

Aus dem Bereich  
Theoretische Medizin und Biowissenschaften  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Gen- und Proteinexpressionsanalyse  
von 2D- und 3D-differenzierten alveolaren Epithelzellen  
aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSCs)**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften der Medizinischen  
Fakultät*

*der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES*

2022

vorgelegt von: Michelle Müller geb. Hesler

geboren am 14.01.1992 in Püttlingen

Tag der Prüfung:	02.11.23
Dekan:	Prof. Dr. med. Michael D. Menger
Dissertationsgutachter:	Prof. Dr. phil. nat. Hagen von Briesen Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Robert Bals Prof. Dr. rer. nat. Gert Fricker

Die experimentellen Untersuchungen dieser Arbeit wurden am Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik IBMT in der Abteilung Bioprozesse & Bioanalytik durchgeführt.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>I</b>
<b>Summary</b>	<b>II</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Lungenerkrankungen: Die zweithäufigste Todesursache weltweit	1
1.2. Die Funktion und Histologie der Lunge	2
1.3. Lungenerkrankungen mit akutem Forschungsbedarf	4
1.3.1. COVID-19	4
1.3.2. Cystische Fibrose	8
1.4. Bedeutung von In-vitro-Modellen in der Lungenforschung	10
1.4.1. Humane induzierte pluripotente Stammzellen als vielversprechende Zellquelle	13
1.4.2. Genomeditierung in hiPSC-Krankheitsmodellen	17
1.5. Differenzierung von alveolaren Epithelzellen aus hiPSCs	20
1.5.1. Die Embryonalentwicklung der Lunge als Vorbild	20
1.5.2. In-vitro-Differenzierung in distale Lungenzelltypen	22
1.5.3. In-vitro-Lungen-Differenzierung: 2D vs. 3D	26
<b>2. Ziele der Arbeit</b>	<b>30</b>
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>31</b>
3.1. Verbrauchsmaterialien	31
3.2. Geräte	31
3.3. Chemikalien, Reagenzien und rekombinante Wachstumsfaktoren	32
3.4. Medien, Lösungen und Pufferzusammensetzungen	35
3.5. Methoden	37
3.5.1. Zellbiologische Methoden	37
3.5.2. Differenzierung in alveolare Epithelzellen Typ 2 und Typ 1	41
3.5.3. Protein- und Genexpressionsanalyse	42
3.5.4. Immunzytochemie	46
3.5.5. Virusinfektionsstudien mit SARS-CoV-2-Pseudoviren	47
3.5.6. Datenverarbeitung und statistische Auswertung	47

<b>4. Ergebnisse</b>	<b>48</b>
4.1. Analyse von Definitiven Endoderm (DE)-Zellen	48
4.1.1. Genexpressionsanalyse	48
4.1.2. Proteinexpressionsanalyse	51
4.2. Analyse von Anterior Foregut Endoderm (AFE)-Zellen	54
4.2.1. Genexpressionsanalyse	54
4.2.2. Proteinexpressionsanalyse	56
4.3. Analyse von Lung Progenitor (LP)-Zellen	58
4.3.1. Genexpressionsanalyse	58
4.3.2. Proteinexpressionsanalyse	60
4.4. Analyse von Alveolaren Epithelzellen Typ 2 (AT2)	62
4.4.1. Genexpressionsanalyse	62
4.4.2. Proteinexpressionsanalyse	72
4.4.3. Immunhistochemischer Nachweis von SP-C	77
4.4.4. Nachweis der ACE2/TMPRSS2-Funktionalität mit SARS-CoV-2-Pseudoviren	79
4.5. Analyse von Alveolaren Epithelzellen Typ 1 (AT1)	83
4.5.1. Genexpressionsanalyse	83
4.5.2. Proteinexpressionsanalyse	86
4.6. AT2-Differenzierung aus kryokonservierten LP-Zellen	90
4.6.1. Genexpressionsanalyse	90
4.6.2. Proteinexpressionsanalyse	93
<b>5. Diskussion</b>	<b>95</b>
5.1. Verwendete Zelllinien	95
5.2. 2D- und 3D-Differenzierungsstrategien	98
5.3. Vergleichende Gen- und Proteinexpressionsanalyse	101
5.4. SARS-CoV-2-Pseudovirus-Infektion von AT2	107
5.5. Kryokonservierung von LP-Zellen	108
<b>6. Ausblick</b>	<b>111</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>112</b>
Abbildungsverzeichnis	112
Tabellenverzeichnis	113
Formelverzeichnis	113
Literaturverzeichnis	114
Publikationen	130
Danksagung	133

## Zusammenfassung

Lungenerkrankungen sind die weltweit zweithäufigste Todesursache. Zur Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten werden aussagekräftige Testsysteme benötigt. Human-relevante, physiologische In-vitro-Modelle für die Lunge können beispielsweise aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSCs) generiert werden. Die Herstellung alveolarer Epithelzellen aus hiPSCs für den Einsatz in der präklinischen Medikamentenentwicklung erfordert die Entwicklung und Optimierung robuster und reproduzierbarer Differenzierungsstrategien, da die Zellen in einer industriell relevanten und reproduzierbaren Quantität und Qualität zur Verfügung stehen müssen. Aus diesem Grund war die Zielsetzung dieser Arbeit, eine geeignete Strategie zur Differenzierung alveolarer Epithelzellen aus hiPSCs für ihren Einsatz in der präklinischen Forschung zu identifizieren.

Zur Erreichung des Ziels wurden die planare, statische 2D- und die dynamische Bioreaktor-basierte 3D-Differenzierung als potentielle Methoden ausgewählt und verglichen. Da die alveolare Differenzierung ein komplexer Prozess aus fünf aufeinanderfolgenden Stufen darstellt, wurden Gen- und Proteinexpressionsanalysen relevanter Marker in jeder Differenzierungsstufe vergleichend zwischen 2D und 3D durchgeführt, um die Eignung der Kulturbedingungen für die Simulation der embryonalen Lungenentwicklung *in vitro* zu prüfen. Dabei wurde sowohl auf gesunde, als auch genetisch veränderte hiPSC-Linien zurückgegriffen und anhand dieser die Robustheit und Übertragbarkeit der Methoden auch für Krankheitsmodelle (am Beispiel Cystische Fibrose) demonstriert. Mit dem in dieser Arbeit entwickelten, uniformen Differenzierungsprotokoll konnte gezeigt werden, dass sowohl die 2D-, als auch die 3D-Differenzierung geeignet ist, alveolare Epithelzellen aus hiPSC für die präklinische Forschung zu generieren. Es konnte zudem gezeigt werden, dass deutliche Unterschiede zwischen 2D und 3D in der Gen- und Proteinexpression in den frühen Differenzierungsstufen auftreten, sich diese in fortschreitenden Entwicklungsstufen abschwächen und letztlich auf die Reife der resultierenden alveolaren Epithelzellen keinen Einfluss nehmen. Am aktuellen Krankheits- und Forschungsbeispiel COVID-19 konnte demonstriert werden, dass die aus beiden Differenzierungsstrategien stammenden alveolaren Epithelzellen für Infektionsstudien mit SARS-CoV-2 genutzt werden können. Zudem wurde in dieser Arbeit ein geeigneter Zeitpunkt zur Kryokonservierung von 2D-differenzierten Lungenvorläuferzellen identifiziert, um die zukünftige Aufbewahrung und Verkürzung der Differenzierung in alveolare Epithelzellen zu ermöglichen.

## Summary

Lung diseases rank the second place of the global leading causes of mortality. In order to tackle pulmonary diseases and to find new therapeutic options, it is necessary to focus on the development of physiological relevant *in vitro* lung models. Human induced pluripotent stem cell (hiPSC)-derived alveolar epithelial cells (AECs) are promising tools for pharmaceutical *in vitro* screening. With regard to the required quality and quantities for industrial application, the development of reproducible and robust differentiation processes is demanded. For this reason, the overall goal of this work was the identification of suitable strategies for the differentiation of AECs for their application in preclinical research.

To achieve this goal, the planar, static 2D- and the dynamic bioreactor-based 3D-differentiation have been pursued and compared as potential methods. Since the alveolar differentiation is a complex process consisting of five consecutive stages, comparative gene and protein expression analysis between 2D and 3D have been performed in order to test the suitability of the methods to simulate the embryonal lung development *in vitro*. Healthy as well as genetically modified hiPSC-lines have been used to prove the robustness and transferability of the methods even for disease models as for Cystic Fibrosis. With the uniform differentiation protocol, which has been developed within the scope of this work, it could be demonstrated, that the 2D- as well as 3D-differentiation method are suitable to generate AECs for preclinical research applications.

It could be shown, that significant differences in the gene and protein expression between 2D and 3D occur at early differentiation stages and mitigate at later developmental stages, thus not influencing the quality of the resulting AECs in the end. By the current example of COVID-19, AECs generated within both methods were successfully demonstrated to recapitulate the infection with SARS-CoV-2 at a physiological manner. Moreover, an appropriate time point for the cryopreservation of 2D-differentiated lung progenitor cells has been identified to enable the storage and shorter differentiation time of AECs for preclinical applications in future.

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Δ	Delta
∅	Durchmesser
%	Prozent
2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
ACE2	Angiotensin Converting Enzyme 2
AFE	Anterior Foregut Endoderm
ALI	Air-Liquid-Interface
AQP5	Aquaporin 5
AT1	Alveolare Epithelzellen Typ 1
AT2	Alveolare Epithelzellen Typ 2
ATCC	American Type Culture Collection
BMP	Bone morphogenetic protein
BMP4	Bone morphogenetic protein 4
cAMP	8-Bromadenosin-Monophosphat zyklisch
BSA	Bovines Serumalbumin
ca.	Circa
CAS	CRISPR-associated protein
CAV1	Caveolin 1
cDNA	Complementary DNA
CF	Cystische Fibrose
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CLSM	Confocal laser scanning microscopy
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CT	Cycle Treshold
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4
CYP2D6	Cytochrom P450 2D6
CYP450	Cytochrom P450
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DE	Definitives Endoderm
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium



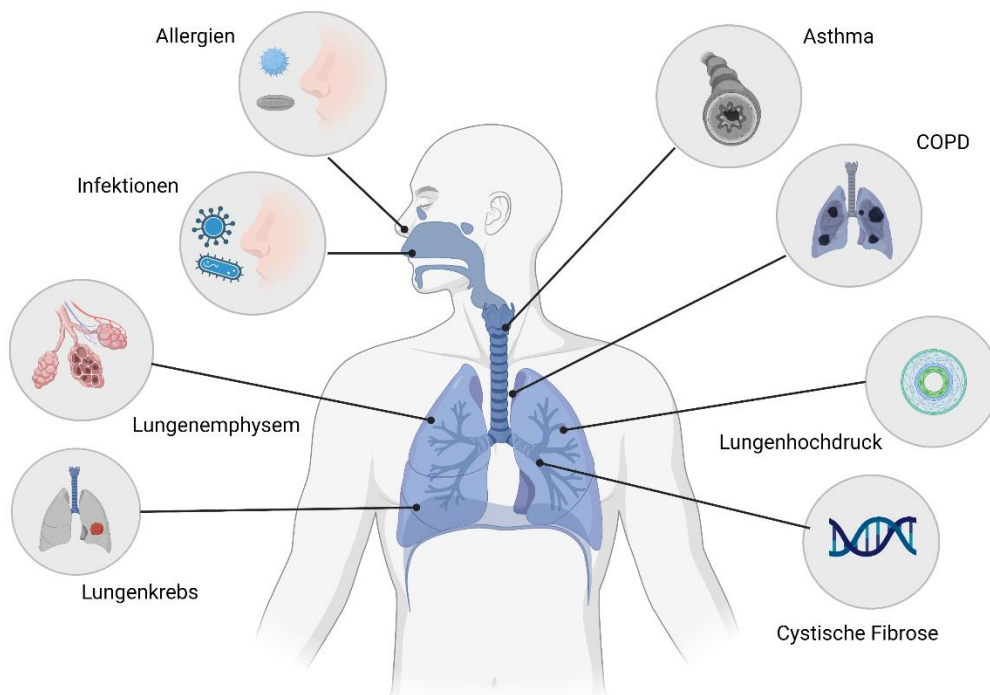
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	Didesoxyribonukleosid-Triphosphate
EB	Embryoid Body
EBISC	European Bank for induced pluripotent stem cells
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epithelial Growth Factor
ESCs	Embryonal stem cells
EZM	Extrazellulärmatrix
F508del	Phenylalanin Deletion Position 508
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGF2	Fibroblast Growth Factor 2
FGF10	Fibroblast Growth Factor 10
FKS	Fetales Kälberserum
FOXA2	Forkhead-Box-Protein A2
g	Gramm
g	Gewichtskonstante
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
hiPSCs	Human induced pluripotent stem cells
IBMX	Isobutylmethylxanthin
IgG	Immunglobulin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
iPSCs	Induced pluripotent stem cells
KGF	Keratinocyte Growth Factor
LB	Lamellar Bodies
LP	Lung Progenitor
M	Molar
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
mRNA	Messenger RNA

MTG	Monothioglycerol
NAM	Non-animal methods
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
ng	Nanogramm
NKX2.1	NK2 homeobox 1
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDPN	Podoplanin
PSCs	Pluripotent stem cells
qPCR	Quantitative real-time PCR
RA	Retinoic acid
RNA	Ribonucleic acid
ROCK	Rho-associated kinase inhibitor
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rpm	Rounds per minute
RQ	Relative Quantification
RT	Reverse Transkriptase
SHH	Sonic hedgehog
SOX2	Sex-determining region Y- Box 2
SOX9	Sex-determining region Y- Box 9
SOX17	Sex-determining region Y- Box 17
SP-A	Surfactant Protein A
SP-B	Surfactant Protein B
SP-C	Surfactant Protein C
SP-D	Surfactant Protein D
SRY	Sex-determining region Y
ssRNA	Single-stranded RNA
TALEN	Transcription Activator-like Effector-Nuklease
TGF-β	Transforming Growth Factor beta
TMPRSS2	Transmembrane Protein Serine Subtype 2
TTF-1	Thyroidaler Transkriptionsfaktor 1
vs	versus
WHO	World Health Organization
WNT	Wingless Int
ZFN	Zinkfingernuklease

## 1. Einleitung

### 1.1. Lungenerkrankungen: Die zweithäufigste Todesursache weltweit

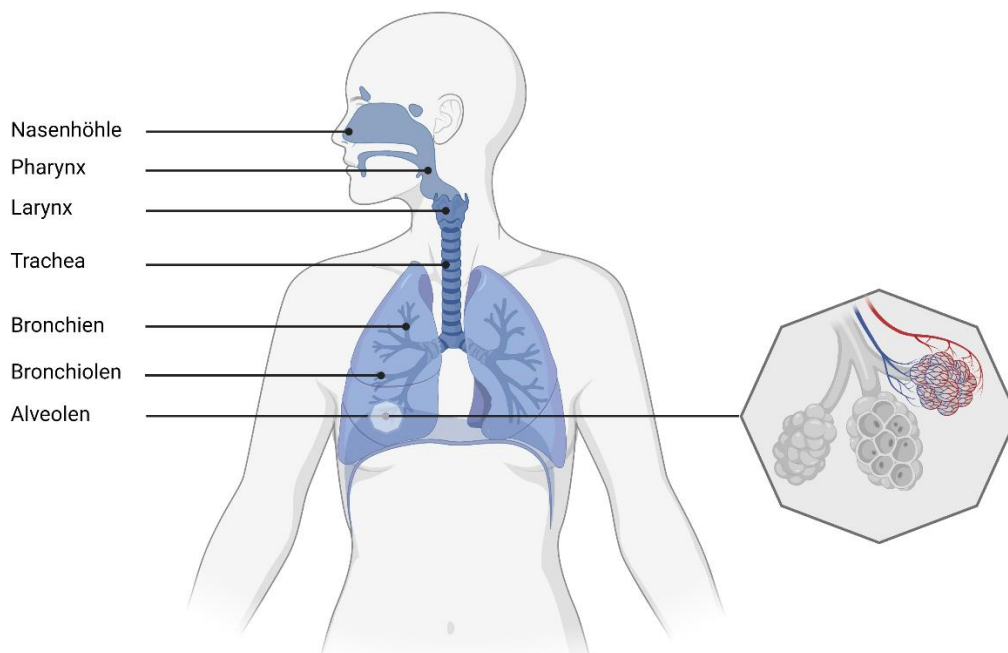
Jährlich sterben nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) etwa 55 Millionen Menschen weltweit [1]. Die Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD), die meist durch Rauchen verursacht wird, fordert etwa 3 Millionen Todesopfer pro Jahr [2]. Erworbene Atemwegserkrankungen wie Lungenentzündungen, Grippe oder COVID-19 machen ca. 3,2 Millionen Todesfälle aus. Lungenkrebs fordert jährlich weitere 1,7 Millionen Menschenleben, als Ursache hierfür wird ebenfalls meist das Rauchen benannt. Summiert man diese Todesursachen, die die Atemwege und die Lunge betreffen, fordern Lungenerkrankungen mit insgesamt 7,9 Millionen Todesfällen jährlich die zweit meisten Menschenleben [1]. Laut Prognosen der WHO werden sie in den nächsten 20 Jahren an Bedeutung zunehmen. Einen Überblick häufiger Lungenerkrankungen gibt nachfolgende Abbildung 1 [3].



**Abbildung 1: Häufigste Lungenerkrankungen beim Menschen** [3]. Lungenerkrankungen liegen vor, wenn Trachea, Bronchien, Bronchiolen, Alveolen, Lungen- oder Rippenfell oder die Blutgefäße der Lunge betroffen sind. Sie können infektiöser, chronischer, genetischer oder immunologischer Ursache sein. Abbildung erstellt mit Biorender.com.

## 1.2. Die Funktion und Histologie der Lunge

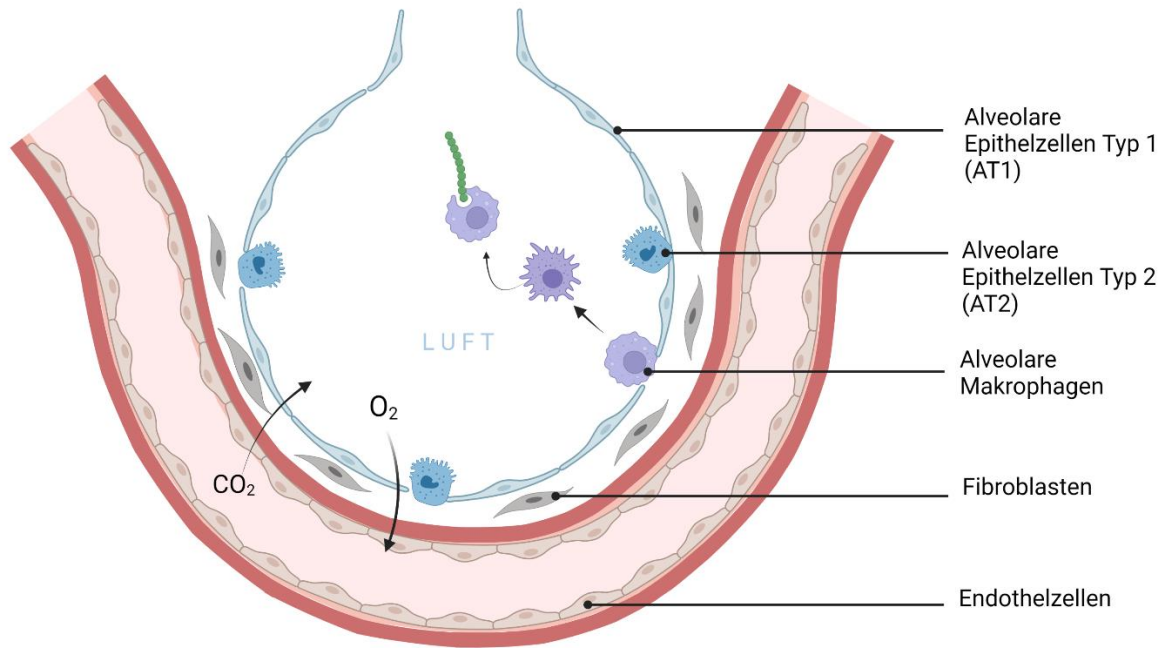
Ein Erwachsener nimmt zur Deckung seines Sauerstoffbedarfs im Durchschnitt 12 bis 15 Atemzüge pro Minute. Pro Tag strömen somit 10.000 Liter Luft durch die Atemwege, die aus Nasenhöhlen, Rachen (Pharynx), Kehlkopf (Larynx), Luftröhre (Trachea), Bronchien, Bronchiolen und Lunge bestehen (Abb.2) [4]. Die Lunge stellt das zentrale Organ der Atmung dar, sie übernimmt den lebenswichtigen Prozess des Gasaustauschs, bei dem Sauerstoff ( $O_2$ ) ins Blut aufgenommen und Kohlenstoffdioxid ( $CO_2$ ) aus dem Körper ausgeschieden wird [5]. Die eingeatmete Luft gelangt über die Nase oder den Mund über die Luftröhre in die beiden Hauptbronchien, welche sich baumartig in immer kleiner werdende Bronchiolen verzweigen, in die tiefen Atemwege. Die Bronchiolen werden schließlich von der kleinsten funktionellen Einheit der Lunge, den Alveolen, umgeben (Abb. 2). Damit diese die Funktion des Gasaustauschs erfüllen können, müssen sie eine große Oberfläche besitzen und die Gasdiffusion über eine möglichst kurze Distanz ermöglichen. Da ein Netzwerk aus feinen Blutgefäßen die Alveolen umgibt, sind Luft und Blut durch eine nur 0,1-2  $\mu m$  dünne Zellschicht voneinander getrennt [5, 6]. Da die Blut-Luft-Schranke in einer gesunden humanen Lunge eine Oberfläche von etwa 150-200  $m^2$  umfasst, sind die anatomischen Voraussetzungen eines funktionierenden Gasaustauschs gewährleistet. Da die Blut-Luft-Schranke mit ihrer großen Oberfläche im ständigen Kontakt zur Außenwelt steht, stellt sie auch einen potentiellen Eintrittspfad für Toxine und Pathogene durch Inhalation dar [4].



