effects of ultrafine model particles in human macrophages and epithelial cells in mono- and co-culture,” *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, vol. 207, no. 4, pp. 353–361, 2004, doi: 10.1078/1438-4639-00300.
- [191] A. Saito, M. Horie, and T. Nagase, “TGF- β signaling in lung health and disease,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, no. 8, pp. 1–18, 2018, doi: 10.3390/ijms19082460.
- [192] F. Mou and C. Mou, “Necrostatin-1 alleviates bleomycin-induced pulmonary fibrosis and extracellular matrix expression in interstitial pulmonary fibrosis,” *Medical Science Monitor*, vol. 26, pp. 1–9, 2020, doi: 10.12659/MSM.919739.
- [193] X. Liu, T. Zhang, and C. Zhang, “Sitagliptin inhibits extracellular matrix accumulation and proliferation in lung fibroblasts,” *Medical Science Monitor*, vol. 26, pp. 1–7, 2020, doi: 10.12659/MSM.922644.
- [194] H. Wu *et al.*, “Progressive Pulmonary Fibrosis Is Caused by Elevated Mechanical Tension on Alveolar Stem Cells,” *Cell*, vol. 180, no. 1, pp. 107–121.e17, 2020, doi: 10.1016/j.cell.2019.11.027.
- [195] A. Broggi, Y. Tan, F. Granucci, and I. Zanoni, “IFN- λ suppresses intestinal inflammation by non-translational regulation of neutrophil function,” *Nature Immunology*, vol. 18, no. 10, pp. 1084–1093, Oct. 2017, doi: 10.1038/ni.3821.
- [196] S. W. Aumüller Gerhard, Aust Gabriela, Doll, Andreas, Engele Jürgen, Kirsch JOachim, Mense Siegfried, Reißig Dieter, Salvetter Jürgen, *Duale Reihe Anatomie*, 2. Auflage. Georg Thieme Verlag KG, 2010.
- [197] K. J. Szretter *et al.*, “Early Control of H5N1 Influenza Virus Replication by the Type I Interferon Response in Mice,” *Journal of Virology*, vol. 83, no. 11, pp. 5825–5834, 2009, doi: 10.1128/jvi.02144-08.
- [198] S. E. Doyle *et al.*, “Interleukin-29 uses a type 1 interferon-like program to promote antiviral responses in human hepatocytes,” *Hepatology*, vol. 44, no. 4, pp. 896–906, Oct. 2006, doi: 10.1002/hep.21312.
- [199] J. Melchjorsen, J. Sirén, I. Julkunen, S. R. Paludan, and S. Matikainen, “Induction of cytokine expression by herpes simplex virus in human monocyte-derived macrophages and dendritic cells is dependent on virus replication and is counteracted by ICP27 targeting NF- κ B and IRF-3,” *Journal of General Virology*, vol. 87, no. 5, pp. 1099–1108, May 2006, doi: 10.1099/vir.0.81541-0.
- [200] J. J. Feld *et al.*, “Peginterferon lambda for the treatment of outpatients with COVID-19: a phase 2, placebo-controlled randomised trial,” *The Lancet Respiratory Medicine*, vol. 9, no. 5, pp. 498–510, May 2021, doi: 10.1016/S2213-2600(20)30566-X.
- [201] P. Jagannathan *et al.*, “Peginterferon Lambda-1a for treatment of outpatients with uncomplicated COVID-19: a randomized placebo-controlled trial,” *Nature Communications*, vol. 12, no. 1, pp. 1–10, 2021, doi: 10.1038/s41467-021-22177-1.
- [202] F. Yosuke *et al.*, “Downregulation of type III interferons in patients with severe COVID-19,” *Journal of Medical Virology*, vol. 93, no. 7, pp. 4559–4563, Jul. 2021, doi: 10.1002/jmv.26993.

- [203] M. Shahbazi *et al.*, “Linkage of Lambda Interferons in Protection Against Severe COVID-19,” *Journal of Interferon & Cytokine Research*, vol. 41, no. 4, pp. 149–152, Apr. 2021, doi: 10.1089/jir.2020.0187.
- [204] C. Scagnolari *et al.*, “Differential induction of type I and III interferon genes in the upper respiratory tract of patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19),” *Virus Research*, vol. 295, p. 198283, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.virusres.2020.198283.
- [205] A. Raj, C. S. Peskin, D. Tranchina, D. Y. Vargas, and S. Tyagi, “Stochastic mRNA Synthesis in Mammalian Cells,” *PLoS Biology*, vol. 4, no. 10, p. e309, Sep. 2006, doi: 10.1371/journal.pbio.0040309.
- [206] L. Mariani *et al.*, “Short-term memory in gene induction reveals the regulatory principle behind stochastic IL-4 expression,” *Molecular Systems Biology*, vol. 6, no. 1, p. 359, Jan. 2010, doi: 10.1038/msb.2010.13.