**Abbildung 2: Atemwege des Menschen** [4]. Eingeatmete Luft gelangt über die Nase oder den Mund in den Rachen, über die Luftröhre und Bronchien in die Alveolen, dem Ort des Gasaustauschs. Sie bestehen aus vielen verbundenen Bläschen und sind von Blutgefäßen umgeben. Abbildung erstellt mit Biorender.com.

Die als Körperbarriere agierende Trennschicht zwischen Luft und Blut enthält das alveolare Epithel, welches zu 99 % aus zwei Zelltypen, den alveolaren Epithelzellen Typ 1 und Typ 2 besteht. Alveolare Epithelzellen Typ 1 (AT1) sind flache, sich ausbreitende Zellen, die die für den Gasaustausch notwendige Oberfläche von etwa 95 % der alveolaren Oberfläche stellen [7, 8]. Alveolare Epithelzellen Typ 2 (AT2) sind in ihrer Form kubische, metabolisch aktive Zellen, die zwar einen kleineren Teil der alveolaren Oberfläche einnehmen, jedoch doppelt so häufig wie AT1 im alveolaren Epithel vertreten sind. Sie produzieren und sekretieren Lungensurfactant durch die Anwesenheit von speziellen Organellen, den sogenannten Lamellarkörperchen (*Lamellar Bodies*, LBs). Lungensurfactant ist eine lipoproteinreiche Substanz, deren Funktion unter anderem das Herabsetzen der Oberflächenspannung der Alveoli umfasst und somit für eine korrekte Lungenfunktion unerlässlich ist [7, 9–11]. AT1 sind terminal differenzierte Zellen, die teilungsunfähig sind und bei Verlust durch differenzierende AT2 ersetzt werden [7, 12]. Da die Basallamina dieser beiden Zelltypen mit der des Kapillarendothels verschmolzen vorliegt, ist eine direkte Verbindung zum Blutkreislauf gewährleistet (Abb.3) [7, 8]. Neben den beiden Epithelzelltypen und den Endothelzellen, die gemeinsam eine Körperbarriere ausbilden, sind auch Zellen der Immunabwehr in den Alveolen vertreten. Alveolare Makrophagen sind spezialisierte, gewebsresidente Makrophagen, die eingeatmeten Staub und Pathogene wie Viren phagozytieren und andere Vertreter des Immunsystems wie Monozyten, T-Zellen und neutrophile Granulozyten in die Lunge rekrutieren (Abb. 3) [7, 13].

Die alveolare Barriere stellt Angriffspunkt für viele Schadstoffe und Pathogene dar, die tagtäglich mit der Atemluft in den Alveolarraum gelangen. Diese umfassen beispielsweise Luftschadstoffe, industrielle und kommerzielle Chemikalien, Konsumgüter, Feinstaub, Bakterien und Viren. Viele dieser Schadstoffe und Pathogene können akute oder chronische Auswirkungen auf die Lungenfunktion haben und die Entstehung von Krankheiten fördern [14]. So löst das neu aufgetretene *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2) durch Infektion der respiratorischen Epithelzellen und AT2 die Krankheit COVID-19 (*Coronavirus Disease-2019*) aus. Diese kann aufgrund schwerwiegender, respiratorischer Pathologien zu langanhaltenden Schädigungen der Lunge führen und sogar lebensbedrohlich werden [15]. Eine weitere, nicht erworbene, sondern durch einen genetischen Defekt angeborene, schwere Lungenkrankheit stellt die Cystische Fibrose (CF) dar. In den folgenden Kapiteln werden die theoretischen Hintergründe zu diesen beiden Krankheitsbildern erläutert, da sie Lungenerkrankungen mit akutem Forschungsbedarf zur Entwicklung von neuartigen Arzneimitteln und Behandlungsmöglichkeiten darstellen und somit in dieser Arbeit als potentielle Anwendungsbeispiele von alveolaren Epithelzellen in der präklinischen Forschung dienen.



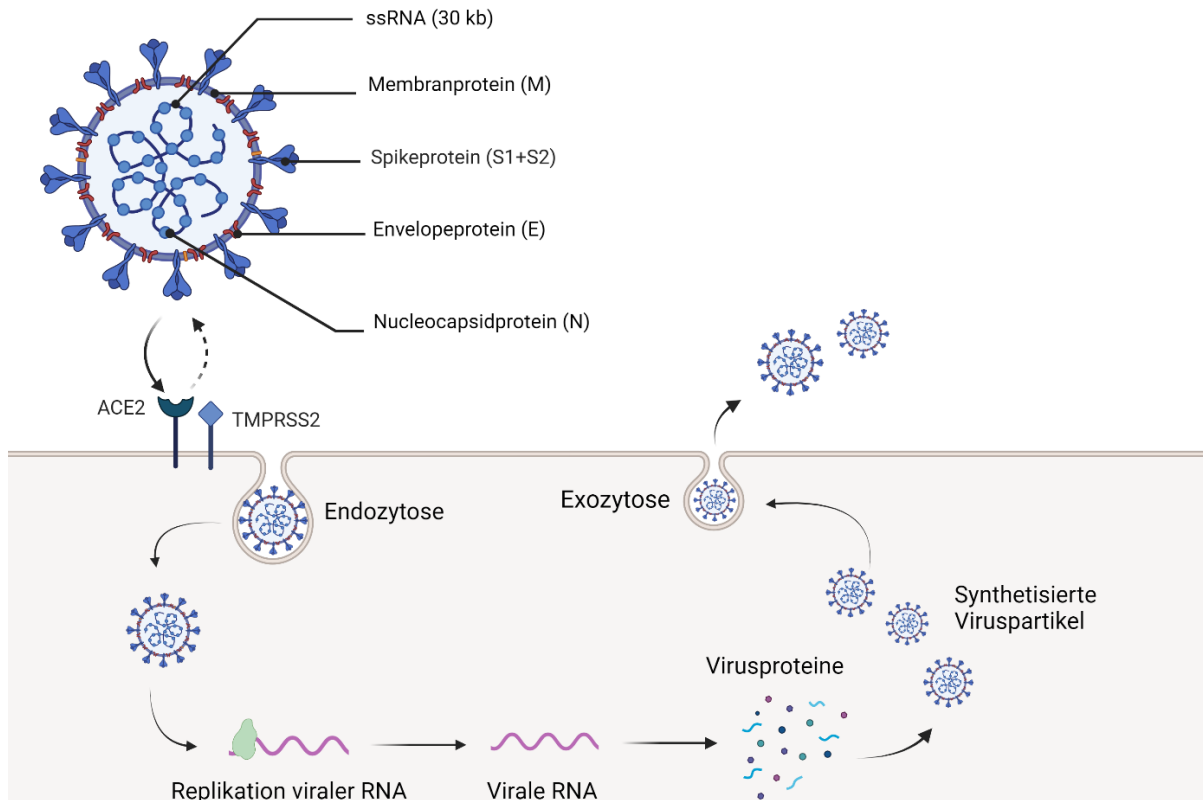
**Abbildung 3: Zellulärer Aufbau der Alveole.** Das alveolare Epithel besteht aus alveolaren Epithelzellen Typ 1 und 2. Ihre Basallamina aus Fibroblasten verbindet sie mit dem Kapillarendothel. Der eingeatmete Sauerstoff diffundiert in sauerstoffarmes Blut, während Kohlenstoffdioxid in die Alveole diffundiert und ausgeatmet wird. Eindringende Pathogene werden von alveolaren Makrophagen eliminiert. Abbildung modifiziert von Casals et al. [11]. Abbildung erstellt mit Biorender.com.

### 1.3. Lungenerkrankungen mit akutem Forschungsbedarf

#### 1.3.1. COVID-19

SARS-CoV-2 ist ein RNA-Virus und wird den sogenannten Betacoronaviren zugeordnet. Es löst nach erfolgter Infektion des Menschen COVID-19 aus. Mit den in den letzten 20 Jahren aufgetretenen Coronaviren *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus* (SARS-CoV) und *Middle East Respiratory Syndrome-Coronavirus* (MERS-CoV), die ebenfalls schwere, respiratorische Erkrankungen auslösen, konnten Sequenzübereinstimmungen von 79.5 % und 51.8 % nachgewiesen werden [16]. Es wird vermutet, dass SARS-CoV-2, das schnell nach seinem erstmaligen Auftreten Ende des Jahres 2019 in China eine weltweite Pandemie durch die Übertragung von Mensch zu Mensch auslöste, von einem ursprünglichen Coronavirus aus der Fledermaus stammt [15, 17, 18]. Die drei genannten Coronaviren SARS-CoV, SARS-CoV-2 und MERS-CoV unterscheiden sich von weiteren humanen Coronaviren wie HCoV-229E and HCoV-OC43, die in der Bevölkerung zirkulieren und saisonale und milde respiratorische Infektionen auslösen, in ihrer Pathogenität. Durch die Infektion von bronchialen und alveolaren Epithelzellen oder Epithelzellen in den oberen Atemwegen, können SARS-CoV(-2) und MERS-CoV schwerwiegende, respiratorische Pathologien wie Pneumonien, bis hin zum lebensbedrohlichen *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) verursachen [15].

SARS-CoV-2 enthält eine 30 Kilobasenpaar lange, einzelsträngige RNA (*single-stranded RNA*, *ssRNA*), die für vier Virusproteine kodiert: Spike-Protein (S), Membran-Protein (M), Envelope-Protein (E) und Nukleocapsid-Protein (N) [19, 20]. Die Coronavirus-Infektion einer Wirtszelle beginnt mit der spezifischen Bindung des S-Proteins an die Eintritts-Rezeptoren. SARS-CoV-2 dringt über die Adsorption an den *Angiotensin-converting enzyme 2* Rezeptor (ACE2) mit anschließender Endozytose in die Wirtszelle ein [20–23]. Folglich spielt die Expressionshäufigkeit von ACE2 verschiedener Zelltypen sowie das Vorkommen in verschiedenen Gewebetypen eine entscheidende Rolle über den viralen Tropismus und die Pathogenität der Virusinfektion [15]. Das Virus benötigt zur Aktivierung der endozytotischen Route nach der Adsorption an der Zelloberfläche eine proteolytische Prozessierung des S-Proteins, woran die Proteasen der Wirtszelle maßgeblich beteiligt sind, darunter die Transmembran-Protease-Serin-Protease 2 (TMPRSS2). Durch RNA-Sequenzierungen von Einzelzellen konnte die Co-Expression von ACE2 und TMPRSS2 unter anderem in nasalen Epithelzellen, in den Bronchien und der distalen Lunge nachgewiesen werden, womit der Gewebe-Tropismus von SARS-CoV-2 erklärt werden könnte [24, 25]. Durch die Bindung an die Epithelzellen des respiratorischen Trakts beginnt die Replikation des Virus, folgend von der Migration neu entstandener Viruspartikel entlang der Atemwege (Abb. 4) [15, 20]. In schwerwiegenden Fällen erreicht SARS-CoV-2 schließlich die alveolaren Epithelzellen und führt in Folge eines Cytokinsturms zu ARDS, einer diffusen Schädigung der Alveolen, verbunden mit schwerer Atemnot. ARDS wird als hauptsächliche Todesursache in Patienten mit COVID-19 angesehen [17].



**Abbildung 4: Struktur und Lebenszyklus von SARS-CoV-2.** Das Virus besteht aus Membranproteinen (M), Spikeproteinen (S) mit zwei Untereinheiten (S1+S2), Envelopeproteinen (E) und Nucleocapsidproteinen (N). Das Spikeprotein adsorbiert an den Rezeptor ACE2. Die endozytotische Aufnahme in die Zielzelle erfolgt nach Prozessierung des Spikeproteins von TMPRSS2. Es erfolgt die Transkription und Translation viraler RNA in der Zielzelle. Aus den hergestellten Virusproteinen werden neue Viruspartikel synthetisiert, die die Zielzelle via Exozytose verlassen [20]. Abbildung erstellt mit Biorender.com.

Die Zulassung der COVID-19 Impfstoffe Ende 2020 ermöglichte die Eingrenzung der rapiden Ausbreitung des Virus und verhalf Krankenhausaufenthalte und Todesfälle zu reduzieren. Durch die zu geringe Impfquote in vielen Ländern, der schwindenden Immunität und dem bestehenden Risiko vor dem Auftreten neuer Virusvarianten wird deutlich, wie wichtig die Entwicklung innovativer, wirksamer COVID-19 Medikamente und therapeutischer Modalitäten in Zukunft sein wird [26]. Seit Beginn der Pandemie wurden eine Reihe von Virustatika, Antibiotika, immunmodulatorische Medikamente sowie Pharmazeutika gegen Malaria als wirkungsvoll gegen SARS-CoV-2 vermutet. Die meisten vielversprechenden Kandidaten konnten in einer hohen Anzahl an klinischen Studien in Stufe III + IV keine oder eine begrenzte Wirkungsfähigkeit zeigen, darunter Hydroxychloroquin, Remdesivir, Dexamethason, Baricitinib und viele weitere [26]. Der Arzneimittelkonzern Pfizer erlangte Anfang 2022 eine vorläufige Zulassung von Paxlovid für den europäischen Markt, einer Wirkstoffkombination aus Nirmatrelvir und Ritonavir. Es hemmt die Virusvermehrung im Körper effektiv durch den Proteaseinhibitor Nirmatrelvir, welches aufgrund der CYP450 Inhibierung in der Leber durch Ritonavir in ausreichend hoher Konzentration und



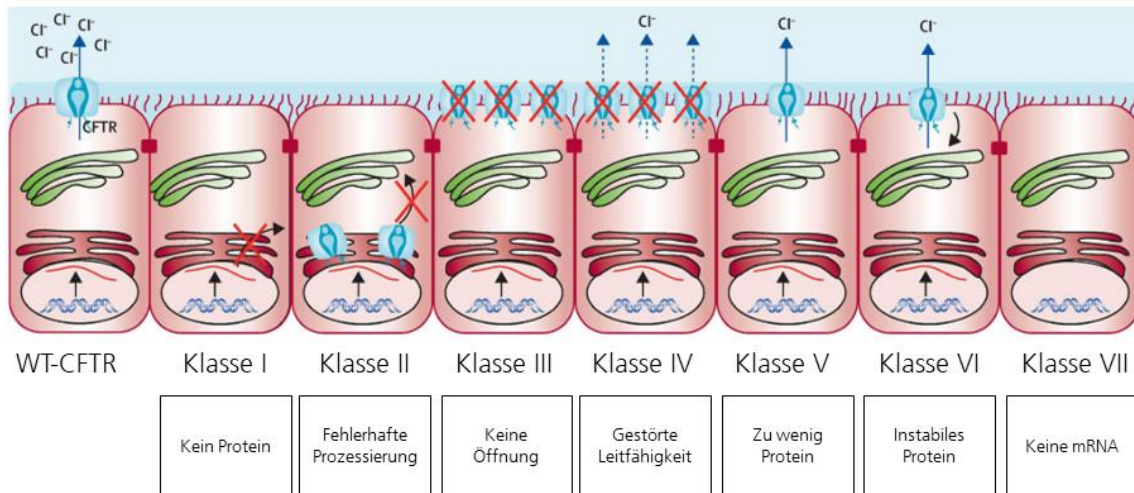
Dauer im Körper zirkulieren kann. Das Medikament ist daher bei früh erkannten SARS-CoV-2-Infektionen vorbeugend gegen schwere Verläufe und Krankenhausaufenthalte einsetzbar [27]. Jedoch bestehen viele Kontraindikationen, wie z.B. Unverträglichkeit mit Herzmedikamenten, Allergiemitteln und Krebsmedikamenten, weshalb das Präparat nicht breit eingesetzt werden kann. Zudem wurde berichtet, dass Patienten nach einer Paxlovid-Gabe nach einigen Tagen erneut erkranken können, was als sogenannter Rebound-Effekt beschrieben wird [27].

Bislang werden zur Untersuchung vielversprechender Wirkstoffkandidaten und zum Verständnis der Biologie, des Tropismus und der Pathogenese von SARS-CoV-2, zellbasierte Modelle sowie Tiermodelle (insbesondere Affen und transgene Mäuse) angewendet [28]. Mithilfe von RNA-Sequenzierungen einzelner Zelltypen konnten AT2 und AT1, Enterozyten und nasale Gobletzellen als co-exprimierende Zellen von ACE2 und TMPRSS2 identifiziert werden [29]. Bei zellbasierten Studien kommen immortalisierte Zelllinien wie Vero E6, Calu-3 und A549 aufgrund der Verfügbarkeit und geringen Kosten häufiger zum Einsatz als primäre Zellen [30]. Allerdings müssen Ergebnisse, die mit solchen Zelllinien generiert werden, in primären Zellen oder Tiermodellen überprüft werden. Vero E6 Zellen sind beispielsweise immortalisierte Nierenzellen aus dem Affen, die ACE2 exprimieren. Forscher, die Untersuchungen an dieser Zelllinie mit dem Anti-Malaria Medikament Hydroxychloroquin durchführten, kamen zu dem Schluss, dass dieses effektiv SARS-CoV-2 inhibieren könne [31], allerdings konnte dieser antivirale Effekt in humanen Atemwegsepithelzellen nicht bestätigt und auch in Hamstern, nicht-menschlichen Primaten und in klinischen Studien konnten keine prophylaktischen und therapeutischen Wirkungen festgestellt werden [32, 33]. Zukünftig werden also Zellmodelle benötigt, die die Wirkung antiviraler Medikamente im Menschen besser abbilden und voraussagen können.

Organoidmodelle, die für die Untersuchung der SARS-CoV-2 Biologie und für das Screening von Inhibitoren vielversprechend sind, könnten die Brücke zwischen simplen Zelllinien und komplexen Tiermodellen bilden. Eine veröffentlichte Studie mit humanen Nierenorganoiden beschrieb mithilfe derer die Identifikation von löslichem ACE2 als effektiven SARS-CoV-2-Inhibitor und bewies somit die physiologische Eignung von Organoiden zum Screening von Inhibitoren [34]. Mit Lungen- und Darmorganoiden konnten bisher potentielle Inhibitoren und multimodale Wirkungen von bereits FDA-zugelassenen Medikamenten identifiziert werden und sind daher für den Einsatz in der präklinischen Testung von COVID-19 Medikamenten als humane krankheitsrelevante Modelle geeignet [35–37]. Zurzeit bringen Organoide noch Limitationen mit sich, die für die breite Anwendbarkeit in der Medikamentenentwicklung und -testung zunächst noch überwunden werden müssen. Hierauf wird in den Kapiteln 1.4 und 1.5. weiter eingegangen.

### 1.3.2. Cystische Fibrose

Cystische Fibrose (CF), auch Mukoviszidose genannt, ist eine autosomal-rezessiv vererbte und somit angeborene schwere Stoffwechselerkrankung, die die Epithelzellen mehrerer Organe betrifft. Die Krankheit kann durch verschiedene Mutationen im sogenannten CFTR-Gen (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*-Gen) ausgelöst werden. Das auf Chromosom 7 lokalisierte Gen ist seit 1989 bekannt und codiert für einen membranständigen Ionen-transportkanal, der als Chloridkanal den Salz-Wasser-Haushalt von Epithelzellen reguliert [38]. Die auftretenden Veränderungen im Gen eines CF-Patienten führen zu einer Dysfunktion oder gar einem totalen Funktionsverlust dieses Ionenkanals. Derzeit sind über 2000 verschiedene Mutationen im CFTR-Gen bekannt, die in sieben Mutationsklassen kategorisiert werden (Abb.5) [7]. Klasse I Mutationen führen zu einem ganzheitlich fehlenden CFTR-Protein, da Stopp-Codon- oder Frameshift-Codon-Mutationen zu einem frühzeitigen Abbruch der Translation führen. Klasse II Mutationen führen zu einer fehlerhaften Prozessierung des Proteins, infolgedessen wird es intrazellulär enzymatisch abgebaut, bevor es die Zellmembran erreicht. In manchen Fällen ist das CFTR-Protein apikal vorhanden, jedoch stark reduziert. Klasse III Mutationen ermöglichen zwar die Synthesisierung des Proteins, jedoch kommt es zu einem gestörten Öffnungsmechanismus des Kanals. Eine verminderte Leitfähigkeit von CFTR führt zu einem reduzierten Ionenfluss bei Klasse IV Mutationen. Klasse V Mutationen führen zu einer verringerten Synthese des Proteins und infolgedessen zu einer reduzierten Anzahl funktionsfähiger Kanäle. Bei Klasse VI Mutationen wird das Protein aufgrund von Instabilität frühzeitig von Lysosomen abgebaut. Bei Klasse VII Mutationen ist keine mRNA für CFTR vorhanden (Abb. 5) [39]. Nur ein kleiner Teil der bekannten Mutationen führt tatsächlich zum Ausbruch der Krankheit [40]. Mit etwa 70.000 Krankheitsfällen und 1.000 jährlichen Neuerkrankungen weltweit, zählt CF zu einer der häufigsten lebensverkürzenden Krankheiten [41]. Die Deletion von Phenylalanin an Position 508 der Aminosäuresequenz (F508del), ist die am häufigsten auftretende CFTR-Mutation. Rund 95 % aller CF-Patienten besitzen wenigstens ein Allel mit dieser Mutation, homozygote F508del-Patienten machen ca. 70 % aller CF-Fälle mit der schwerwiegendsten Form der Krankheit aus [41]. Diese Mutation wird als Klasse II-Mutation definiert, hat aber zusätzliche Charakteristika von Klasse III und IV Mutationen, weshalb oftmals eine strikte Zuordnung der auftretenden Mutationen zu einer Klasse nicht möglich ist [39, 42].



**Abbildung 5: CFTR-Mutationsklassen bei Cystischer Fibrose.** Gezeigt sind die sieben möglichen Mutationsklassen, die entweder die Proteinsynthese gänzlich verhindern (Klasse I-VII), Fehler im Protein zu einer gestörten Funktionsweise (Klasse II+III+IV), einer reduzierten Anzahl (Klasse V) oder einem verfrühten Abbau (Klasse VI) führt. Modifiziert nach De Boeck 2020 [39].

Bei Betroffenen tritt die Bildung eines zähflüssigen Schleims auf, welcher der fehlenden Diffusion von Wasser aus der Zelle geschuldet ist. Diese trägt normalerweise zur Befeuchtung der Schleimhäute bei steigender Salzkonzentration außerhalb der Zelle bei. Im gesunden Zustand werden in Folge von einströmenden  $\text{Na}^+$ -Ionen  $\text{Cl}^-$ -Ionen aus der Zelle gepumpt. Aufgrund des Konzentrationsgefälles strömt Wasser aus der Zelle und es entsteht ein Flüssigkeitsfilm im Extrazellulärraum. Durch den fehlenden oder dysfunktionalen Ionenkanal bei CF werden keine  $\text{Cl}^-$ -Ionen in Folge des  $\text{Na}^+$ -Ioneneinstroms aus der Zelle gepumpt und Wasser verbleibt im Zellinneren. Hierdurch entsteht eine angesäuerte, wasserarme Umgebung außerhalb der Zelle, was zur Bildung eines zähflüssigen Schleims führt, der verschiedene Organe beeinträchtigt, vor allem aber zu Beschwerden in den oberen Atemwegen führt [43]. Die erleichterte Ansiedlung von Viren, Bakterien und Pilzen durch den vorhandenen Schleim in den Atemwegen birgt ein hohes Infektionsrisiko, weshalb häufig auftretende Lungenentzündungen und Infektionen zu den häufigsten Todesursachen von CF-Patienten zählen [38, 41]. Die Krankheit ist derzeit nicht heilbar, allerdings konnte die Lebenserwartung und Lebensqualität von CF-Patienten durch verschiedene Therapieansätze in den letzten Jahrzehnten stetig verbessert werden [44, 45].

Die Therapie bei CF umfasst weitgehend die Behandlung der Symptomatik durch den Einsatz von Mukolytika (Schleimlöser), Bronchodilatoren (Bronchien-erweiternde Wirkstoffe), Antibiotika, Virustatika und Fungiziden zur Behandlung und Vorbeugung häufig auftretender Atemwegsinfektionen [41, 46]. Die Entdeckung und FDA-Zulassung des Wirkstoffs Ivacaftor im Jahre 2011 ebnete den Weg für den Therapieansatz von CFTR-Modulatoren, deren Ziel die Verbesserung oder

Wiederherstellung der Funktionalität des CFTR-Kanals ist [41, 47, 48]. Ivacaftor agiert als Potentiator, der das Öffnen der Chloridionenkanäle verstärkt und somit ein höherer Ionenfluss erzielt. Die dem Öffnungsdefekt zugrundeliegende Mutation (G551D) ist jedoch selten, weshalb nur ca. 5 % der CF-Patienten von dem Wirkstoff profitieren [49]. Eine weitere Art von CFTR-Modulatoren zielt auf die Korrektur des generellen Defekts im CFTR-Kanal ab. Eine Kombination aus zwei Wirkstoffen (Lumacaftor + Ivacaftor) unterstützt den Transport des fehlgefalteten Proteins an die Zelloberfläche und korrigiert und erhöht die Aktivität des nicht-funktionellen Kanals. Dieses Medikament ist für die weitverbreitete F508del-Mutation und für weitere Mutationen mit einer Restfunktion des Kanals zugelassen, allerdings liegt die um nur etwa vier Prozent verbesserte Lungenfunktion deutlich unter den Erwartungen [50, 51]. Patienten mit sehr seltenen Mutationen profitieren bisher nicht von der Entwicklung der CFTR-Modulatoren, da die Entwicklung wirtschaftlich unprofitabel ist. Um die Wirksamkeit von Medikamenten auf schnellem Weg nachweisen zu können, werden Methoden benötigt, die bestenfalls individuell auf Patienten abgestimmt angewendet werden können, da nicht nur die genetische Ausstattung, sondern auch viele weitere Faktoren eines Patienten, zur Unwirksamkeit oder Wirksamkeit eines Medikaments beitragen können. Derzeit spielen die Entwicklung von In-vitro-Testmodellen und Biobanken eine große Rolle in der CF-Forschung [45]. So werden beispielsweise Organoide aus dem Darmepithel von CF-Patienten mit seltenen Mutationen generiert, um die Wirksamkeit eines Medikaments für den jeweiligen Patienten daran bestimmen zu können. Mit dieser Methode konnten insgesamt schon 200 Patienten getestet werden, 33 davon aus Deutschland [52]. Kanadische Forscher untersuchen derzeit die Wirksamkeit verfügbarer Substanzen an nasalen Epithelzellen, die aus Patienten isoliert wurden [53]. Auch die Errichtung einer Biobank mit eingelagerten Patientenproben ist im Rahmen dieses kanadischen Programms geplant, sodass neu entwickelte Wirkstoffe direkt an den hinterlegten Patientenproben getestet werden können, um diesen schnellstmöglich eine Therapie zu ermöglichen [54]. Vor allem humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSCs) sind als nützliches Instrument für die Erforschung der Pathophysiologie von CF und für die patienten-individuelle Wirkstofftestung anzusehen. Zuletzt wurde 2021 eine neue Teststrategie für die CF-Therapieentwicklung publiziert, die auf in Lungenvorläuferzellen differenzierten hiPSCs aus CF-Patienten beruht [55].

#### **1.4. Bedeutung von In-vitro-Modellen in der Lungenforschung**

Um der hohen Sterblichkeitsrate von Lungenkrankheiten zukünftig entgegenwirken zu können, werden aussagekräftige, human- und krankheitsrelevante Testmodelle benötigt, die zur Aufklärung molekularer Mechanismen eines Krankheitsbildes oder eines neu auftretenden Erregers beitragen, Wirkstofftargets schnell identifizieren können, die Entwicklung geeigneter neuer

Therapien vorantreibt oder aber auch toxikologische Einschätzungen von giftigen inhalativen Substanzen und Umweltschadstoffen erlauben. Die Entwicklung von physiologisch relevanten In-vitro-Modellen ist in den letzten Jahren rasant fortgeschritten und ist fortan das Ziel vieler Wissenschaftler und internationalen Forschungsprojekten. Trotz der bereits betriebenen Forschung in den letzten Jahrzehnten im Bereich der Lungenkrankheiten, konnten für viele Fragestellungen noch keine zufriedenstellenden Antworten oder Lösungen gefunden werden. Dies ist zu einem großen Teil auch auf den Einsatz von Tiermodellen zurückzuführen, die es nicht erlauben, die gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen zu übertragen, da sich die Lungenfunktion und Gewebeorganisation zwischen Mensch und Tier, insbesondere die des oft eingesetzten Nagers, erheblich unterscheiden. So ist beispielsweise das Chemokin Interleukin-8, welches im Menschen während einer Entzündungsreaktion neutrophile Granulozyten rekrutiert und aktiviert, in Mäusen nicht vorhanden [56]. Es wurde außerdem herausgefunden, dass Tiermodelle, die äußerst komplex ablaufende Karzinogenese beim Menschen nicht ausreichend abbilden können, da die Ergebnisse von präklinischen auf klinische Studien zu weniger als 8 % übertragen werden konnten [57]. Die Entwicklung von In-vitro-Modellen kann hingegen dazu beitragen, Studienergebnisse besser auf den Menschen zu extrapolieren und Tiermodelle im Sinne des 3R-Prinzips zu reduzieren. Ziel von 3R, welches 1959 von William Russell und Rex Burch veröffentlicht wurde, ist es, Tierversuche zu vermeiden und durch Alternativmethoden zu ersetzen, wann immer es möglich ist (*Replacement*), die Zahl der Tiere zu reduzieren (*Reduction*) und Leiden der Versuchstiere auf ein Minimum zu beschränken (*Refinement*) [58]. Das 3R-Prinzip wurde 2010 in der europäischen Richtlinie 2010/63/EU zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere umgesetzt und gilt in Deutschland und vielen anderen Ländern als Grundlage für die Tierschutzpolitik und Praxis moderner Forschungsansätze [59, 60]. Die Entwicklung und Optimierung von sogenannten NAMs (*non-animal methods*) ist für die Umsetzung und Anwendung des 3R-Prinzips somit unerlässlich.

Organtypische Modelle, die die humane Lungenphysiologie und Anatomie korrekt widerspiegeln, spielen bei NAMs eine sehr bedeutende Rolle. Die pulmonale Architektur und die Zellheterogenität der Lunge sind *in vitro* schwer nachzustellen und die Interaktion verschiedener organspezifischer Zelltypen, das Zusammenspiel mit der umgebenden Extrazellulärmatrix (EZM) und systemische Antworten im Organismus sind sehr komplex. Jedoch werden unterschiedliche Anstrengungen unternommen, gewebs- und organtypische Merkmale in verschiedenen Modellansätzen nachzustellen. Organoide sind beispielsweise vielversprechende Ansätze, da sich die Zellen in ihrer anatomisch korrekten Anordnung selbst organisieren und je nach Größe, Nährstoffgradienten entstehen [61]. Mikrofluidische Chip-Modelle sollen zum einen den Scherstress, den Zellen *in vivo* erfahren, nachahmen und die systemische Verteilung und den Metabolismus von beispielsweise pharmakologisch aktiven Substanzen im Organismus abbilden. Hierbei kommen auch mehrere Chipsysteme zum Einsatz, die aus verschiedenen Organmodulen bestehen und in ihrem

Zusammenspiel einen Organismus imitieren sollen. Zum anderen wurden bereits Chip-Modelle entwickelt, die die Atmungsbewegungen der Lunge berücksichtigen, das heißt Lungenzellen bewusst unter mechanischen Stress zu setzen, damit sie sich physiologisch verhalten. Im Bereich des Tissue Engineerings arbeitet man an vielversprechenden Biomaterialien als Gerüststrukturen (Scaffolds) und an De- und Rezellularisierungstechniken von EZM, um Lungen beispielsweise zur Transplantation nachzubauen [61]. Ein weiterer, zu berücksichtigender Aspekt ist die anatomisch gegebene Grenzfläche zwischen Blut und Luft. Daher werden Lungenepithelzellen in organotypischen Modellen bevorzugt an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche (*air-liquid-interface*, ALI) kultiviert und mit Testsubstanzen in dafür vorgesehenen Apparaturen exponiert [62]. Nicht nur die Komplexität der Lunge an sich stellt eine Herausforderung für die In-vitro-Forschung dar, sondern auch die Auswahl bzw. Verfügbarkeit einer geeigneten Zellquelle, die nicht nur die pulmonale Zellbiologie und Zellfunktion widerspiegelt, sondern auch in ausreichender Menge und gleichbleibender Qualität für Screeningansätze zur Verfügung steht. Gängige Zelllinien wie A549, Calu-3, BEAS-2B oder 16HBE14o<sup>-</sup> sind in ihrer Handhabung einfach und unbegrenzt verfügbar, jedoch ist unklar, wie gut sie die Physiologie der Lunge aufgrund ihrer Abstammung aus Tumorgewebe oder aufgrund ihrer Immortalisierung oder Transformation, tatsächlich widerspiegeln können [63]. Primärzellen hingegen, die aus Gewebematerial von Bronchoskopien oder Biopsien isoliert werden können, reflektieren die funktionellen Eigenschaften des Lungenepithels sehr gut [64]. Sie konnten 1975 zum ersten Mal *in vitro* kultiviert werden und bilden an der Luft zelltypische Zilien aus und unterliegen auch einer Selbstorganisation, wenn man sie in EZM kultiviert. Große Nachteile dieser Zellquelle sind jedoch die stark begrenzte Verfügbarkeit und die limitierte Kultivierungsspanne, die die Immortalisierung von humanen bronchialen Epithelzellen (HBE), die 1988 erstmalig publiziert wurde, zu Zelllinien wie BEAS-2B und 16HBE14o<sup>-</sup> hervorgerufen haben. Eine immortalisierte, AT1-ähnliche Zelllinie wurde erst 20 Jahre später, 2008, erstmals beschrieben [64]. Die erste 3D-Methode mit HBE wurde 2009 publiziert, mithilfe derer sogenannte Bronchosphären generiert werden konnten [65]. Sie ähneln den strukturellen Einheiten der Lunge und könnten als Screening-Plattform eingesetzt werden [66]. Der Begriff Alveolosphären, also vergleichbare 3D-Modelle aus alveolaren Epithelzellen anstatt Bronchialepithelzellen, wurde 2013 erstmals genannt. Die zeitliche Verzögerung zwischen dem Fortschritt bronchialer und alveolarer Zelltypen ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die stark limitierte Beschaffung von Zellen aus der distalen Lunge zurückzuführen, da hierfür Biopsien, idealerweise aus gesundem Gewebe, benötigt werden [63]. Eine mögliche Zellquelle, die unbegrenzt verfügbar und physiologisch ist, zudem ermöglicht, einen bestimmten Zelltyp über einen längeren Zeitraum differenziert in Kultur zu halten, sind induzierte pluripotente Stammzellen (iPSCs). Aufgrund ihres pluripotenten Zustandes sind sie vergleichbar mit embryonalen Stammzellen, rufen jedoch keine ethischen Bedenken hervor, da sie aus reifen Körperzellen beliebiger Spender generiert werden können. Daher sind sie

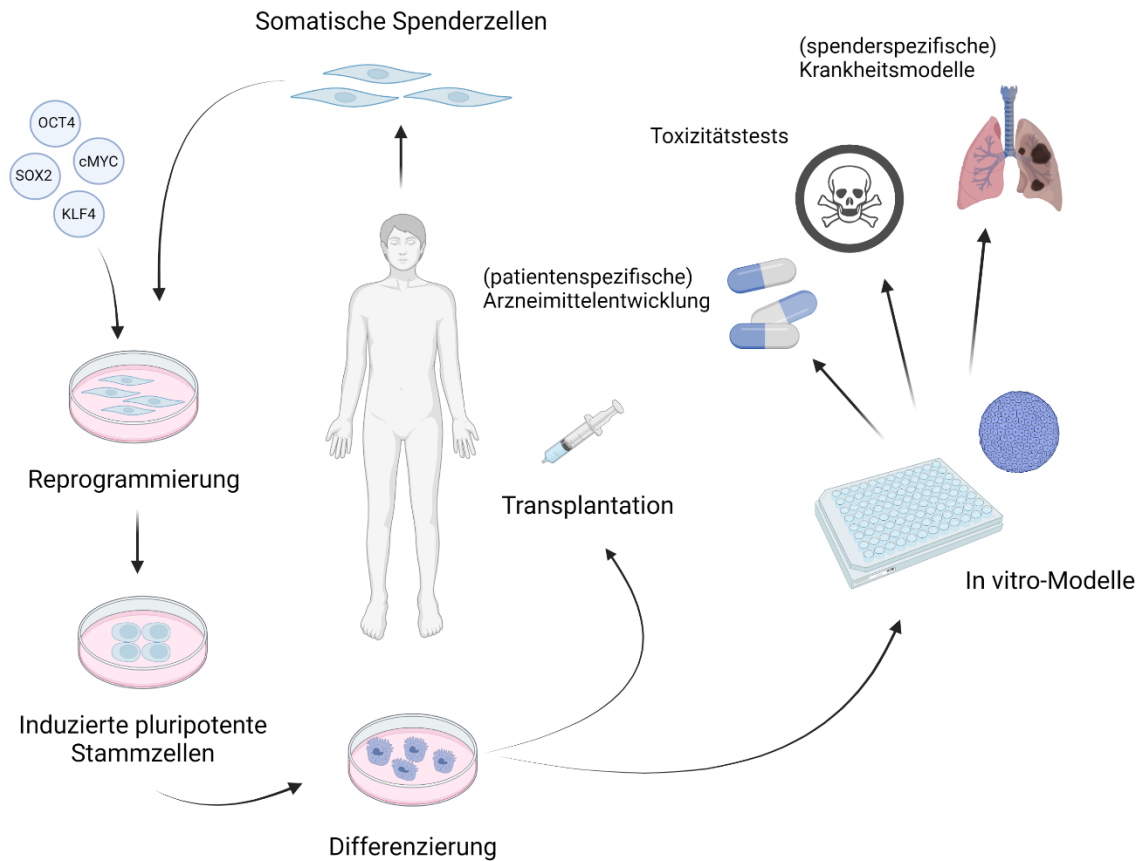
auch besonders vielversprechend im Bereich der personalisierten Medizin und Medikamentenscreenings. Im beispielhaften Fall von genetischen Krankheiten wie CF, wo das Erbgut einzelner Patienten für den Therapieerfolg entscheidend ist, könnten personalisierte Lungenmodelle, die individuelle genetische Eigenschaften des Patienten repräsentieren, den klinischen Erfolg maßgeblich verbessern [67]. Protokolle für die Herstellung verschiedener Lungenzelltypen aus dieser Zellquelle bestehen bereits, jedoch müssen noch viele Optimierungen vorgenommen und Strategien entwickelt werden, den gewünschten Zelltyp in gleichbleibender Qualität und hoher Quantität für den Einsatz in der Grundlagen- und angewandten Forschung zu generieren.

#### **1.4.1. Humane induzierte pluripotente Stammzellen als vielversprechende Zellquelle**

Im frühen 20. Jahrhundert ging man davon aus, dass die Differenzierung somatischer Zellen einen unidirektionalen und irreversiblen Prozess darstellt, der es für Zellen unmöglich macht, in einen unspezialisierten, pluripotenten, stammzell-ähnlichen Zustand zurückzukehren [68]. Der britische Zellbiologe John B. Gurdon entdeckte durch seine Experimente mit afrikanischen Krallenfröschen jedoch, dass die Programmierung adulter Zellen unter bestimmten Bedingungen rückgängig zu machen ist. 1962 gelang es ihm, durch das Austauschen des Zellkerns einer Eizelle mit dem einer Darmzelle, eine voll funktionsfähige Kaulquappe mit allen notwendigen Geweben und Zellen heranwachsen zu lassen [69]. Es muss also eine Umprogrammierung des Erbguts der Darmzelle in der Umgebung der Eizelhülle stattgefunden haben. Die Frage, welche Faktoren dazu führten, dass eine differenzierte Körperzelle zu einer undifferenzierten Stammzelle wurde, blieb lange Zeit unbeantwortet [69]. Mehr als 40 Jahre später gelang es dem japanischen Stammzellforscher Shin'ya Yamanaka im Jahre 2006, diese Frage zu beantworten. Der Forscher arbeitete mit murinen embryonalen Stammzellen, Zellen in einem pluripotenten Zustand, die neben einem unbegrenzten Selbsterneuerungspotential, in alle Gewebetypen eines Körpers differenzieren können. Sie kommen in einem sehr frühen Zustand der Embryonalentwicklung, in der Blastozyste, vor [70]. Die Antwort auf die Frage, was embryonale Stammzellen zu diesen macht, vermutete Yamanaka in den Genen der Zellen vorzufinden. Er stellte die Hypothese auf, dass spezifische Transkriptionsfaktoren zu den Eigenschaften der Stammzellen, wie dem Differenzierungs- und Proliferationspotential, beitragen und schließlich diese Faktoren auch dazu führen könnten, differenzierte Körperzellen zu transformieren [71]. 24 potentielle Gene wurden von Yamanaka et al. ausgewählt, die zur Reprogrammierung in murine Fibroblasten durch Retroviren eingebracht wurden. Durch eine schrittweise Reduktion der Transkriptionsfaktoren, konnten schließlich vier, OCT3/4, SOX2, c-MYC und KLF4, definiert werden, deren Überexpression in den Fibroblasten zum Auftreten von Stammzellkolonien führten. Die in den pluripotenten Zustand rückversetzten Zellen

wurden induzierte pluripotente Stammzellen genannt (*induced pluripotent stem cells*, iPSCs) [72]. Die Experimente und erfolgreiche Reprogrammierung, wie sie mit murinen Zellen durchgeführt wurden, konnte nur ein Jahr später von denselben Forschern mit humanen Haut-Fibroblasten wiederholt werden [73]. Fast zeitgleich veröffentlichte eine weitere Forschungsgruppe aus den USA die ebenfalls gelungene Reprogrammierung von humanen somatischen Zellen mit den teils abweichenden Expressionsfaktoren Oct3/4, SOX2, NANOG und LIN28 [74]. Gurdon und Yamanaka wurden 2012 schließlich gemeinsam für die Entdeckung, dass reife Zellen reprogrammiert werden können, mit dem Nobelpreis in Physiologie und Medizin ausgezeichnet [75]. Der experimentelle Durchbruch Yamanakas wurde als Lösung für die ethischen Probleme, die die Stammzellforschung bislang mit sich brachte, angesehen, da embryonale Stammzellen nur aus frühen Embryonen gewonnen werden können [76]. Humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSCs) haben zudem den Vorteil, dass sie aus jeglichen Körperzellen eines individuellen Spenders gewonnen werden können. So ist es prinzipiell möglich, aus jeder Gewebeprobe durch verschiedene bis heute entwickelte Methoden (z.B. Reprogrammierung durch Adeno-, Lenti-, Sendai- oder Retro-Viren, episomale Plasmide, RNA, DNA oder rekombinante Proteine) hiPSCs eines jeden Menschen herzustellen. Durch diese Möglichkeit öffneten sich neue Türen für die regenerative Medizin hinsichtlich der Entwicklung von Zelltherapien, die personalisierte Arzneimittelentwicklung, die Untersuchung von Pathophysiologien und die toxikologische Forschung (Abb.6) [68].