- [207] U. Rand *et al.*, “Multi-layered stochasticity and paracrine signal propagation shape the type-I interferon response,” *Molecular Systems Biology*, vol. 8, no. 1, p. 584, Jan. 2012, doi: 10.1038/msb.2012.17.
- [208] O. Bauhofer, A. Ruggieri, B. Schmid, P. Schirmacher, and R. Bartenschlager, “Persistence of HCV in Quiescent Hepatic Cells Under Conditions of an Interferon-Induced Antiviral Response,” *Gastroenterology*, vol. 143, no. 2, pp. 429–438.e8, Aug. 2012, doi: 10.1053/j.gastro.2012.04.018.
- [209] T. Maiwald *et al.*, “Combining theoretical analysis and experimental data generation reveals IRF9 as a crucial factor for accelerating interferon α -induced early antiviral signalling,” *FEBS Journal*, vol. 277, no. 22, pp. 4741–4754, Nov. 2010, doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07880.x.
- [210] B. Schmid *et al.*, “Live Cell Analysis and Mathematical Modeling Identify Determinants of Attenuation of Dengue Virus 2’-O-Methylation Mutant,” *PLOS Pathogens*, vol. 11, no. 12, p. e1005345, Dec. 2015, doi: 10.1371/journal.ppat.1005345.
- [211] J. van den Bossche *et al.*, “Alternatively activated macrophages engage in homotypic and heterotypic interactions through IL-4 and polyamine-induced E-cadherin/catenin complexes,” *Blood*, vol. 114, no. 21, pp. 4664–4674, Nov. 2009, doi: 10.1182/blood-2009-05-221598.
- [212] J. van den Bossche *et al.*, “E-cadherin expression in macrophages dampens their inflammatory responsiveness in vitro, but does not modulate M2-regulated pathologies in vivo,” *Scientific Reports*, vol. 5, no. 1, p. 12599, Dec. 2015, doi: 10.1038/srep12599.
- [213] J. van den Bossche, B. Malissen, A. Mantovani, P. de Baetselier, and J. A. van Ginderachter, “Regulation and function of the E-cadherin/catenin complex in cells of the monocyte-macrophage lineage and DCs,” *Blood*, vol. 119, no. 7, pp. 1623–1633, Feb. 2012, doi: 10.1182/blood-2011-10-384289.
- [214] M. A. Ansari *et al.*, “Genome-to-genome analysis highlights the effect of the human innate and adaptive immune systems on the hepatitis C virus,” *Nature Genetics*, vol. 49, no. 5, pp. 666–673, May 2017, doi: 10.1038/ng.3835.
- [215] M. A. Ansari *et al.*, “Interferon lambda 4 impacts the genetic diversity of hepatitis C virus,” *eLife*, vol. 8, Sep. 2019, doi: 10.7554/eLife.42463.
- [216] M. De, A. Bhushan, and S. Chinnaswamy, “Monocytes differentiated into macrophages and dendritic cells in the presence of human IFN- λ 3 or IFN- λ 4 show distinct phenotypes,” *Journal of Leukocyte Biology*, no. October, pp. 1–18, 2020, doi: 10.1002/JLB.3A0120-001RRR.
- [217] T. J. Broekelmann, A. H. Limper, T. v. Colby, and J. A. McDonald, “Transforming growth factor beta 1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis.,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 88, no. 15, pp. 6642–6646, Aug. 1991, doi: 10.1073/pnas.88.15.6642.
- [218] N. Khalil, O. Bereznyay, M. Sporn, and A. H. Greenberg, “Macrophage production of transforming growth factor beta and fibroblast collagen synthesis in chronic pulmonary

- inflammation.,” *Journal of Experimental Medicine*, vol. 170, no. 3, pp. 727–737, Sep. 1989, doi: 10.1084/jem.170.3.727.
- [219] N. Khalil *et al.*, “Increased Production and Immunohistochemical Localization of Transforming Growth Factor- α in Idiopathic Pulmonary Fibrosis,” *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 5, no. 2, pp. 155–162, Aug. 1991, doi: 10.1165/ajrcmb/5.2.155.
- [220] O. Desai, J. Winkler, M. Minasyan, and E. L. Herzog, “The Role of Immune and Inflammatory Cells in Idiopathic Pulmonary Fibrosis,” *Frontiers in Medicine*, vol. 5, Mar. 2018, doi: 10.3389/fmed.2018.00043.
- [221] M. D. Sides *et al.*, “The Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1 and Transforming Growth Factor- β 1 Synergistically Induce Epithelial–Mesenchymal Transition in Lung Epithelial Cells,” *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 44, no. 6, pp. 852–862, Jun. 2011, doi: 10.1165/rcmb.2009-0232OC.
- [222] L. L. Falke, S. Gholizadeh, R. Goldschmeding, R. J. Kok, and T. Q. Nguyen, “Diverse origins of the myofibroblast-implications for kidney fibrosis,” *Nature Reviews Nephrology*, vol. 11, no. 4, pp. 233–244, 2015, doi: 10.1038/nrneph.2014.246.