**Abbildung 6: Herstellung und Anwendungsmöglichkeiten von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSCs).** Aus somatischen Zellen eines Spenders werden durch Zugabe von Reprogrammierungsfaktoren hiPSCs generiert. Diese können in beliebige Körperzellen differenziert werden, um sie einem Patienten zu transplantieren, passende Wirkstoffe zu identifizieren, die Toxizität von Substanzen zu bestimmen oder um Krankheitsmechanismen zu erforschen. Abbildung erstellt mit Biorender.com.

Es wäre beispielsweise denkbar, aus dem Blut eines Patienten mit pulmonaler Alveolarproteinose, einer Störung des Surfactantmetabolismus der Lunge, infolgedessen die Phagozytosefähigkeit der alveolaren Makrophagen überlastet ist, hiPSCs zu generieren. Diese könnten in funktionale Makrophagen differenziert werden, um sie dem Patienten schließlich in die Lunge zu transplantieren. Die defekten Makrophagen in den Alveolen des Patienten würden somit durch eigene, gesunde Zellen ohne die Gefahr einer Immunabstoßung, ersetzt werden können [67]. Dieses Vorgehen würde sich für viele verschiedene Krankheitsbilder, wie z.B. Diabetes oder auch neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Parkinson, eignen [77]. Die patientenspezifischen Zellen bieten außerdem die Möglichkeit einer Feststellung von genetisch prädestinierten Arzneimittelrisiken *in vitro*, bevor dieses dem Patienten verabreicht wird [78]. Außerdem könnte getestet werden, ob die gewünschte Wirkung eines Medikaments bei einem Patienten erzielt werden kann, zudem können Krankheiten *in vitro* modelliert und molekulare Mechanismen untersucht werden, um geeignete Behandlungsmöglichkeiten zu entwickeln [79, 80]. Bereits zugelassene Wirkstoffe könnten auch an verschiedenen Krankheitsmodellen im Hochdurchsatzverfahren getestet werden,

um neue Indikationen eines bestehenden Arzneimittels zu identifizieren [68]. Einige wissenschaftliche Publikationen konnten die Nützlichkeit von differenzierten hiPSCs aus Patienten zur Vorhersage von Arzneimittelwirkungen im Vergleich zu immortalisierten Zelllinien und Tiermodellen bereits aufzeigen [81–83]. Durch die Nutzung von hiPSCs statt Tiermodellen können auch Markt-Rücknahmen von Arzneimitteln aufgrund unerwünschter Nebenwirkungen und Toxizität vermieden werden [68, 84]. Alleine zwischen 1990 und 2010 wurden 133 solcher Fälle bekannt, Kardiotoxizität und Hepatotoxizität wurden hierbei als die meisten Ursachen benannt [85]. Aufgrund immer besser werdender Protokolle zur Differenzierung von Kardiomyozyten aus hiPSCs, wurden Anstrengungen unternommen, diese zukünftig als Modell zur Bestimmung der Kardiotoxizität von Arzneimitteln heranzuziehen [86]. hiPSC-differenzierte Hepatozyten bringen zudem die Möglichkeit mit, genetische Polymorphismen der Cytochrom P450 (CYP450)-Expression (insbesondere CYP2D6) verschiedener Individuen mit einzubeziehen, die für den Medikamentenstoffwechsel und die Hepatotoxizität eines Wirkstoffs eine grundlegende Rolle spielt. Verglichen mit primären Hepatozyten, konnten in hiPSC-Hepatozyten je nach Patient unterschiedliche Aktivitätslevel der CYP450 und Ansprechbarkeiten durch Wirkstoffe gezeigt werden [87]. Es ist also wahrscheinlich, dass verschiedene hiPSC-Modelle aufgrund ihres Potentials, zukünftig in verschiedenen Stufen der Arzneimittelentwicklung, auch in klinischen Studien, Anwendung finden werden. Derzeit sind sie vorrangig in frühen Entwicklungsphasen, wie der Grundlagenforschung und präklinischen Studien im Einsatz, in denen die Krankheitsmechanismen verstanden und Wirkstofftargets identifiziert werden. Nachfolgende Tabelle 1 zeigt hiPSC-abgeleitete Zelltypen, die zuletzt in frühen Phasen der Arzneimittelentwicklung angewendet wurden [88].

**Tabelle 1: Bisher verwendete hiPSC-abgeleitete Zelltypen in der Arzneimittelentwicklung.**

Modifiziert nach De Masi et al. 2020 [88].

Zelltypen	Krankheit
Kortikale Neuronen	Lesch-Nyhan Syndrom
Neuronen	Morbus Alzheimer
Motorneuronen	Amyotrophe Lateralsklerose
Kardiomyozyten	QT-Syndrom
Hepatozyten	Familiäre Hypercholesterinämie
Neurale Vorläuferzellen	Schizophrenie
Mesenchymal-ähnliche Zellen	Progressive massive Fibrose

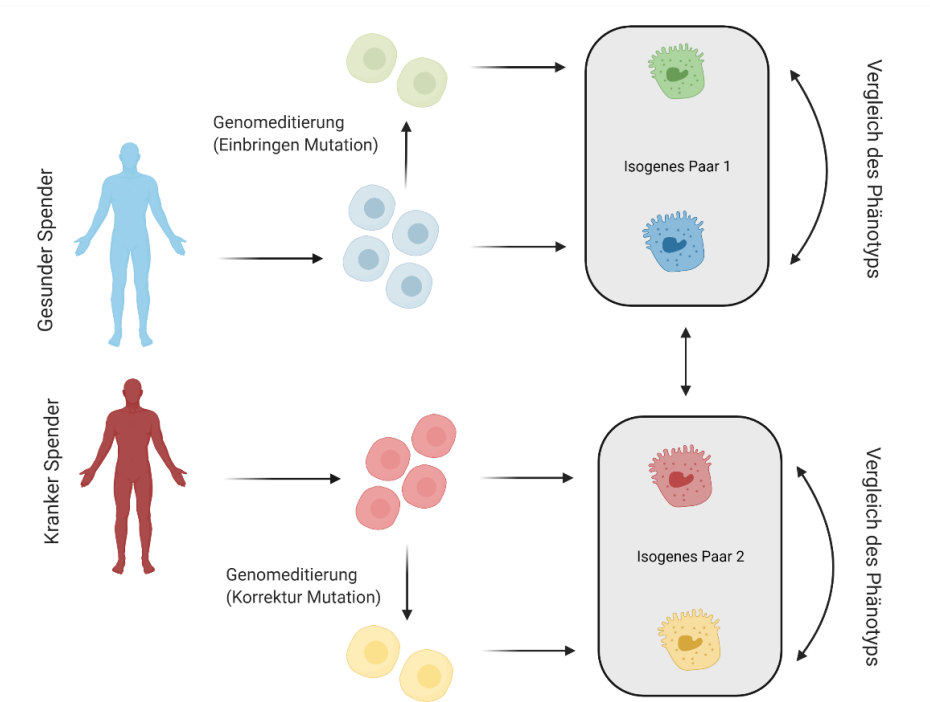
Da Differenzierungsstrategien und -protokolle für verschiedene Zelltypen und Krankheitsbilder in der Zukunft stetig optimiert und weiterentwickelt werden, wird es möglich sein, nicht aussagekräftige Tiermodelle im Sinne des 3R-Prinzips durch zuverlässigere hiPSC-Modelle zur Testung der Wirksamkeit und Toxizität zu ersetzen. Der Einsatz von Patientenmodellen mit genetischen

Variationen einer Krankheit wie beispielsweise CF oder Morbus Alzheimer wird zukünftig in der Arzneimittelentwicklung an Bedeutung gewinnen, während Tiermodelle sie verlieren werden [89]. Es wird mithilfe von Technologien wie der Next-Generation-Sequenzierung und bioinformatischen Ansätzen angestrebt, Informationen über die Wechselwirkungen des Genotyps und Phänotyps eines Patienten mit einem Medikament zu erhalten, um schließlich Patienten-Klassifizierungen für eine angemessene Behandlung aufstellen zu können und der personalisierten Medizin ein Stück näher zu kommen [90]. Die Charakteristika von hiPSCs, wie ihr diploider Chromosomensatz, die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und die Differenzierung in verschiedene Zelltypen, erlauben es zelluläre Funktionen im gesunden wie auch im kranken Zustand adäquat abbilden und untersuchen zu können. Das macht hiPSCs zur vielversprechenden Zellquelle für Modelle zur Erforschung von Pathophysiologien genetischer Krankheiten. Dieses Potential hat in den vergangenen Jahren dazu geführt, dass weltweite Initiativen zur Gewinnung von hiPS-Zelllinien aus gesunden und kranken Spendern monogenetischer und polygenetischer Krankheiten gegründet wurden. Die hiPS-Zelllinien werden eingehend charakterisiert und können beispielsweise über die *European Bank for induced pluripotent stem cells* (EBiSC) bezogen werden [91–93]. Die Kenntnis über das krankheitsassoziierte Gen, wie CFTR bei CF, ist essentiell für die In-vitro-Modellierung genetischer Krankheiten und erlaubt die Entwicklung effektiver Modelle, die sowohl den genetischen Hintergrund des Patienten erfassen, den krankheitsspezifischen Phänotyp aufweisen und für die Krankheit spezifische Endpunktbestimmungen erlauben [94]. Die Variabilität der Zellen aus verschiedenen Individuen (Inter-Donor-Variabilität) bezüglich ihres biologischen Verhaltens, wie beispielsweise die Fähigkeit, in einen bestimmten funktionellen Zelltyp zu differenzieren, ist ein häufig auftretendes Szenario [95]. Dieses Verhalten tritt unabhängig von Genotyp oder Krankheitsstatus auf und macht die Identifikation von krankheitsassoziierten Phänotypen unmöglich, wenn gesunde und kranke Zellen aus unterschiedlichen Patienten stammen, da die auftretenden biologischen Unterschiede der beiden Individuen die durch den Phänotyp verursachten Merkmale überdecken würden. Abhilfe kann hierbei die Genomeditierung schaffen, die es erlaubt, in einem genetisch kontrollierbaren Rahmen krankheitsassoziierte Mutationen im Vergleich zu isogenen, also genetisch identischen, Kontrollen zu untersuchen [94].

#### **1.4.2. Genomeditierung in hiPSC-Krankheitsmodellen**

Bei der Verwendung von transgenen Tiermodellen oder humanen Zelllinien als Krankheitsmodelle können die Phänotypen genetischer Variationen aufgrund auftretender Speziesunterschiede oder fehlender Syntänie nicht berücksichtigt werden [84, 91, 96]. Für diese Art der zurzeit meist genutzten Krankheitsmodelle existieren zudem keine geeigneten Kontrollen. Jene, die auf hiPSCs

basieren, bringen jedoch die Möglichkeit der Entwicklung isogener Kontrolllinien mit [97]. Diese sind genetisch identische Zelllinien, da sie vom gleichen gesunden oder erkrankten Spender stammen und somit exakt dasselbe Erbgut besitzen. Eine Hälfte der Zellpopulation kann genetisch so modifiziert werden, dass aus den gesunden Zellen, durch das Einbringen der krankheitsverursachenden Mutation durch Genomeditierungs-Technologien, kranke Zellen erzeugt werden bzw. aus kranken Zellen, durch Korrektur der auftretenden Mutation in deren Erbgut, gesunde Kontrollzellen generiert werden (Abb.7). Für Wirksamkeitstestungen eines Medikaments oder Untersuchungen zum Krankheitsmechanismus, steht somit eine gesunde Kontrolle der kranken Person zur Verfügung. Dies erlaubt es, in Untersuchungen und Wirksamkeitsstudien an den daraus differenzierten Körperzellen direkte Rückschlüsse auf die Mutation zu ziehen oder sie auszuschließen, da die Phänotypen der isogenen Paare direkt miteinander und die Paare untereinander verglichen werden können [91].



**Abbildung 7: Herstellung isogener hiPS-Zelllinien mittels Genomeditierung.** hiPSCs können aus gesunden (blau) und kranken (rot) Spendern generiert werden. Nach der Differenzierung in einen geeigneten Zelltyp, können zelluläre und molekulare Eigenschaften verglichen werden. Um die Variabilität aufgrund des genetischen Hintergrunds auszuschließen, kann die Genomeditierung angewendet werden, um in gesunden Zellen Mutationen einzufügen (grün) oder in kranken Zellen die Mutation zu korrigieren (gelb). Dieses Vorgehen führt zu isogenen Paaren (graue Boxen), die den Einfluss der Mutation auf den Phänotyp identifizieren. Abbildung modifiziert nach Bassett, 2017 [91]. Abbildung erstellt mit Biorender.com.

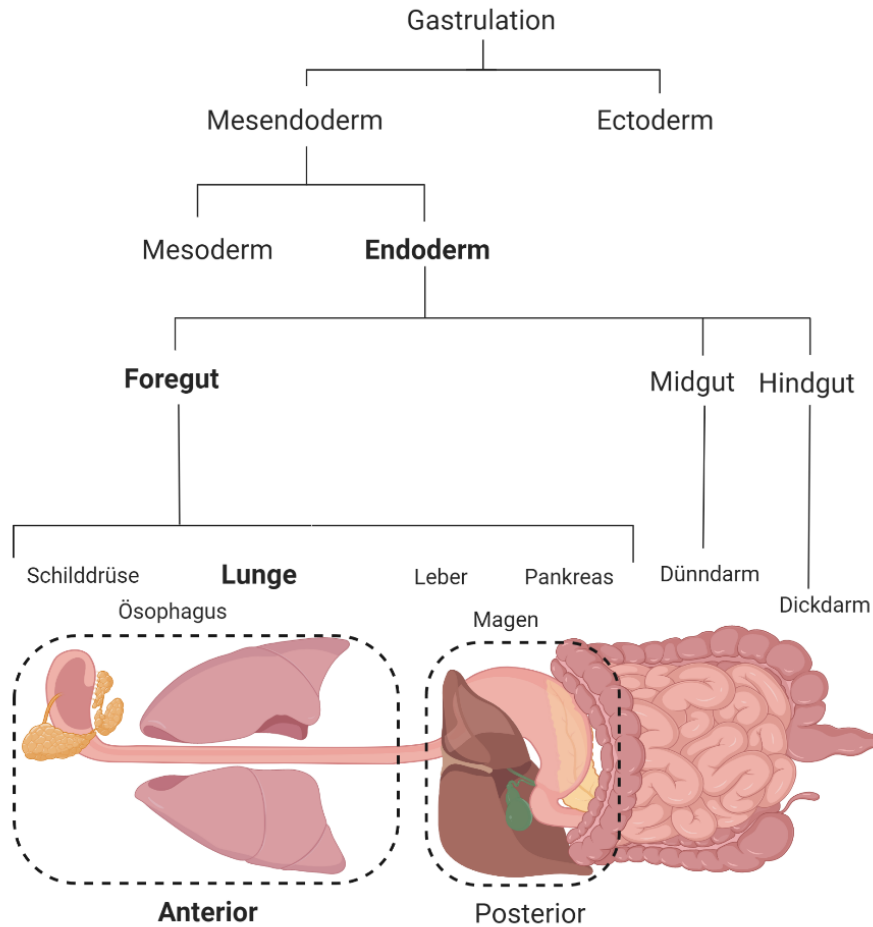
Der beschriebene Prozess der Genomeditierung kann mittels verschiedener Technologien in humanen Zellen vorgenommen werden, wie beispielsweise mithilfe von Zinkfinger-Nukleasen (ZFNs) [98], *Transcription Activator-like Effector*-Nukleasen (TALENs) [99, 100] oder der CRISPR/Cas9-Methode [101]. Letztere basiert auf dem in vielen Prokaryoten vorkommenden, adaptiven antiviralen Abwehrmechanismus, CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), welche wiederholend vorkommende Abschnitte im Genom von Bakterien darstellen und ein Teil des CRISPR/Cas-Systems sind. Es dient der Beschaffung von Resistenzen gegenüber eindringenden Viren wie Phagen und der Unschädlichmachung derer [102, 103]. Involviert in diesem Prozess sind auch Cas (*CRISPR-associated protein*)-Nukleasen, also Enzyme, die DNA-Doppelstränge an einer bestimmten Sequenz, die sie mithilfe gebundener, komplementärer RNA (*guide RNA*) finden, schneiden. Mithilfe dieses Immunsystem-Äquivalents ist es Bakterien möglich, fremdes Erbgut in das Eigene einzubauen und sich so vor wiederholten Virusinfektionen bei Wiedererkennung des eingebauten viralen DNA-Abschnitts zu schützen [103, 104]. Das CRISPR/Cas-System kann als Genschere auch in Eukaryoten eingesetzt werden und ermöglichen, dass Gene ausgeschaltet, entfernt, eingefügt oder in einzelnen Nukleotiden verändert werden können [105, 106]. Diese Entdeckung wurde 2020 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet [105]. Im Gegensatz zu ZFNs und TALENs, welche zeitintensive und kostspielige Methoden darstellen, erfordert das hochspezifische CRISPR/Cas-9-System lediglich das Design einer zur Zielregion komplementären *single-guide RNA* (sgRNA) und deren Einschleusung in die Zielzelle [107]. Der Cas9-sgRNA-Komplex verursacht an der gewünschten Stelle einer Gensequenz einen Doppelstrangbruch, der von der Zelle anschließend repariert wird. Dieser Prozess kann dazu genutzt werden, das Genom gezielt an der geschnittenen Stelle zu verändern [91]. Es ist auch möglich, mehrere Genomeditierungen vorzunehmen, da mehrere sgRNAs gleichzeitig eingesetzt werden können [101, 108]. Die CRISPR/Cas-Technologie ist in der Forschung aufgrund ihrer vielen Vorzüge die Methode der Wahl, um die beiden in Abbildung 7 dargestellten Strategien zu verfolgen. Wird eine Mutation wie z.B. F508del, die am häufigsten vorkommende CF-Mutation, in die Zellen eines gesunden Menschen eingebracht, kann untersucht werden, ob diese Mutation zur Ausprägung des Phänotyps der Krankheit im differenzierten Zelltyp beiträgt. Wird eine Mutation in den Zellen eines kranken Menschen korrigiert, kann untersucht werden, ob die Abwesenheit dieser Mutation die Ausprägung des kranken Phänotyps in dem differenzierten Zelltyp verändert oder hindert. Dies gelingt durch den direkten Vergleich zur jeweils isogenen Kontrolle.

## 1.5. Differenzierung von alveolaren Epithelzellen aus hiPSCs

### 1.5.1. Die Embryonalentwicklung der Lunge als Vorbild

Im Respirationstrakt existieren eine Reihe von verschiedenen Epithelzelltypen, die spezifische, lebenswichtige Funktionen erfüllen. Das respiratorische Epithel besteht aus Zilien-tragenden Zellen („*ciliated cells*“), Becherzellen („*goblet cells*“), Keulenzellen („*club cells*“) und Basalzellen, welche eine Art Vorstufe von reifen Epithelzellen darstellen [7, 109]. Wie bereits in Kapitel 1.2. beschrieben, besteht das alveolare Epithel zu 99 % aus flachen, sowie kubischen Zellen, den Alveolaren Epithelzellen Typ 1 (AT1) bzw. Typ 2 (AT2).

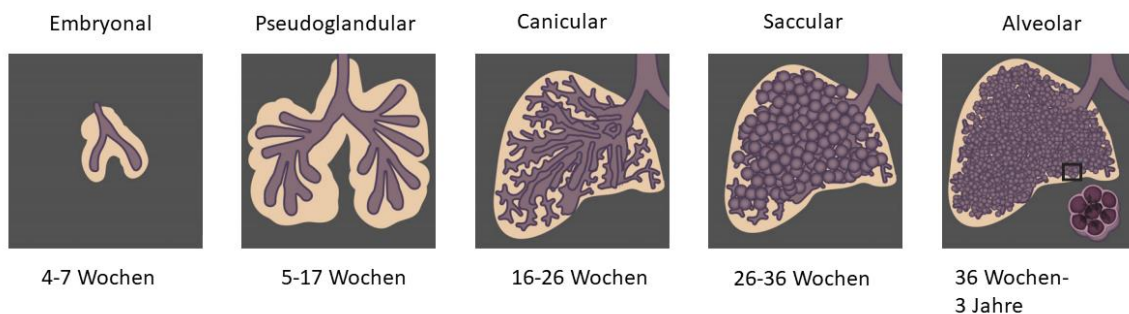
Die Differenzierung in Lungenzelltypen *in vitro* nimmt sich die embryonale Entwicklung *in vivo* zum Vorbild. An Tag 15 der humanen Embryogenese bildet sich während der Gastrulation der Primitivstreifen, aus dem die drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm hervorgehen und als Organanlagen dienen. Während die Epithelzellen der Lunge aus dem Endoderm entstehen, entwickeln sich Fibroblasten, glatte Muskulatur und Knorpel, die der Lunge als strukturellen Halt dienen, aus dem Mesoderm. Die Entwicklung der Lunge beginnt aus morphogenetischer Sicht mit der Bildung von zwei Knospen aus dem embryonalen Darmrohr (Endoderm), aus welchem auch der gesamte Gastrointestinal-Trakt, sowie die assoziierten Organe Leber, Pankreas und Schilddrüse hervorgehen (Abb.8) [110–113].



**Abbildung 8: Übersicht der Endoderm-Entwicklung.** Aus dem Endoderm entwickeln sich Foregut, Midgut und Hindgut Endoderm. Die Lunge geht aus dem vorderen Teil des Foregut Endoderms, dem Anterior Foregut Endoderm hervor. Diese Stufe muss daher zur Differenzierung von Lungenzelltypen *in vitro* durchlaufen werden. Abbildung modifiziert nach Zorn und Wells, 2009 [113]. Abbildung erstellt mit Biorender.com.

Vier bis sieben Wochen nach der Empfängnis bildet sich aus dem vorderen Teil des vorderen Darmrohrs (Anterior Foregut Endoderm), die embryonale Lunge, die aus rechtem und linkem Lungenflügel besteht und bereits ab der 5. Woche erste Verzweigungen ausbildet (Abb.9). Somit geht die embryonale Phase in die pseudoglandulare Phase über und dauert bis Woche 17 an (Abb.9). Während dieser Phase werden weitere Verzweigungen ausgebildet und ab der 10. Woche setzen zudem fetale Atmungsbewegungen ein, die bei dem Wachstum der Lunge eine Rolle spielen sollen. Am Ende dieser Phase ist die Struktur des gesamten respiratorischen Baums statuiert und die epitheliale Differenzierung schreitet voran. Die canaliculare Phase erstreckt sich von Woche 16-26 (Abb.9). Es wird angenommen, dass während dieser Phase drei weitere Verzweigungszyklen durchlaufen werden, um die zukünftigen Alveolarregionen aufzubauen. Die bereits existierenden Atemwege nehmen an Größe zu und erweitern sich am distalen Ende. Erste

morphologische Anzeichen sprechen in dieser Phase für eine Differenzierung in distale Epithelzellen. In der darauffolgenden, saccularen Entwicklungsphase von Woche 26-36 erscheinen die distalen Enden der jetzt vollständig existierenden Atemwege als hohle Kapseln, die sich anhäufen (Abb.9). Die alveolare Epitheldifferenzierung schreitet weiter voran und erste Lamellarkörperchen können im Zuge der Ausreifung des Surfactantsystems in AT2 detektiert werden. In der finalen alveolaren Phase bilden sich schließlich die Alveolen vollständig aus und vergrößern sich, um die benötigte Oberfläche für den Gasaustausch zu gewährleisten. Die Phase wird ab Woche 36 beobachtet und kann bis zu 3 Jahre nach der Geburt andauern (Abb.9). Aufgrund Untersuchungen mit modernen bildgebenden Verfahren wird sogar davon ausgegangen, dass die Reifung der Alveolen bis zum jungen Erwachsenenalter stattfindet [114].



**Abbildung 9: Phasen der humanen Lungenentwicklung.** Innerhalb von 4-7 Wochen nach der Empfängnis bildet sich die embryonale Organanlage für die Lunge. Die pseudoglandulare Phase beginnt ca. ab Woche 5 mit der Verzweigungsmorphogenese und dauert bis zur 17. Woche an. Die caniculare Entwicklungsphase erstreckt sich von Woche 16-26. Das Ende der Verzweigungsmorphogenese findet während der saccularen Phase zwischen den Wochen 26-36 statt. Die Formation der Alveolen setzt ab Woche 36 ein und kann bis zu mehreren Jahren nach der Geburt andauern. Abbildung modifiziert von Nikolic et al., 2018 [114].

### 1.5.2 In-vitro-Differenzierung in distale Lungenzelltypen

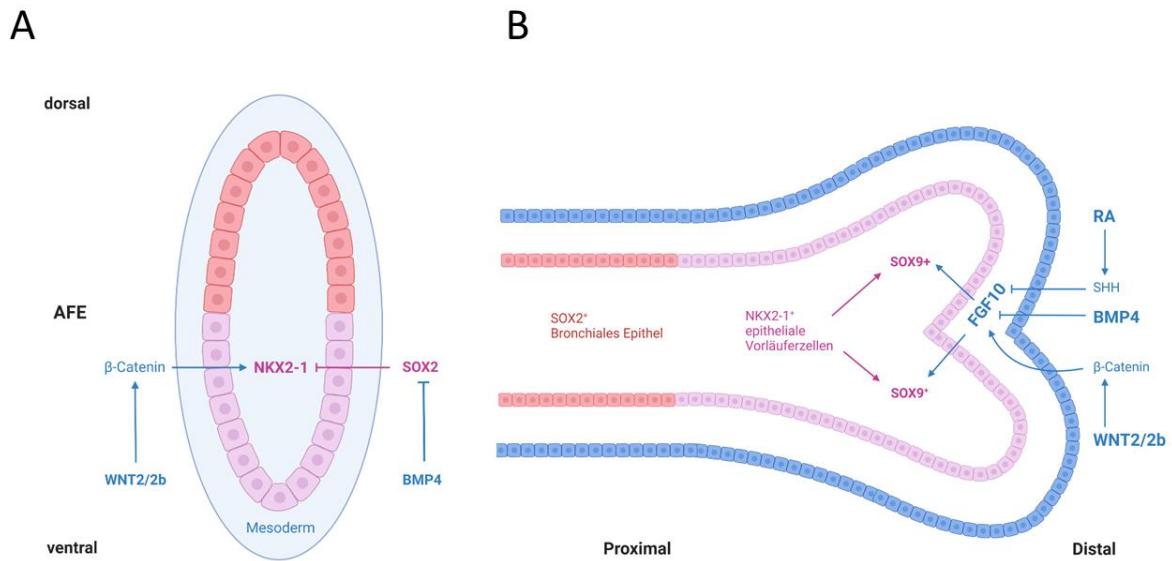
Verglichen zu anderen Zelltypen, wie beispielsweise Kardiomyozyten und Hepatozyten, die bisher erfolgreich aus hiPSCs differenziert und immer weiter optimiert wurden, ist die Forschung bezüglich der Differenzierung von Lungenzelltypen aus hiPSCs vergleichsweise noch nicht weit fortgeschritten [115]. Anstrengungen wurden von unterschiedlichen Forschungsgruppen unternommen, verschiedene Atemwegsepithelzellen oder AT2 und AT1 aus hiPSCs zu differenzieren [116–120]. Hierbei konnte die Expression von Markern, die beispielsweise mit einem AT2- oder AT1-Phänotyp eng verknüpft sind, gezeigt werden, jedoch wiesen die differenzierten Zellen eine entweder fehlende strukturelle Ähnlichkeit zu primärem, adultem Alveolarepithel auf oder glichen eher fetalem Lungenepithel [115]. Der Reifegrad, der bei Kardiomyozyten oder Hepatozyten bereits erzielt werden kann, wird bei differenzierten Lungenzelltypen noch nicht erreicht, weshalb weitere Protokolloptimierungen und -strategien zur Differenzierung dieser Zelltypen notwendig



sind, um sie als zuverlässige Zellquelle in Krankheitsmodellen und in der Arzneimittelentwicklung einsetzen zu können [115].

Die *In-vitro*-Differenzierung in AT2 und AT1 ist ein gerichteter Vorgang, das heißt die Signale, die die Zellen in embryonaler Umgebung zur organ-spezifischen Entwicklung auf molekularer Ebene *in vivo* erhalten, sollen *in vitro* simuliert werden. Für alle Lungenzelltypen bedeutet dies, dass eine Reihe von Entwicklungsstufen zu durchlaufen sind, um den angestrebten Zelltyp ableiten zu können. Zunächst muss das definitive Endoderm (DE) induziert werden, welches sich darauf-folgend in das vordere Vorderdarm-Endoderm (*Anterior Foregut Endoderm*, AFE) entwickeln muss, damit sich hieraus Lungenvorläuferzellen bilden können, welche sich schließlich in proximale oder distale Zelltypen der Lunge spezialisieren (Abb. 8) [110]. Um die Entwicklung des ausgehenden Keimblatts, des DE, *in vitro* zu induzieren, muss der Nodal-Signalweg aktiviert werden. Dies geschieht meist durch ein Cytokin der TGF- $\beta$ -Superfamilie (*Transforming growth factor beta*), zu welchen wichtige Signalmoleküle zählen, die die Entwicklung des DE *in vivo* steuern. Meist wird *in vitro* das rekombinant hergestellte Protein Activin A eingesetzt, das den Nodal-Signalweg, der während der Gastrulation stattfindet, aktiviert [121]. Auch die Verwendung von Small Molecules sind für die Induktion des DE *in vitro* möglich [122]. Das DE ist durch die simultane Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren, wie *sex-determining region Y (SRY)-box 17 (SOX17)*, *Forkhead Box-Protein 2 (FOXA2)* und *C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4)*, charakterisiert. Anschließend erfolgt eine Spezialisierung des gebildeten DE. Neben dem Vorderdarm-Endoderm (*Foregut Endoderm*) aus dem Lunge, Leber, Schilddrüse, Pankreas und Magen entstehen, werden im weiteren Entwicklungsprozess auch zwei weitere Domänen, das Mitteldarm- und Hinterdarm-Endoderm (*Midgut- und Hindgut Endoderm*), aus dem Dünn- bzw. Dickdarm hervorgehen, ausgebildet (Abb.8) [113]. Das *Foregut Endoderm* entwickelt sich durch Signale des vom Darmrohr umgebenden Mesenchyms heraus in einen vorderen (*anterior*) und hinteren (*posterior*) Teil (Abb.8). Dieser Prozess wird auf molekularer Ebene durch eine Reihe von Signalwegen, wie dem BMP-, WNT-, FGF-, Retinoic acid (RA) und Sonic hedgehog (SHH)-Signalweg reguliert [110, 123]. Da die Organanlage der Lunge im vorderen Teil des *Foregut Endoderms* (AFE) liegt, muss die Ausbildung des AFE *in vitro* stimuliert werden, während die Entwicklung des *Posterior Endoderms* unterdrückt werden muss. Auf molekularer Ebene bedeutet dies die gleichzeitige Inhibierung des Nodal- und BMP-Signalwegs, wofür sich die Kombination aus dem rekombinant hergestellten Protein Noggin oder Dorsomorphin, selektive Inhibitoren des BMP-Signalwegs und SB431542, ein pharmakologischer Inhibitor des Nodal-Signalwegs, eignet [124, 125]. Diese Faktoren induzieren die Expression des Foregut Markers *SRY-box 2 (SOX2)*, während die FOXA2-Expression aufrecht erhalten bleibt [126]. Diese zwei Marker dienen somit

als charakteristische Merkmale des AFE, welches als Ausgangspunkt für den weiteren Differenzierungsprozess von AT2 und AT1-Zellen *in vitro* unerlässlich ist [127]. Für die Entstehung der Milliarden von Epithelzellen, die die gesamten Atemwege *in vivo* auskleiden, ist die Ausbildung von respiratorischen Vorläuferzellen notwendig, die aus der Spezialisierung des nun vorliegenden AFE resultieren. Die Expression des Transkriptionsfaktors Homöobox-Gen *NK2 homeobox 1* (NKX2.1), auch bezeichnet als Thyroidaler Transkriptionsfaktor 1 (TTF-1), dient hierbei als ein wichtiges Merkmal der stattfindenden, respiratorischen Spezialisierung des ventralen Endes des AFE [110, 126, 128]. Eingehende Untersuchungen zeigten die Involvierung einer Reihe von Signalwegen auf, die für die Entwicklung der Lunge wesentlich sind und somit auch *in vitro* simuliert werden müssen (Abb.10). Der BMP-Signalweg, welcher die SOX2-Expression des AFE unterbindet, muss für die Vorbereitung der Lungenspezifizierung aktiviert werden, da eine fortschreitende SOX2-Expression die NKX2.1 Expression hindern würde [129, 130]. Die Stimulation des WNT2/2b-Signalwegs, die vom umliegenden Mesoderm ausgeht, ist ebenfalls entscheidend für die einsetzende Expression von NKX2.1 (Abb.10A). FGF10, ein Molekül der FGF-Familie, welches nach der ventralen Spezifikation des AFE und während der fortschreitenden Lungenentwicklung distal exprimiert wird, nimmt aufgrund seiner Lokalisation einen direkten Einfluss auf die morphogenetische Ausbildung der beiden Lungenäste und die Entstehung und Proliferation distal angesiedelter Lungenzelltypen wie AT2 und AT1 [128, 131, 132]. Die Aktivität des WNT2/2b-, BMP4- und RA-Signalwegs sind für die Weiterentwicklung der epithelialen Vorläuferzellen (NKX2.1-positive Zellen) in *SRY-box 9* (SOX9)-exprimierende Zellen essentiell, da sie die Aktivität von FGF10 steuern [133]. Die WNT2/2b-Signalgebung erfolgt vom umgebenden Mesoderm ausgehend über den zwischengeschalteten  $\beta$ -Catenin-Signalweg und in genauer zeitlicher Abstimmung mit dem BMP4-Signalweg, da diese beiden Signalwege entgegengesetzt auf FGF10 einwirken. Auch RA nimmt über eine Zwischenstufe, den SHH-Signalweg, an der Steuerung der Expression von FGF10 teil (Abb.10B) [134–136]. Neben BMP, WNT und RA sind auch weitere Vertreter der FGF-Familie (FGF2 und KGF) ausschlaggebend für die Lungen-Morphogenese und der Proliferation des Epithels [126].



**Abbildung 10: Ventrale Spezifikation des Anterior Foregut Endoderm und die frühe distale Lungenentwicklung. A:** Das Lungenendoderm ist durch die Expression von NKX2.1 am ventralen Ende des AFE gekennzeichnet (pink). WNT2/2b und BMP4 sind vom Mesoderm ausgehend für die dorsale/ventrale Spezifizierung des AFE zuständig (rot). WNT2/2b nimmt über  $\beta$ -Catenin direkten Einfluss auf die NKX2.1-Expression, während BMP4 die inhibitorische Einflussnahme von SOX2 auf NKX2.1 unterdrückt. **B:** Während der anschließenden Weiterentwicklung der Lunge ist FGF10 essentiell für die Ausbildung der Lungenäste und die Proliferation und Entwicklung von Epithelzellen in den distalen Enden der Lunge (pink). Die Expression von FGF10 wird streng kontrolliert von RA, BMP4 und WNT2/2b (blau) und nimmt auf die einsetzende Expression von SOX9 (pink) in epithelialen Vorläuferzellen Einfluss. Abbildung modifiziert nach Herriges und Morrissey, 2014 [134]. Abbildung erstellt mit Biorender.com.

Da all diese Signalwege *in vivo* in zeitlicher und räumlicher Abfolge streng kontrolliert ablaufen, stellt die Simulation dieses beschriebenen Prozesses *in vitro* eine erhebliche Herausforderung dar [110]. Die bekannten involvierten Signalwege sollen mit unterschiedlichen Kombinationen aus rekombinanten Wachstumsfaktoren und chemischen Molekülen aktiviert werden, dabei ist allerdings auch die eingesetzte Konzentration und der zeitliche Rahmen essentiell [131]. Bisher wurden eine Reihe von unterschiedlichen Kombinationen aus Wachstumsfaktoren getestet und definiert, die von AFE-Zellen ausgehend die Entwicklung AT2-ähnlicher Zellpopulationen induzieren sollen und AT2-typische Marker wie die Surfactant Proteine-C (SP-C) und -B (SP-B) exprimieren. So wurde erstmals 2011 von Green et al. gezeigt, dass die Kombination aus WNT3a, FGF10, EGF, KGF und BMP4 wirksam ist, NKX2.1-exprimierende Zellen auszubilden und die nachfolgende Zugabe von RA die Expression des klassischen AT2-Markers SP-C induziert [127]. Darauf aufbauend wurde das Protokoll von Longmire et al. 2012 so adaptiert, dass zur Induktion von NKX2.1 zusätzlich der Wachstumsfaktor FGF2 eingesetzt wurde. Eine weitere Ausreifung wurde anschließend mittels FGF10, FGF2, Dexamethason, Isobutylmethylxanthin (IBMX) und zyklischem 8-Bromadenosin-Monophosphat (cAMP) erbracht und führte zu einer Population von

Epithelzellen, die teils AT2-assoziierte Marker, teils AT1-typische Marker exprimierten [125]. Ghaedi et al. zeigte 2013 und 2014, dass auch die simultane Gabe von WNT3a, FGF10, KGF, EGF und RA in serumhaltigem Medium eine annähernd homogene Population von AT2-ähnlichen Zellen aus hiPSCs hervorbringen kann. Eine anschließende Kultivierung mit IWR1, einem WNT-Inhibitor, führte zur Änderung eines AT2-Phänotyps zu einem AT1-Phänotyp, was die Expression AT1-assoziiierter Marker wie Aquaporin-5 (AQP5), Caveolin-1 (CAV1) und Podoplanin (PDPN) bewies [116, 137]. Die beschriebenen Protokolle wurden zunächst in Teilen für die zweidimensionale (2D) Differenzierung, also Zellen im Monolayer, entwickelt. In den letzten Jahren wurden vermehrt Bemühungen unternommen, Protokolle für die dreidimensionale (3D) Differenzierung zu etablieren oder sogar sogenannte Organoiden heranwachsen zu lassen [61].

### 1.5.3. In-vitro-Lungen-Differenzierung: 2D vs. 3D

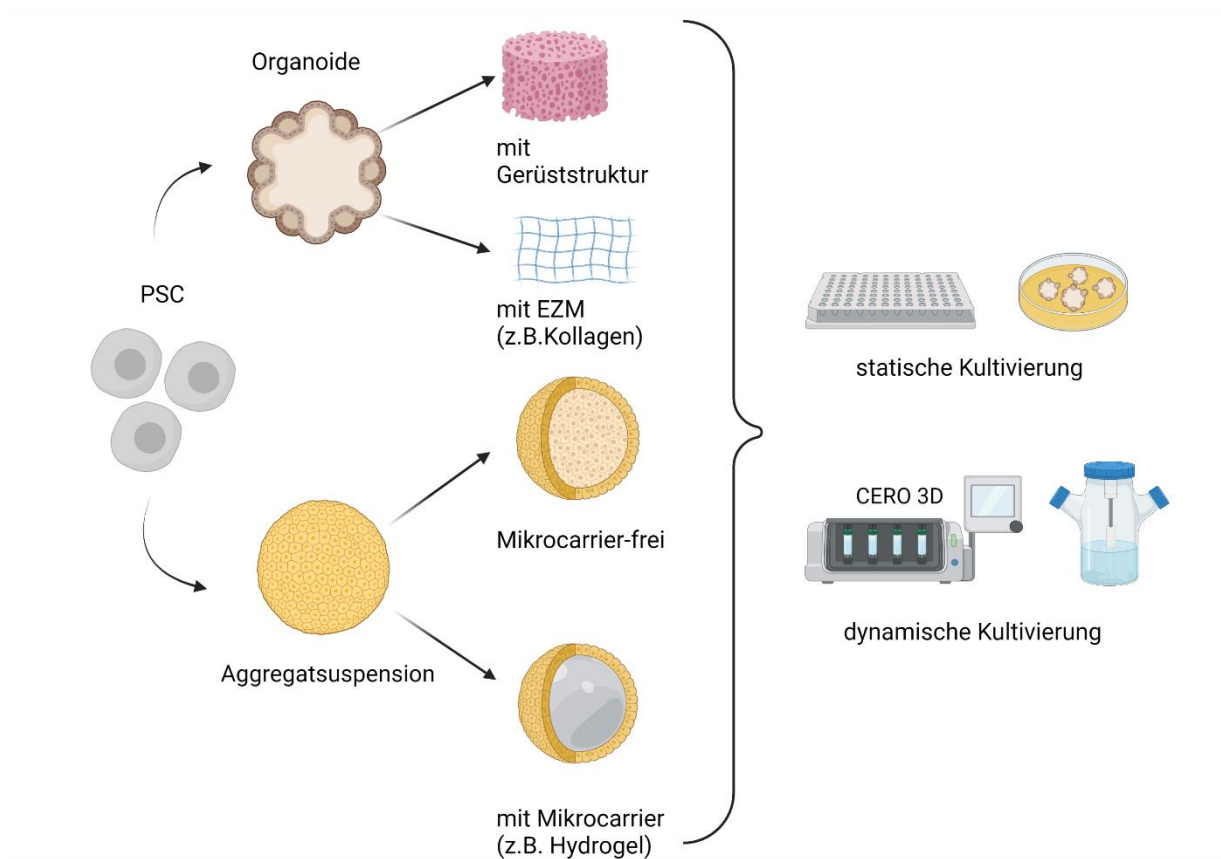
Für die Erforschung der embryonalen Lungenentwicklung *in vitro* und zur Untersuchung der Einflussnahme von Wachstumsfaktoren in unterschiedlichen Kombinationen und Konzentrationen auf die Signalwege, greifen Forscher zur Etablierung von Differenzierungsprotokollen gerne aufgrund ihrer Simplizität auf 2D-Kulturen zurück [138, 139]. Diese haben neben ihrer einfachen Handhabung auch weitere Vorteile, wie die bessere Skalierbarkeit, geringere Kosten und eine gleichmäßigere Nährstoffversorgung, jedoch für die Entwicklungsbiologie auch schwerwiegende Nachteile: Zell-Zell-Interaktionen und Zell-Matrix-Kontakte, die für die Aufrechterhaltung bzw. Ausbildung eines Phänotyps unerlässlich sind, fehlen. Infolgedessen können zelluläre Funktionen und Signalwege, die im Gewebe vorliegen, nicht abgebildet werden [140, 141]. Eine 3D-Kultivierung der Zellen, z.B. als Sphäroide oder Embryoid Bodies (EBs) kann die physiologische Umgebung eines Gewebes besser simulieren, da Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte durch ihre räumliche Anordnung gewährleistet werden und Nährstoffgradienten vorliegen [142–144]. Wird die Entwicklung eines aussagekräftigen Testsystems oder Krankheitsmodells angestrebt, ist es wichtig, die Physiologie und Komplexität des Organs bestmöglich zu repräsentieren. Hierzu zählt auch die Anwesenheit funktioneller Zelltypen, die in einem Organ oder Gewebe, das nie aus nur einem, sondern aus mehreren verschiedenen Zelltypen besteht, vorliegen. Die Alveole beispielsweise stellt ein komplexes dreidimensionales System dar: Sie ist ein mit Luft gefülltes Gewebesäckchen, das aus verschiedenen Zelltypen besteht und von Blutgefäßen umgeben wird [109]. Im Allgemeinen besitzen Stammzellen die Fähigkeit zur Selbstorganisation und Ausbildung komplexer Strukturen in einer Matrix [140]. Wird dieses Prinzip *in vitro* angewendet, wird von der Entwicklung von Organoiden gesprochen. Dies sind 3D-Strukturen, die aus Stammzellen (ESCs, hiPSCs oder organ-begrenzte adulte Stammzellen) herangewachsen sind und aus organ-spezifischen Zelltypen bestehen, die sich selbst organisieren und räumlich anordnen [145–147].

Organoid-Systeme ermöglichen somit, dass Prozesse, die während der Organogenese oder im adulten Organ und dessen Homöostase *in vivo* stattfinden, *in vitro* untersucht werden können [148]. Aufgrund solcher Vorteile, die Organoid-Systeme bieten, ist es nicht überraschend, dass in den letzten Jahren die Entwicklung von Differenzierungsprotokollen für die Mini-Organen rasant fortgeschritten ist [148, 149]. Jedoch haben die komplexen Systeme auch ihre Limitationen, wie z.B. die Reproduzierbarkeit. Da nicht kontrollierbar ist, wie sich die Zellen in einem Organoid anordnen, kann nicht gewährleistet werden, dass Organoide immer gleiche Dimensionen (Größe, Form), zelluläre Komposition, Phänotyp und molekulare Charakteristika aufweisen [61, 149]. Die ersten Atemwegsorganoiden aus hiPSCs wurden im Jahre 2012 von einer kanadischen Forschergruppe publiziert [150]. Die hiPSCs trugen die CFTR-Mutation F508del und stellten somit das erste Organoid-Modell dar, das zur Modellierung von CF diente. Zur Bestimmung der CFTR-Aktivität wurden von McCauley et al. einige Jahre später, Atemwegsorganoiden aus gesunden Spendern und F508del Mutationsträgern generiert, die in Reaktion auf die Aktivierung der Adenylylcyclase durch Forskolin anschwellen bzw. unverändert bleiben [151]. 2014 veröffentlichte eine amerikanische Forschergruppe die Generierung von Organoiden, die sowohl alle Typen Atemwegs-Epithelzellen als auch AT2 und AT1 enthielten [117]. Dye et al. publizierten 2015 Lungenorganoiden, die in ihrer Zusammensetzung weitestgehend einer fetalen Lunge entsprachen und sich daher für entwicklungsbiologische Untersuchungen eignen [139]. Erweitert man die Differenzierungsdauer auf 50-85 Tage, können reifere Lungenorganoiden für den Einsatz in der regenerativen Medizin anhand des beschriebenen Protokolls generiert werden [152]. Die komplexen Herstellungsprotokolle und lange Differenzierungsdauer ermöglichte es bislang nicht, solche Organoide in der präklinischen Forschung einzusetzen, da zudem auch geeignete Strategien zur Kryokonservierung von Lungenorganoiden fehlen.

Eine 3D-Differenzierung heißt nicht zwingend, dass die Ausreifung von komplexen, reifen Organoiden aus mehreren verschiedenen Zelltypen angestrebt werden muss. 3D-Kultivierungstechniken sind auch als nützliches Werkzeug anzusehen, die benötigte Zellpopulation unter physiologischen Bedingungen zu differenzieren, über einen längeren Zeitraum zu erhalten oder zu expandieren. Die Generierung von hiPSC-abgeleiteten Zelltypen für die Anwendung in der Medikamentenentwicklung setzt kontrollierbare und stabile Kulturbedingungen voraus, sodass die Zellen eine stets vergleichbare Qualität aufweisen. Des Weiteren sollte idealerweise die Möglichkeit gegeben sein, Zellen in hoher Anzahl generieren zu können, da nur so gewährleistet werden kann, dass eine ausreichende Zellzahl für die Anwendung in der regenerativen Medizin und der Arzneimittelentwicklung vorhanden ist [118, 131]. Die Limitationen von Organoiden für den Einsatz in der präklinischen Forschung könnten so umgangen werden. Die erste 3D-basierte Differenzierung und Expansion eines definierten Zelltyps, AT2, wurde 2017 von Jacob et al. publiziert und 2019 mit einem Protokoll ergänzt [119, 120]. Jedoch werden in der beschriebenen

Methode die ersten Differenzierungsstufen, DE und AFE sowie die AFE-Spezialisierung in NKX2.1-exprimierende Vorläuferzellen zunächst zweidimensional durchgeführt, was eine geringe Zellzahl bedeutet, bevor isolierte NKX2.1-positive Zellen in eine Hydrogel-basierte 3D-Kultur überführt werden. Die Ausreifung in AT2 wird somit in dreidimensionaler Umgebung durchgeführt und endet in Alveolosphären, die einen für AT2 typischen Surfactantmetabolismus aufweisen und laut Autoren für die Modellierung von Krankheiten der Alveole eingesetzt werden können. Die Alveolosphären können passagiert und für bis zu einem Jahr in Kultur gehalten werden, allerdings ist die Methode nur für geringe Durchsatzraten geeignet. Die Autoren weisen zudem darauf hin, dass in den Alveolosphären keine AT1 präsent sind [120]. Yamamoto et. al. publizierten ebenfalls eine Langzeit-Methode, in der Organoide zur Expansion von AT2 genutzt werden. Die alveolaren Organoide beinhalten zur Unterstützung bei der Langzeitkultivierung humane fetale Lungenfibroblasten [118]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die AT2 in AT1 transdifferenzieren können. In einer darauffolgenden Studie untersuchten die Autoren die Differenzierung von AT1 in alveolaren Organoiden mit und ohne Lungenfibroblasten. Die Inhibierung des kanonischen WNT-Signalwegs mit dem Rho-Kinase Inhibitor Y27632 (ROCK) konnte als effektive Methode identifiziert werden, AT2 in AT1, die die gleichen Transkriptome wie primäre AT1 besitzen, *in vitro* zu differenzieren [153].

Diese bisher beschriebenen 3D-Ansätze zur Differenzierung, Expansion und Langzeitkultivierung von alveolaren Epithelzellen finden unter statischen Bedingungen statt, bei welchen keine Scherkräfte auf die Zellen ausgeübt werden, die embryonale Stammzellen *in vivo* erfahren. Zudem ist bekannt, dass physiologischer Scherstress die Differenzierung und Reifung von Zellen positiv beeinflussen kann [154]. Die bislang beschriebenen Ansätze sind nur für geringe Durchsatzraten geeignet, sie sind also entweder zu komplex hinsichtlich einzelner Arbeitsschritte oder es können nur wenige Zellen generiert werden. Für den Einsatz als präklinisches Testsystem muss jedoch jederzeit eine hohe Anzahl an Zellen zur Verfügung stehen. Bioreaktoren sind Systeme, die bei dieser Problemstellung Abhilfe schaffen können. Sie eignen sich beispielsweise zur Kultivierung und Differenzierung unter dynamischen Bedingungen, sie sorgen für eine homogene Nährstoffversorgung und gewährleisten die Expansion bzw. Generierung einer hohen Anzahl differenzierter Zellen für die (prä-)klinische Forschung (Abb. 11) [155]. Außerdem kann die Ausbildung von Nährstoffgradienten reduziert werden, die zwar für gewebsspezifische Mileus in 3D-Modellen sorgen können, jedoch auch an der geringen Reproduzierbarkeit von 3D-Ansätzen beteiligt sind, die bei Zellquellen für Screening-Ansätze vermieden werden müssen.



**Abbildung 11: Mögliche 3D-Modelle aus pluripotenten Stammzellen (PSC).** Aus PSCs wie ESCs oder iPSCs können Organoide oder Aggregatsuspensionen generiert werden, die entweder Gerüststrukturen, EZM-Proteine bzw. Mikrocarrier aus Hydrogel enthalten oder Mikrocarrier-frei kultiviert werden. Als Kultivierungstechniken können statische sowie dynamische Methoden (z.B. Bioreaktor) eingesetzt werden. Abbildung erstellt mit Biorender.com.

Der in dieser Arbeit eingesetzte Bioreaktor (CERO 3D) ist ein Inkubatorsystem, in dem Zellkulturparameter wie Temperatur, CO<sub>2</sub>-Gehalt und Rotationsgeschwindigkeit eingestellt werden können. Durch die Einstellung der Rotation der vier Zellkulturrohre, von dem jedes ein Volumen von 50 ml umfasst, kann fluidischer Stress kontrolliert und reproduziert werden [156, 157]. Das System erlaubt somit die Generierung und Kultivierung alveolarer Epithelzellen in Mikrocarrier-freien Aggregatsuspensionen und ermöglicht pro Differenzierungsvorgang enorm hohe Zellausbeuten (Abb.11). Bioreaktor-basierte Systeme können also zur Herstellung klinisch relevanter Zelltypen genutzt werden, allerdings müssen zunächst Protokolle, deren Effektivität unter 2D-Bedingungen demonstriert wurden, auf die Aggregatsuspensionskultur (3D) übertragen werden [158]. Im Bereich der alveolaren Epithelzellendifferenzierung aus hiPSCs wurden bisher keine robusten und reproduzierbaren Protokolle für Bioreaktoren entwickelt. Zudem existieren keine ganzheitlich planaren Differenzierungsprotokolle für alveolare Epithelzellen, die auf Bioreaktorprozesse übertragen werden könnten. Daher besteht dringender Entwicklungsbedarf von 2D- und 3D-Protokollen für die alveolare Epithelzellendifferenzierung aus hiPSCs, um sie als Zellquelle für In-vitro-Testsysteme zu nutzen.

## 2. Ziele der Arbeit

Lungenerkrankungen sind die zweithäufigste Todesursache weltweit. Zur Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten werden aussagekräftige Testsysteme benötigt, die bislang eingesetzte Tiermodelle ersetzen können. Human-relevante In-vitro-Modelle für die Lunge können aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSCs) generiert werden. Auch wenn diese Zellquelle viele Vorteile mit sich bringt, besteht im Bereich robuster, reproduzierbarer Differenzierungsstrategien von Lungenzelltypen dringender Entwicklungs- und Optimierungsbedarf, da die Zellen für den Einsatz in der Forschung und Medikamentenentwicklung in einer industriell relevanten und reproduzierbaren Quantität und Qualität zur Verfügung stehen müssen. Alveolare Epithelzellen, die für den Prozess der Atmung essentiell sind, stellen Angriffspunkt für eingeatmete Pathogene wie Bakterien und Viren dar und sind in vielen Krankheitsbildern der Lunge involviert. So sind sie beispielweise auch direkte Zielzellen von SARS-CoV-2. Bestehende Differenzierungsprotokolle für alveolare Epithelzellen sind für die großmaßstäbliche Produktion und deren Einsatz in der präklinischen Testung bislang ungeeignet.

Aus diesem Grund ist das Ziel dieser Arbeit die Entwicklung eines Differenzierungsprotokolls für alveolare Epithelzellen aus hiPSCs, das sowohl unter statischen 2D-, als auch unter dynamischen 3D-Bedingungen im Bioreaktor angewendet werden kann. Da die alveolare Differenzierung ein komplexer Prozess aus fünf aufeinanderfolgenden Stufen darstellt, soll die Eignung dieser beiden ausgewählten Differenzierungsstrategien anhand einer vergleichenden Gen- und Proteinexpressionsanalyse untersucht werden. Dabei soll auf gesunde und genetisch veränderte hiPSC-Linien zurückgegriffen werden, um die Robustheit und Übertragbarkeit der Methoden auch für Krankheitsmodelle zu überprüfen. Diese Vorgehensweise erlaubt es, bestehende Unterschiede zwischen den beiden Methoden in jeder Stufe der Differenzierung zu erkennen und die Vorteile der jeweiligen Strategie herauszustellen. Die Eignung der generierten Zellen als präklinisches Testsystem soll außerdem an der Infektion mit SARS-CoV-2 als aktuelles Krankheits- und Forschungsbeispiel gezeigt werden. Ein weiterer, wichtiger Aspekt zur Einsatzfähigkeit hiPSC-abgeleiteter Zelltypen in der Medikamentenentwicklung stellt die Kryokonservierung dar. In dieser Arbeit soll ein geeigneter Zeitpunkt hierfür definiert werden, der es ermöglicht, Zellen zukünftig aufzubewahren, ohne dabei an spezifischen Charakteristika zu verlieren.

Die beschriebenen Einzelziele der vorliegenden Arbeit sollen den zukünftigen Einsatz von hiPSC-abgeleiteten, patienten-spezifischen alveolaren Epithelzellen zur Erforschung neuer Medikamente wie z.B. für COVID-19 oder Cystische Fibrose ebnen.



### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2: Allgemeine Verbrauchsmaterialien**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Aluminiumfolie	VWR International LLC, Deutschland
Aspirationspipetten	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
CERO 3D Tubes	Omni Life Science GmbH, Deutschland
Chirurgisches Skalpell	Braun GmbH, Deutschland
Deckgläser 24 x 50 mm	VWR International LLC, Deutschland
Einfrierröhrchen (2 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Einwegpipetten (2- 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
FACS-Röhrchen	VWR International LLC, Deutschland
Flüssigkeits-Reservoirs	VWR International LLC, Deutschland
Glasobjektträger Superfrost	Thermo Fisher Scientific Inc, Deutschland
Glasgefäße	Schott AG, Deutschland
Messkassette Via1-Cassette™	ChemoMetech A/S, Dänemark
MicroAmp™ optische Adhäsionsfolie	Applied Biosystems, USA
MicroAmp™ Fast 96-Well Reaktionsplatte	Applied Biosystems, USA
Papiertücher	VWR International LLC, Deutschland
PCR-Mikro-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Petrischalen (60 mm)	Thermo Fisher Scientific Inc., Deutschland
Petrischalen quadratisch (120 x 120 mm)	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Pipettenspitzen (10-1000 µl)	Fisher Scientific GmbH, Deutschland
6-, 12-, 96-well Platten	VWR International, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,6 ml, 1,5 ml, 2 ml)	VWR International, Deutschland
Zellkulturinserts, PET-Membran, 0.4 µm Porengröße, 12 well	Corning Inc., Niederlande
Zellsiebe (70 µm)	Corning Inc., Niederlande
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland

#### 3.2. Geräte

**Tabelle 3: Geräte**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Analysenwaage CP64	Sartorius AG, Deutschland
Autoklav	Holzner GmbH, Deutschland
Absaugvorrichtung Integra Vacusafe	Integra Biosciences AG, Deutschland
Brutschrank BB6220	Thermo Fisher Scientific Inc., Deutschland

CERO 3D Bioreaktor	Omni Life Science GmbH, Deutschland
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr AG, Deutschland
Kryo-Einfriergerät Mr.Frosty	Thermo Fisher Scientific Inc., Deutschland
Konfokal-Laserscanning-Mikroskop TCS SP8	Leica Microsystems
Kühlschrank (4 °C)	Liebherr AG, Deutschland
Mehrkanalpipetten	Eppendorf AG, Deutschland
Mikrobiologische Sicherheitsbank Kl. II	Weiss Pharmatechnik GmbH, Deutschland
Mikroskop IX70 (Inverses Durchlichtmikroskop mit Phasenkontrast- und Fluoreszenzfilter)	Olympus GmbH, Deutschland
NanoDrop™ 2000/2000c	Thermo Fisher Scientific Inc., Deutschland
NucleoCounter® NC-200™	ChemoMetech A/S, Dänemark
Pipettierhilfe (Pipetboy)	Integra Biosciences AG, Deutschland
Reinstwasseranlage MilliQ	Merck Millipore, Deutschland
Rotationsschüttler MTS 4	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Deutschland
Spülmaschine Typ 8535	Miele Professional KG, Deutschland
Thermocycler SimpliAmp™	Applied Biosystems, USA
Tiefkühlschrank (-80 °C)	Thermo Fisher Scientific Inc., Deutschland
Waage PCB2002	Kern & Sohn GmbH, Deutschland
Wasserbad	Thermo Fisher Scientific Inc., Deutschland
QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System	Applied Biosystems, USA
Zentrifuge 3K18	Sigma GmbH, Deutschland

### 3.3. Chemikalien, Reagenzien und rekombinante Wachstumsfaktoren

**Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien**

Bezeichnung	Hersteller
Actin Green™ 488 Ready Probes™ Reagent	Invitrogen AG, Deutschland
8-Bromadenosin-Monophosphat zyklisch (cAMP)	Sigma-Aldrich Inc., Deutschland
B-27™ Supplement (50X)	Fisher Scientific GmbH, Deutschland
BSA Fraktion V	VWR International LLC, Deutschland
CHIR99021	Sigma-Aldrich Inc., Deutschland
CTS™ N-2 Supplement (100X)	Fisher Scientific GmbH, Deutschland
Cytofix™ Fixierpuffer	BD Biosciences Corp., Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fisher Bioreagents, Deutschland
Dexamethason	Alfa Aesar, Deutschland
DMEM/F12 Zellkulturmedium	Fisher Scientific GmbH, Deutschland
Dorsomorphin	Sigma-Aldrich Inc., Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 0.5 M	Invitrogen AG, Deutschland
Ethanol, absolute for analysis	VWR International LLC, Deutschland
Ethanol, vergällt	VWR International LLC, Deutschland

FACSFlow™ Trägerflüssigkeit	Fisher Scientific GmbH, Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich Inc., Deutschland
GlutaMAX™ Supplement	Invitrogen AG, Deutschland
Ham's F12 Zellkulturmedium	Invitrogen AG, Deutschland
IMDM Zellkulturmedium	Invitrogen AG, Deutschland
ImmuMount™ Mountingmedium	Fisher Scientific GmbH, Deutschland
Isobutylmethylxanthin (IBMX)	Sigma-Aldrich Inc., Deutschland
Isopropanol	Merck KGaA, Deutschland
L-Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich Inc., Deutschland
Matrigel® Basalmembran Matrix GFR	Corning Inc., Niederlande
MEM Non-Essential Amino Acids (100X)	Fisher Scientific GmbH, Deutschland
mFRESR™ Einfriermedium	STEMCELL Technologies GmbH, Deutschland
Monothioglycerol	Sigma-Aldrich Inc., Deutschland
mTESR™1 Stammzellkulturmedium	STEMCELL Technologies GmbH, Deutschland
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich Inc., Deutschland
NucBlue™ Fixed Cell Ready Probes™ Reagent	Invitrogen AG, Deutschland
pCG1-SARS-CoV-2-GFP	Fraunhofer IBMT, Deutschland
Polybren Transfektionsreagenz	Sigma-Aldrich Inc., Deutschland
Reagenz A	ChemoMetech ChemoMetech A/S, Dänemark
Reagenz B	ChemoMetech ChemoMetech A/S, Dänemark
Retinsäure	Sigma-Aldrich Inc., Deutschland
RPMI1640 Zellkulturmedium	Fisher Scientific GmbH, Deutschland
SB431542	R&D Systems GmbH, Deutschland
StemPro™ Accutase™	Fisher Scientific GmbH, Deutschland
TaqMan® Fast Advanced Master Mix	Applied Biosystems, USA
TaqMan® Genexpressions-Assays (FAM)	Applied Biosystems, USA
Total human lung RNA	Invitrogen AG, Deutschland
Trypsin EDTA (0.5 %)	Fisher Scientific GmbH, Deutschland
Penicillin/ Streptomycin	Fisher Scientific GmbH, Deutschland
Phosphatpuffer (PBS), pH 7,2	Fisher Scientific GmbH, Deutschland
Y-27632 ROCK Inhibitor (ROCK)	Bio-Techne Corporation, Deutschland

**Tabelle 5: Humane rekombinante Wachstumsfaktoren**

Bezeichnung	Hersteller
Activin A	STEMCELL Technologies GmbH, Deutschland
BMP-4	Peprotech GmbH, Deutschland
KGF	Peprotech GmbH, Deutschland

Tabelle 6: Kits

Bezeichnung	Hersteller
Embryoid Body Dissociation Kit	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Deutschland
Fixation/Permeabilization Kit	BD Biosciences Corp., Deutschland
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, USA
RNeasy Micro Kit	Qiagen GmbH, Deutschland

Tabelle 7: Antikörper

Bezeichnung	Konjugat	Hersteller
ACE2-monoclonal mouse IgG <sub>1</sub>	AlexaFluor <sup>®</sup> 488	SantaCruz Biotechnology Inc. Deutschland
AQP5- monoclonal mouse IgG <sub>1</sub>	AlexaFluor <sup>®</sup> 488	SantaCruz Biotechnology Inc. Deutschland
CAV1-monoclonal mouse IgG <sub>2b</sub>	AlexaFluor <sup>®</sup> 488	SantaCruz Biotechnology Inc. Deutschland
CFTR-monoclonal mouse IgG <sub>1</sub>	AlexaFluor <sup>®</sup> 488	SantaCruz Biotechnology Inc. Deutschland
CXCR4-monoclonal mouse IgG <sub>2a</sub>	AlexaFluor <sup>®</sup> 488	R&D Systems GmbH, Deutschland
FOXA2-polyclonal goat IgG	AlexaFluor <sup>®</sup> 488	R&D Systems GmbH, Deutschland
IgG Donkey anti-Mouse	AlexaFluor <sup>®</sup> 488	Invitrogen AG, Deutschland
IgG Donkey anti-Mouse	AlexaFluor <sup>®</sup> 594	Invitrogen AG, Deutschland
Monoclonal mouse IgG <sub>1</sub> Isotype	AlexaFluor <sup>®</sup> 488	R&D Systems GmbH, Deutschland
Monoclonal mouse IgG <sub>2a</sub> Isotype	AlexaFluor <sup>®</sup> 488	R&D Systems GmbH, Deutschland
Monoclonal mouse IgG <sub>2b</sub> Isotype	AlexaFluor <sup>®</sup> 488	R&D Systems GmbH, Deutschland
Normal mouse IgG <sub>1</sub> Isotype	AlexaFluor <sup>®</sup> 488	SantaCruz Biotechnology Inc. Deutschland
Normal mouse IgG <sub>2a</sub> Isotype	AlexaFluor <sup>®</sup> 488	SantaCruz Biotechnology Inc. Deutschland
Normal mouse IgG <sub>2a</sub> Isotype	AlexaFluor <sup>®</sup> 594	SantaCruz Biotechnology Inc. Deutschland
Normal mouse IgG <sub>2b</sub> Isotype	AlexaFluor <sup>®</sup> 488	SantaCruz Biotechnology Inc. Deutschland
Polyclonal goat IgG Isotype	AlexaFluor <sup>®</sup> 488	R&D Systems GmbH, Deutschland
SOX2-monoclonal mouse IgG <sub>2a</sub>	AlexaFluor <sup>®</sup> 488	R&D Systems GmbH, Deutschland
SOX9-monoclonal mouse IgG <sub>2a</sub>	AlexaFluor <sup>®</sup> 488	SantaCruz Biotechnology Inc. Deutschland
SOX17-monoclonal mouse IgG <sub>1</sub>	AlexaFluor <sup>®</sup> 488	R&D Systems GmbH, Deutschland
SP-B-monoclonal mouse IgG <sub>2b</sub>	AlexaFluor <sup>®</sup> 488	SantaCruz Biotechnology Inc. Deutschland
SP-C-monoclonal mouse IgG <sub>2b</sub>	AlexaFluor <sup>®</sup> 488	SantaCruz Biotechnology Inc. Deutschland
SP-D-monoclonal mouse IgG <sub>1</sub>	AlexaFluor <sup>®</sup> 488	SantaCruz Biotechnology Inc. Deutschland
T1 $\alpha$ -monoclonal mouse IgG <sub>2a</sub>	AlexaFluor <sup>®</sup> 488	SantaCruz Biotechnology Inc. Deutschland
TMPRSS2-monoclonal mouse IgG <sub>1</sub>	AlexaFluor <sup>®</sup> 594	SantaCruz Biotechnology Inc. Deutschland
TTF-1-monoclonal mouse IgG <sub>1</sub>	AlexaFluor <sup>®</sup> 488	SantaCruz Biotechnology Inc. Deutschland

Tabelle 8: qPCR-Primer (TaqMan®-Assays)

Gen	Assay-ID
ACE2	Hs01085331_m1
AQP5	Hs00387048_m1
CAV1	Hs00971716_m1
CFTR	Hs00357011_m1
CXCR4	Hs00607978_s1
FOXA2	Hs00232764_m1
HPRT1	Hs99999909_m1
NKX2.1	Hs00968940_m1
PDPN	Hs00366766_m1
SOX2	Hs00968940_m1
SOX9	Hs00165814_m1
SOX17	Hs00751752_s1
SP-B	Hs00167036_m1
SP-C	Hs00951326_g1
SP-D	Hs01108490_m1
TMPRSS2	Hs05024838_m1

### 3.4. Medien, Lösungen und Pufferzusammensetzungen

#### Stammzell Medium

mTESR™1 Basal medium (STEMCELL 85851)	400 ml
mTESR™1 5X Supplement (STEMCELL 85852)	100 ml

#### Stop Medium

DMEM/F12 (Invitrogen 11330057)	
FKS	10 %

#### DE Medium

RPMI1640 (Invitrogen 21875034)	
Penicillin/Streptomycin	1 %
Human recombinant Activin A	100 ng/ml
CHIR99021	3 µM

**Basis Medium**

IMDM (Invitrogen 21980032)	3 Teile
Ham's F12 (Invitrogen 11765054)	1 Teil
Penicillin/Streptomycin	0,5 %
GlutaMAX	1 %
BSA Fraktion V	0,1 %
B27	1 %
N2	0,5 %
Monothioglycerol	0,5 mM
L-Ascorbinsäure	50 µg/ml

**AFE Medium**

Basis Medium	
SB431542	10 µM
Dorsomorphin	2 µM

**LP Medium**

Basis Medium	
BMP4	10 ng/ml
CHIR99021	3 µM
Retinsäure	0,5 µM

**AT2 Medium**

Basis Medium	
KGF	10 ng/ml
CHIR99021	3 µM
Dexamethason	50 nM
8-Br-cAMP	0,1 mM
IBMX	0,1 mM

**AT1 Medium**

Basis Medium	
KGF	10 ng/ml
CHIR99021	3 µM
Dexamethason	50 nM
8-Br-cAMP	0,1 mM
IBMX	0,1 mM
ROCK	10 µM

**Puffer für Stammzell-Passage**

PBS pH 7,2 (Invitrogen 11530546)

EDTA 0,5 M (Invitrogen AM9260G) 0,5 mM

**Färbepuffer für Durchflusszytometrie**

PBS pH 7,2 (Invitrogen 11530546)

FKS 2 %

NaN<sub>3</sub> 0,1 %

EDTA 0,5 M 0,5 mM

**3.5. Methoden****3.5.1. Zellbiologische Methoden**

Alle für die Zellkultur verwendeten Gebrauchsmaterialien waren vom Hersteller steril verpackt oder wurden vor Gebrauch autoklaviert. Um Kontaminationen durch Mikroorganismen zu vermeiden, wurden sämtliche zellbiologische Methoden unter aseptischen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden bei 37 °C, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert.

Die in dieser Arbeit verwendeten hiPS-Zelllinien UKKi011-A, UKBi005-A und BIONi010-C stammen aus der europäischen Bank für induzierte pluripotente Stammzellen (EBiSC) und sind ebenfalls registriert auf hpsreg.eu (siehe BioSample ID). Die Hersteller, Gewebeherkunft, Geschlecht, Alter und Reprogrammierungsmethode sind in Tab. 9 aufgeführt. Die hiPSC-Linie DYP0250 wurde von American Type Culture Collection (ATCC<sup>®</sup>) bezogen und stammt aus einem Cystischen Fibrose-Patienten mit F508del Mutation. Die hiPSC-Linie BIONi010-C-O16 stellt ein mittels CRISPR/Cas-9 genommodifizierter Klon der BIONi010-C Zelllinie dar. Bei dieser wurde an Position 508 des CFTR-Gens die Base Phenylalanin im Genom entfernt, was ebenfalls die CF-auslösende Mutation F508del zur Folge hat. Der beschriebene Mutations-Knock-In wurde extern von der Firma Synthego Inc. (USA) durchgeführt und mittels Sequenzierung nachgewiesen. Die Kultivierung aller verwendeten Stammzelllinien erfolgte standardmäßig in matrixbeschichteten Kulturschalen (60 mm) im Stammzellkulturmedium mTESR™1.

Tabelle 9: Verwendete hiPS-Zelllinien

Zelllinie BioSample ID	Gewebe	Geschlecht/ Krankheit	Alter	Reprogrammierungs- methode	Hersteller
<b>UKKi011-A</b> SAMEA2774610	Fibroblasten	männlich/ gesund	35-39	Episomal	Uniklinik Köln, Deutschland
<b>UKBi005-A</b> SAMEA4584351	Fibroblasten	weiblich/ gesund	20-24	Retrovirus	Uniklinik Bonn, Deutschland
<b>BIONI010-C</b> SAMEA3158050	Fibroblasten	männlich/ gesund	15-19	Episomal	Bioneer A/S, Dänemark
<b>BIONI010-C-O16</b>	Fibroblasten	männlich/ CF (F508del)	15-19	Episomal	Bioneer A/S, mod. Synthego Inc., USA
<b>DYP0250</b>	Fibroblasten	männlich/ CF (F508del)	16	Episomal	ATCC®, USA

### Basalmembran-Beschichtung von Zellkulturgefäßen

Um eine adäquate Wachstums Umgebung einer dreidimensionalen Zellverbandstruktur zu gewährleisten, wurden alle Zellkulturgefäße vor der Verwendung mit einer basalmembranartigen Matrix beschichtet. Diese stellt eine komplexe Mischung aus Proteinen wie Kollagen, Laminin und Entactin dar und ähnelt daher der Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix tierischer Zellen [159]. Die verwendete Matrix (Matrigel®, Corning) stammt aus dem murinen Engelbreth-Holm-Swarm-Sarkom und bildet bei 37 °C ein Hydrogel aus, während es bei 4 °C flüssig vorliegt. Zur Beschichtung von Zellkulturgefäßen wurden 1 mg/ml-Stammlösungen Matrigel® Growth Factor Reduced (GFR) Basement Membrane Matrix (Corning 356231) mit kaltem DMEM/F12-Medium (Invitrogen 11330057) auf 0,083 mg/ml zu einer Beschichtungslösung verdünnt. Kulturschalen mit einem Durchmesser von 60 mm wurden mit 2 ml und 6-well Platten mit 1 ml der Beschichtungslösung bedeckt und zur Polymerisation bei 37 °C für mindestens 1 Stunde inkubiert. Um ein Austrocknen der Matrix zu verhindern, wurden die Zellkulturgefäße einmal wöchentlich mit DMEM/F12 aufgefüllt. Die beschichteten Zellkulturgefäße wurden höchstens 14 Tage bei 37 °C bis zur Verwendung aufbewahrt.

### Auftauen von Zellen

Die im serum-freien Kryopreservationsmedium mFRESR™ konservierten Zellen wurden dem zur Langzeitlagerung vorgesehenen Stickstofftank (-170 °C) entnommen und anschließend in einem Wasserbad (37 °C) erwärmt. Da die Zellen nach dem Auftauen meist vereinzelt vorliegen, muss dem Stammzellkulturmedium 10 µM ROCK zugesetzt werden, um einem übermäßigen Zellverlust vorzubeugen und die Adhäsion der Zellen sicherzustellen. Die aufgetaute Zellsuspension wurde in



10 ml Stammzellkulturmedium mTESR™1 + ROCK aufgenommen und in ein 15 ml- Zentrifugenröhrchen überführt. Zum Entfernen des überschüssigen Kryomediums wurden die Zellen bei 200 g und Raumtemperatur für 2 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in 4 ml Stammzellkulturmedium (mTESR™1 + 10 µM ROCK) resuspendiert. Aus zwei matrixbeschichteten Kulturschalen (60 mm) wurde der Überstand abgesaugt und in eine Kulturschale 3 ml und in eine andere Kulturschale 1 ml Stammzellkulturmedium (mTESR™1 + 10 µM ROCK) vorgelegt. 1 ml der Zellsuspension wurde in die Kulturschale mit 3 ml vorgelegtem Medium überführt, 3 ml der Zellsuspension in die Kulturschale mit 1 ml, sodass der Inhalt insgesamt 4 ml betrug. Somit wurden die aufgetauten Zellen 80:20 aufgeteilt, sodass man auf eine Back-Up Kultur (20 %) bei übermäßig schnellem Zellwachstum zurückgreifen konnte. Nach 24 Stunden wurde auf Stammzellkulturmedium mTESR™1 ohne ROCK umgestellt. Danach fand ein täglicher Mediumwechsel bis zu 80 % Konfluenz statt. Die Zellen wurden nach dem Auftauen mindestens einmal passagiert, bevor sie für Versuche verwendet wurden.

### **Passagieren von Zellen**

Um eine ständig fortlaufende Zellkultivierung aufrecht zu erhalten, müssen die verwendeten Zellen bei einer Zelldichte von 80-90 % passagiert werden, damit ein Absterben der Zellen, ein Wachstumsstillstand oder eine unkontrollierte Differenzierung vermieden wird. Hierzu wurde zunächst das in den Kulturschalen vorhandene Stammzellkulturmedium abgesaugt. Den Zellen wurden 2 ml einer 0,5 mM EDTA-Lösung zugegeben und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Es erfolgte die Aspiration der EDTA-Lösung und eine Trockeninkubation bei 37 °C für weitere 7 min. Anschließend erfolgte ein dreimaliges Aufklopfen der Kulturschale, um die Zellen von der Oberfläche abzulösen und die vorsichtige Aufnahme der Zellklümpchen im benötigten Volumen an Stammzellkulturmedium. Die Zellsuspension wurde je nach Zelllinie und Bedarf in einem Split-Verhältnis von 1:5-1:30 auf frische matrixbeschichtete Kulturschalen mit vorgelegtem Stammzellkulturmedium aufgeteilt. Es erfolgte ein täglicher Mediumwechsel.

### **Vereinzlung von Zellen**

Um die Zellen einzufrieren oder zur Differenzierung aussäen zu können, müssen die Stammzellkolonien zunächst mithilfe eines Dissoziationsreagenz (StemPro™ Accutase™) in Einzelzellen dissoziiert werden und eine Zellzahlbestimmung durchgeführt werden. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und für 7 min bei 37 °C mit Accutase inkubiert. Mithilfe einer 1000 µl-Pipette wurde die Zellsuspension aufgenommen und mehrmals

resuspendiert, um eine Vereinzelnung der Zellen zu gewährleisten und in mTESR™1 + 10 µM ROCK überführt. Die Zellsuspension wurde bei 300 g und Raumtemperatur für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in mTESR™1 + 10 µM ROCK aufgenommen.

### **Bestimmung der Zellzahl**

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit dem auf Bild-Zytometrie beruhenden, automatischen Zellzählsystem NucleoCounter® NC-200™. Um eine Lebend-Tot-Messung durchzuführen, wurden 100 µl und 200 µl der Zellsuspension in zwei separate 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Zunächst wurden 100 µl des Fluoreszenzfarbstoffs Acridine Orange („Reagenz A“) sowie 100 µl des Fluoreszenzfarbstoffs DAPI („Reagenz B“) zu 100 µl Zellsuspension hinzugefügt und vermischt. Die Inkubationslösung wurde in die Via-1-Kassette aufgenommen und vermessen. Darauf folgte die Messung der ungefärbten Zellsuspension (200 µl) zum Ausschluss von toten Zellen. Mit der ermittelten Zellzahl pro ml und der angegebenen Zellviabilität in % konnten anschließend Berechnungen für die weitere Verwendung der Zellen angestellt werden.

### **Kryokonservierung von Zellen**

Zur Kryokonservierung wurden Zellen zunächst nach einmaligem Waschen mit PBS mittels Accutase oder 0,05 % Trypsin EDTA abgelöst und vereinzelt (vgl. Vereinzelnung der Zellen und Bestimmung der Zellzahl). Je 1,0- 2,0 x 10<sup>6</sup> Zellen wurden in 1 ml serum-freien Kryopreservationsmedium mFRESR™ aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Diese wurden anschließend in ein mit Isopropanol gefülltes Einfriergerät (Mr. Frosty), welches bei -80 °C die Zellen um 1 °C pro Minute herunterkühlt, zwischengelagert. Nach 12-24 Stunden wurden die Kryoröhrchen in den Stickstoff-Tank (- 196 °C) zur langfristigen Lagerung überführt.

### **Bildung von Embryoid Bodies**

Embryoid bodies (EBs) sind spontan geformte, in dreidimensionaler Struktur vorliegende Zellaggregate, welche in dieser Arbeit als Ausgangspunkt für eine Differenzierung in einer dreidimensionalen, dynamischen Umgebung dienen. Zur Bildung von EBs müssen die Zellen vereinzelt und im pluripotenten Zustand vorliegen. Die Zellen wurden dissoziiert und die Zellzahl der Zellsuspension bestimmt (vgl. Vereinzelnung der Zellen und Bestimmung der Zellzahl). Die optimale Zellzahl zur Bildung von EBs ist zelllinienabhängig und wurde für die verwendeten Zelllinien in Vorstudien auf 7,5 x 10<sup>5</sup> viable Zellen pro ml mTESR™1 +10 µM ROCK festgelegt. Die Formation

der EBs fand unter dynamischen Bedingungen in einem automatischen Suspensions-Bioreaktor (CERO 3D, Omni Life Sciences) statt. Hierfür wurden bis zu 20 ml Zellsuspension in CERO 3D-Röhrchen überführt und 24 Stunden bei 60 rpm in alternierender Richtung, 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Ein Mediumwechsel fand nach einer Sedimentationszeit von ca. 5 min statt. Hierfür wurde der Überstand bis auf ca. 2 ml abgesaugt und mit Differenzierungsmedium ersetzt. Zelldebris konnten durch diesen Vorgang eliminiert werden, wodurch sich zur Weiterkultivierung nur EBs und keine Einzelzellen im Zellkulturröhrchen befanden.

### 3.5.2. Differenzierung in alveolare Epithelzellen Typ 2 und Typ 1

Die In-vitro-Differenzierung von hiPSCs in alveolare Epithelzellen zweier Typen verläuft schrittweise über mehrere Stufen, welche auch embryonale Stammzellen während der Organogenese *in vivo* durchlaufen. Das in dieser Arbeit entwickelte Protokoll umfasst eine 30-tägige Differenzierung für AT2 und insgesamt 37-tägige Differenzierung für AT1. Ausgangspunkt für die Differenzierung war entweder die 3D-Embryoid Body-Kultur oder die 2D-Stammkultur.

#### 2D-Differenzierung

Die 2D-basierte Differenzierung startete mit hiPSC-Kolonien in 60 mm-Kulturschalen bei etwa 80-90 % Konfluenz (Tag 0). Nach jeder abgeschlossenen Differenzierungsstufe war ein Ablösen, Zählen und erneutes Aussäen der Zellen erforderlich. Hierfür wurden die Zellen stets mit PBS gewaschen, anschließend mit 1 ml 0,05 % Trypsin/EDTA pro Well bei 37 °C für 5 min inkubiert und die Reaktion wurde schließlich durch Überführen der Zellsuspension in Stop-Medium beendet. Es folgte die Zentrifugation bei 300 g für 3 min, die Aufnahme der Zellpellets im jeweiligen Differenzierungsmedium mit 10 µM ROCK und die Zellzahlbestimmung mittels NucleoCounter®. Die Zellen wurden in der entsprechenden Zellzahl je nach Differenzierungsstufe auf frisch beschichteten 6-well Platten in einem Volumen von 2 ml pro Well ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Differenzierungsmedium stets gegen Medium ohne zugesetzten ROCK ausgetauscht.

An Tag 0 wurde das Kulturmedium der hiPSC-Kultur abgesaugt und gegen 3 ml frisches DE-Medium pro Schale ersetzt. Der Mediumwechsel erfolgte täglich für insgesamt 3 Tage. An Tag 3 wurden die differenzierten DE-Zellen abgelöst und gezählt.  $1,0 \times 10^6$  Zellen in AFE-Medium + 10 µM ROCK wurden pro Well ausgesät und für 4 Tage kultiviert. Der Mediumwechsel fand alle 48 Stunden statt. An Tag 7 der Differenzierung wurden die Zellen erneut abgelöst, eine Zellzahlbestimmung durchgeführt und in LP-Medium + 10 µM ROCK in einer Zelldichte von  $2,0 \times 10^5$  Zellen pro Well ausgesät. Die Kultivierungsdauer dieser Stufe betrug nun insgesamt 9 Tage mit

Auswechseln des Mediums alle 48 Stunden. An Tag 16 der Differenzierung erfolgte ein erneutes Ablösen, Zählen und Aussäen der Lungenvorläuferzellen in AT2-Medium + 10 µM ROCK in einer Zelldichte von  $2,5 \times 10^5$  Zellen pro Well. Medienwechsel fanden in dieser Differenzierungsstufe alle 48-72 Stunden während einer insgesamt 14-tägigen Kultivierungsdauer statt. An Tag 30 wurden die AT2-Zellen in einer Zelldichte von  $1,0 \times 10^6$  Zellen pro Well in AT1-Medium ausgesät und für 7 weitere Tage kultiviert. Ein Mediumwechsel war alle 48-72 Stunden erforderlich.

### **3D-Differenzierung**

Die dynamische Bioreaktor-basierte 3D-Differenzierung startete mit EBs, die 24 Stunden zuvor angesetzt wurden (Tag -1). Bei jedem Mediumwechsel wurden EBs im CERO 3D-Zellkultur-röhrchen ca. 5 min absinken gelassen, bevor der Mediumüberstand bis auf ca. 2 ml abgesaugt wurde. Je nach Ausgangszellzahl wurden 10-20 ml frisch angesetztes Differenzierungsmedium pro CERO 3D-Röhrchen zugegeben.

Die 3D-Differenzierung startete demnach an Tag 0 mit der Zugabe von DE-Medium. Das Medium wurde 3 Tage lang täglich gewechselt. An Tag 3 erfolgte eine Umstellung auf AFE-Medium für insgesamt 4 Tage, ein Mediumwechsel fand alle 24-48 Stunden statt. An Tag 7 der Differenzierung wurde das AFE-Medium abgesaugt und gegen LP-Medium ersetzt. Bei LP-Medium wurde die Retinsäure stets unmittelbar vor dem Mediumwechsel zugesetzt und abgedunkelt. Ein Mediumwechsel fand alle 48 Stunden statt. An Tag 16 erfolgte die Umstellung auf AT2-Medium für bis zu 14 Tage. Medienwechsel fanden alle 48-72 Stunden statt. An Tag 30 wurde schließlich das Medium für 7 Tage auf AT1-Medium umgestellt, dabei fand ein Wechsel des Mediums alle 72 Stunden statt.

#### **3.5.3. Protein- und Genexpressionsanalyse**

##### **Zellernte**

2D- und 3D-differenzierte Zellen sollten in allen Stufen der Lungenentwicklung hinsichtlich ihrer Expression verschiedener spezifischer Marker vergleichend untersucht werden. Hierfür wurden 3D- differenzierte Sphäroide mit einer 5 ml-Einwegpipette aus den CERO 3D-Röhrchen aufgenommen und in 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Mithilfe des Embryoid Body Dissoziationskits wurden die Sphäroide nach dem Protokoll des Herstellers in Einzelzellen dissoziiert und schließlich in PBS aufgenommen. 2D-differenzierte Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, mittels 0,05 % Trypsin/EDTA bei 37 °C für 5 min abgelöst und in Stop-Medium aufgenommen. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 300 g für 3 min und die Aufnahme der

Zellpellets in PBS. Schließlich wurden sowohl 3D- als auch 2D-differenzierte Zellen gezählt, um Proben für die Analyse mittels Durchflusszytometrie und qPCR vorzubereiten.

### **Durchflusszytometrie**

Mittels durchflusszytometrischer Analyse können spezifische intrazelluläre und Oberflächenfluoreszenzmarker in und auf Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung bestimmt werden. Hierfür wurden zum jeweiligen Analysezeitpunkt die Zellen geerntet (vgl. Zellernte) und für die durchflusszytometrische Analyse mithilfe des Fixation/Permeabilization Solution Kits fixiert und permeabilisiert. Für jede Probe (ungefärbte Kontrolle, Marker und jeweilige Isotypenkontrolle des Markers) wurden  $1.0 \times 10^6$  Zellen in ein 15 ml- Zentrifugenröhrchen überführt und bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in entsprechendem Volumen an Cytotix/Cytoperm™-Puffer resuspendiert und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde 1 ml eines 1:10 verdünnten Permeabilisierungskonzentrats (Perm/Wash™-Puffer) in Aqua dest. hinzugegeben und bei 300 g für 3 min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde wiederholt und das Zellpellet schließlich in 100 µl Färbepuffer pro Probe aufgenommen. Die Proben wurden bis auf die ungefärbte Kontrolle mit 5 µl pro einer Million Zellen eines direkt konjugierten Antikörpers für die Durchflusszytometrie für 30 min bei 4 °C inkubiert. Es erfolgte die Zugabe von 5 ml Färbepuffer pro Probe und die Zentrifugation bei 300 g für 3 min. Das Zellpellet wurde in 300 µl Färbepuffer aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Die Messung erfolgte am FACS Calibur und die Daten wurden mithilfe der FlowJo Software ausgewertet.

### **Genexpressionsanalyse**

Mithilfe einer Genexpressionsanalyse kann die Aktivität und Expression verschiedener Gene in Zellen gemessen und damit eine Übersicht über vorhandene Zellfunktionen ermöglicht werden. Die Methode, die hierfür zum Einsatz kommt, ist die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR), die eingesetzte cDNA vervielfältigt und in Echtzeit mithilfe von eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffen quantifiziert [160]. Die cDNA, die hierfür benötigt wird, muss zunächst aus isolierter RNA, welche aus einem Zelllysat extrahiert und aufgereinigt wird, mittels reverser Transkription hergestellt werden. Die einzelnen Schritte werden nachfolgend beschrieben:

## RNA-Extraktion

Die Vorbereitung des Zellysats und die RNA-Extraktion wurden mithilfe des RNeasy Micro Kits nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Zellysate wurden aus  $0,5 \times 10^6$  geernteten Zellen in 350  $\mu\text{l}$  RLT-Puffer hergestellt und bis zur Extraktion bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Die Reinheit und Konzentration der extrahierten RNA wurden mithilfe des NanoDrop™ 2000 ermittelt.

## Reverse Transkription

Die reverse Transkription ist die umgekehrt stattfindende Transkription, bei der genetische Information von RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben wird. Hierfür wurde das High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) verwendet. Je nach benötigter Menge an cDNA für die qPCR-Analyse wurden pro Probe 250-500 ng RNA eingesetzt und mit RNase-freiem Wasser auf 14,2  $\mu\text{l}$  Volumen aufgefüllt. Mithilfe einer reversen Transkriptase, die einem Reaktionsmix enthalten war und wovon jeder Probe 5,8  $\mu\text{l}$  zugesetzt wurde, konnten 12,5-25 ng/ $\mu\text{l}$  cDNA umgeschrieben werden. Der eingesetzte Reaktionsmix hatte folgende Zusammensetzung:

**Tabelle 10: Zusammensetzung des Reaktionsmix für die reverse Transkription**

Komponente	Volumen pro Probe
10 x RT Buffer	2,0 $\mu\text{l}$
10 x RT Random Primers	2,0 $\mu\text{l}$
20 x Reverse Transkriptase	1,0 $\mu\text{l}$
25 x dNTPs Mix	0,8 $\mu\text{l}$

Zur Kontrolle einer korrekt ablaufenden reversen Transkription und zur Überprüfung von Verunreinigungen durch genomische DNA, wurden außerdem eine RNA-freie H<sub>2</sub>O-Probe und eine RT-Probe ohne reverse Transkriptase mitgeführt. Die Zentrifugationsröhrchen wurden anschließend im Thermocycler bei folgendem Programm inkubiert:

**Tabelle 11: Programm für die reverse Transkription im ThermoCycler**

Dauer	Temperatur
10 min	25 $^\circ\text{C}$
120 min	37 $^\circ\text{C}$
5 min	85 $^\circ\text{C}$
$\infty$	4 $^\circ\text{C}$

## Quantitative Echtzeit-PCR

Bei der qPCR wird DNA in einem Schritt vervielfältigt und quantifiziert. Fluoreszenzfarbstoffe werden dazu eingesetzt, amplifizierte DNA zu markieren. Dies ermöglicht die Quantifizierung eines spezifischen DNA-Abschnitts (Gen) während der exponentiellen Phase durch die Akkumulation des Farbstoffs in der Probe. Die Durchführung erfolgte unter Verwendung der TaqMan®-Polymerase. Pro Probe und Primer wurden Triplets angesetzt, wovon jede Probe 2,5 ng DNA enthielt. Die eingesetzten Primer (TaqMan®-Genexpressions-Assays) binden an spezifische Zielsequenzen der DNA, die dann durch die Polymerase vervielfältigt und quantifiziert werden können. Als endogene Kontrolle wurde HPRT1 verwendet, ein Enzym, welches in Eukaryoten nicht-reguliert vorliegt und daher zum relativen Mengenvergleich genutzt werden kann.

Pro Probe wurden 0,5 µl TaqMan®-Assay und 5 µl TaqMan®-Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) vorbereitet. Außerdem wurden 0,1-0,2 µl cDNA pro Probe mit 4,3-4,4 µl RNase-freiem Wasser angesetzt. Anschließend wurden 4,5 µl des cDNA-Wasser-Gemischs in die entsprechenden Wells einer Fast 96-well-MicroAmp™-Reaktionsplatte (Applied Biosystems) pipettiert. Es wurden 5,5 µl des TaqMan®-MasterMixes hinzugefügt, sodass das Reaktionsvolumen 10 µl betrug. Die Platte wurde mithilfe der MicroAmp™-Adhäsionsfolie verklebt und 5 min bei 300 rpm zentrifugiert. Die Platte wurde im Quantstudio 7 Flex (Applied Biosystems) vermessen.

## Auswertung der Daten

Die Auswertung beruht auf der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode, bei der relative Genexpressionslevel auf Grundlage der CT-Werte (cycle threshold) berechnet werden [161]. Der CT-Wert beschreibt, in welchem Zyklus das Fluoreszenzsignal einer Probe signifikant das Hintergrundsignal (Threshold) überschreitet. Die Software gibt dabei den CT-Durchschnitt eines Proben-Triplets für jedes Zielgen (Primer) aus, welcher durch folgende Formel 1 berechnet wird:

### Formel 1: Berechnung von $CT_{\text{Durchschnitt}}$

$$CT_{\text{Durchschnitt}} = \frac{CT_{\text{Probe 1.1}} + CT_{\text{Probe 1.2}} + CT_{\text{Probe 1.3}}}{3}$$

Zur weiteren Analyse wird in Formel 2 der CT-Durchschnittswert pro Zielgen auf die endogene Kontrolle bezogen ( $\Delta CT$ ), indem die Differenz gebildet wird.

### Formel 2: Berechnung von $\Delta CT$

$$\Delta CT = CT_{\text{Durchschnitt}} - CT_{\text{endogene Kontrolle}}$$

Anschließend werden alle Proben durch Anwendung von Formel 3 auf den Kalibrator bezogen ( $\Delta\Delta CT$ ), welcher in dieser Arbeit die undifferenzierten hiPSCs darstellten.

**Formel 3: Berechnung von  $\Delta\Delta CT$**

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{Probe\ 1} - \Delta CT_{Kalibrator}$$

Die relative Quantifizierung der Genexpression (RQ) kann durch Einsetzen der  $\Delta\Delta CT$ -Werte in nachstehende Formel 4 berechnet werden.

**Formel 4: Berechnung der relativen Quantifizierung des Gens (RQ)**

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Durch die berechneten RQ-Werte werden die Unterschiede der Expressionslevel im Vergleich zum Kalibrator, der stets einen RQ-Wert von 1 erhält, dargestellt. Wurde für eine Probe ein RQ-Wert von 22,6 berechnet, bedeutet dies eine 22,6-fach erhöhte Expression des Zielgens gegenüber des Kalibrators (undifferenzierte hiPSCs). Liegt der RQ-Wert unter 1, bedeutet dies eine geringere Expression des Zielgens in der untersuchten Probe im Vergleich zum Kalibrator.

### 3.5.4. Immunzytochemie

Um die Expression und Lokalisation verschiedener spezifischer Marker zu untersuchen, wurden die Zellen immunzytochemisch gefärbt. Hierfür wurden in Suspension differenzierte Sphäroide mit einer 5 ml-Einwegpipette aus den CERO 3D-Röhrchen aufgenommen und in 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Nach 5 min Sedimentationszeit wurde der Überstand abgesaugt und die Sphäroide wurden einmal mit PBS gewaschen. Es folgte eine Aufnahme der Sphäroide in Cytifix™ Fixierpuffer für eine Stunde bei 4 °C. 2D-differenzierte Zellen auf Zellkulturinserts wurden nach einmaligem waschen mit PBS für 30 min bei 4 °C in Cytifix™ Fixierpuffer inkubiert. Anschließend erfolgte ein Waschen mit PBS und eine Permeabilisierung mit 0,2 % TritonX in PBS für 40 min (3D) bzw. 20 min (2D). Die Sphäroide oder Zellrasen wurden für 1 Stunde in 1 % BSA und 0,2 % Tween20 in PBS blockiert. Der Primärantikörper wurde in der Blockierungslösung 1:100 verdünnt und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Danach erfolgte ein dreimaliges Waschen mit Blockierungslösung für jeweils 10 min. Sekundärantikörper wurden ebenfalls in Blockierungslösung 1:500 verdünnt und auf einem Schüttler im Dunkeln für 1 Stunde inkubiert. Die Proben wurden erneut für eine Dauer von 5 min mit Blockierungslösung gewaschen. Die Zytoskelettfärbung durch Phalloidin erfolgte durch Zugabe von Actin Green Ready Probes Reagent in Blockierungslösung (2 Tropfen pro ml) und einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur. Die Zellkernfärbung



durch DAPI erfolgte durch nach einmaligen Waschen mit Blockierungslösung durch die Zugabe von NucBlue Ready Probes Reagenz in Blockierungslösung (2 Tropfen pro ml) und einer 20-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur. Die Proben wurden mit ImmuMount Eindeckmedium bedeckt und am konfokalen Laserscanning-Mikroskop (Leica CLSM TCS SP8) analysiert.

### **3.5.5. Virusinfektionsstudien mit SARS-CoV-2-Pseudoviren**

An Tag 30 wurden 2D- und 3D-differenzierte AT2 dissoziiert und in einer Zelldichte von  $1,0 \times 10^5$  Zellen in 100  $\mu$ l pro Well in einer Matrix-beschichteten 96-well Platte in AT2-Medium + 10  $\mu$ M ROCK ausgesät. Nach 24-stündigem Wachstum fand die Infektion mit SARS-CoV-2-Pseudoviren statt, die am Fraunhofer IBMT in der Abteilung „Biologische Prozesse & Infrastruktur“ hergestellt wurden. Zunächst wurde hierfür Polybren Transfektionsreagenz 1:500 in AT2-Medium vorverdünnt. 50  $\mu$ l Mediumüberstand wurden pro Well abgenommen und mit Polybren-Vorverdünnung ersetzt. 100  $\mu$ l der unverdünnten pCG1-SARS-CoV-2-GFP-Stocklösung wurden pro Well zugegeben. Die Zellen wurden 72 Stunden bei 37 °C mit den Pseudoviren inkubiert, anschließend wurden GFP-positive Zellen am Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Zur Negativkontrolle wurden unbehandelte AT2-Zellen und als Positivkontrolle die Zelllinie HEK293T-ACE2-TMPRSS2 mitgeführt.

### **3.5.6. Datenverarbeitung und statistische Auswertung**

Die in dieser Arbeit beinhalteten Datensätze setzen sich aus den Messpunkten von mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten zusammen ( $n=3$ ). Dargestellt ist jeweils das arithmetische Mittel (Mittelwert)  $\pm$  Standardabweichung (SD) mit Ausnahme der Genexpressionsstudien. Hierbei wurde der Mittelwert von  $\Delta\Delta$ CT aus drei unabhängigen Experimenten gebildet und daraus das obere und untere Limit gebildet und als 95 %- Konfidenzintervalle (CI) angegeben. Um die Mittelwerte zweier Gruppen (2D und 3D) auf signifikante Unterschiede zu untersuchen, wurde ein ungepaarter T-Test (Zweistichprobentest) mit der Software Graph Pad Prism durchgeführt. Der angegebene p-Wert gibt das jeweilige Signifikanzniveau an. Hinsichtlich der Genexpressions-Daten liegt ein signifikanter Unterschied zweier Gruppen vor, wenn keine Überschneidung der oberen und unteren Grenzen der CI vorliegt. Die Datenauswertung und grafische Darstellung erfolgte mithilfe von Excel 2016, PowerPoint 2016 und BioRender.com.

## 4. Ergebnisse

Die alveolare Differenzierung stellt ein komplexer Prozess aus fünf aufeinanderfolgenden Stufen dar. In dieser Arbeit sollte eine vergleichende Gen- und Proteinexpressionsanalyse relevanter Marker in jeder Differenzierungsstufe zwischen 2D und 3D durchgeführt werden. Dabei sollte auf gesunde und genetisch veränderte hiPSC-Linien zurückgegriffen werden, um die Robustheit und Übertragbarkeit der Methode auch für Krankheitsmodelle zu demonstrieren. Hierfür wurden drei hiPS-Zelllinien gesunder Spender, UKKi011-A, UKBi005-A und BIONi010-C in allen fünf Differenzierungsstufen charakterisiert. Die finalen Differenzierungsstufen, AT2 und AT1, wurden außerdem mit zwei genetisch veränderten hiPS-Zelllinien, BIONi010-C-O16 und DYP0250, die F508del-Mutationsträger sind, durchgeführt.

Die Differenzierungsstufen, Analysezeitpunkte und Marker sind in nachfolgender Tabelle 12 dargestellt.

**Tabelle 12: Übersicht der analysierten Differenzierungsstufen, Zeitpunkte und Marker**

Differenzierungsstufe	Zeitpunkt	Differenzierungsmarker
Definitive Endoderm (DE)	Tag 3	SOX17, FOXA2, CXCR4
Anterior Foregut Endoderm (AFE)	Tag 7	SOX2, FOXA2
Lung Progenitor (LP)	Tag 16	NKX2.1, SOX9
Alveolare Epithelzellen Typ 2 (AT2)	Tag 23, 30	SP-C, SP-B, SP-D, CFTR, ACE2, TMPRSS2
Alveolare Epithelzellen Typ 1 (AT1)	Tag 37	AQP5, CAV1, PDPN

### 4.1. Analyse von Definitiven Endoderm (DE)-Zellen

Während der Lungenembryogenese gehen alveolare Epithelzellen aus dem Keimblatt DE hervor, weshalb dieses die erste analysierte Differenzierungsstufe dieser Arbeit darstellte. Aus den Ergebnissen der Gen- und Proteinexpressionsanalyse von DE-Zellen an Tag 3 ging hervor, dass nahezu homogene Populationen DE-Zellen aus drei unterschiedlichen, gesunden hiPS-Zelllinien generiert werden konnten, die die endodermalen Transkriptionsfaktoren SOX17, FOXA2 und CXCR4 simultan auf Gen- und Proteinebene exprimierten.

#### 4.1.1. Genexpressionsanalyse

Die analysierten DE-Marker wurden mithilfe der angewandten Methode (qPCR) quantifiziert. Die relative Quantifizierung ermöglicht einen direkten Vergleich der Genexpression der untersuchten differenzierten Zellen gegenüber undifferenzierten hiPSCs (Kalibratorzellen). Die relative Quantifizierung gibt somit die x-fache Expression des untersuchten Gens gegenüber undifferenzierten hiPSCs an. Ein Wert größer 1 steht somit für eine stärkere Genexpression, als in der Referenzprobe und Werte kleiner 1 für eine schwächere Genexpression.

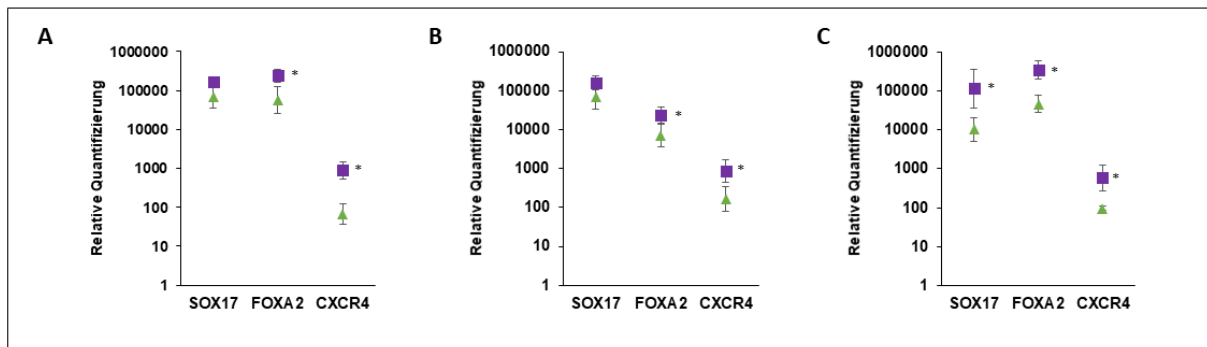
Die DE-Marker SOX17, FOXA2 und CXCR4 lagen in den untersuchten Zellen unterschiedlich stark exprimiert vor. SOX17 und FOXA2 waren gegenüber CXCR4 die am stärksten exprimierten Gene in DE-Zellen. Sie lagen gegenüber undifferenzierten hiPSCs um bis zu 166.307-fach bzw. 349.883-fach höher reguliert vor. CXCR4 wurde hingegen um bis zu maximal 884-fach hochreguliert (Tab.13).

In 3D-differenzierten Zellen lagen die Marker in allen Zelllinien stärker exprimiert vor, als in 2D-differenzierten Zellen. Vergleich man die Genexpression zwischen 2D und 3D, so war in UKKi011-A-differenzierten DE-Zellen die SOX17-Expression in 3D um Faktor 2,48 höher, die FOXA2-Expression um Faktor 4,21 und die CXCR4-Expression um Faktor 12,97 höher, als in 2D (Tab.13). In UKBi005-A unterschied sich die Genexpression zwischen 2D und 3D für SOX17 um das 2,31-fache, für FOXA2 um das 3,29-fache und für CXCR4 um das 5,21-fache (Tab.13). In BIONi010-C gab es für SOX17 einen 11,06-fachen Unterschied zwischen 2D und 3D, für FOXA2 7,51-fach und CXCR4 einen 6,14-fachen Expressionsunterschied (Tab.13).

Tabelle 13: Relative Quantifizierung der SOX17-, FOXA2- und CXCR4-Genexpression in DE-Zellen

Untersuchte Zelllinie	Untersuchtes Gen	Relative Quantifikation	95 % Konfidenzintervall	
		Mittelwert	Unteres Limit	Oberes Limit
UKKi011-A	<b>SOX17</b>			
	2D	66.996,92	35.903,41	125.018,43
	3D	166.307,04	121.007,96	228.563,74
	<b>FOXA2</b>			
	2D	57.170,15	25.945,53	125.972,64
	3D	240.709,16	165.926,99	349.195,15
	<b>CXCR4</b>			
	2D	68,15	36,89	125,90
	3D	884,19	540,60	1446,15
UKBi005-A	<b>SOX17</b>			
	2D	69.430,71	33.060,71	145.811,22
	3D	160.297,75	107.636,14	238.724,36
	<b>FOXA2</b>			
	2D	7.022,03	3.638,70	13.551,26
	3D	23.104,14	14.322,00	37.271,43
	<b>CXCR4</b>			
	2D	162,73	79,19	334,39
	3D	844,96	431,85	1.653,25
BIONI010-C	<b>SOX17</b>			
	2D	10.371,16	5.136,22	20.941,64
	3D	114.714,15	205.496,02	595.721,19
	<b>FOXA2</b>			
	2D	46.534,75	27.804,26	77.883,15
	3D	349.883,31	205.496,02	595.721,19
	<b>CXCR4</b>			
	2D	97,02	85,57	110,01
	3D	596,80	277,75	1.282,35

Die beobachteten Unterschiede variierten also je nach Zelllinie und DE-Marker unterschiedlich stark. Die größten Abweichungen auf Genexpressionsebene zwischen 2D- und 3D-Differenzierung wurden somit in UKKi011-A (CXCR4) und in BIONi010-C (SOX17) bestimmt. Signifikante Unterschiede zwischen 2D und 3D, was bedeutete, dass die ermittelten 95 % Konfidenzintervalle der relativen Quantifizierung sich nicht überschneiden, wurden für FOXA2 und CXCR4 in allen Zelllinien ermittelt und zusätzlich für SOX17 in BIONi010-C (Abb.12).

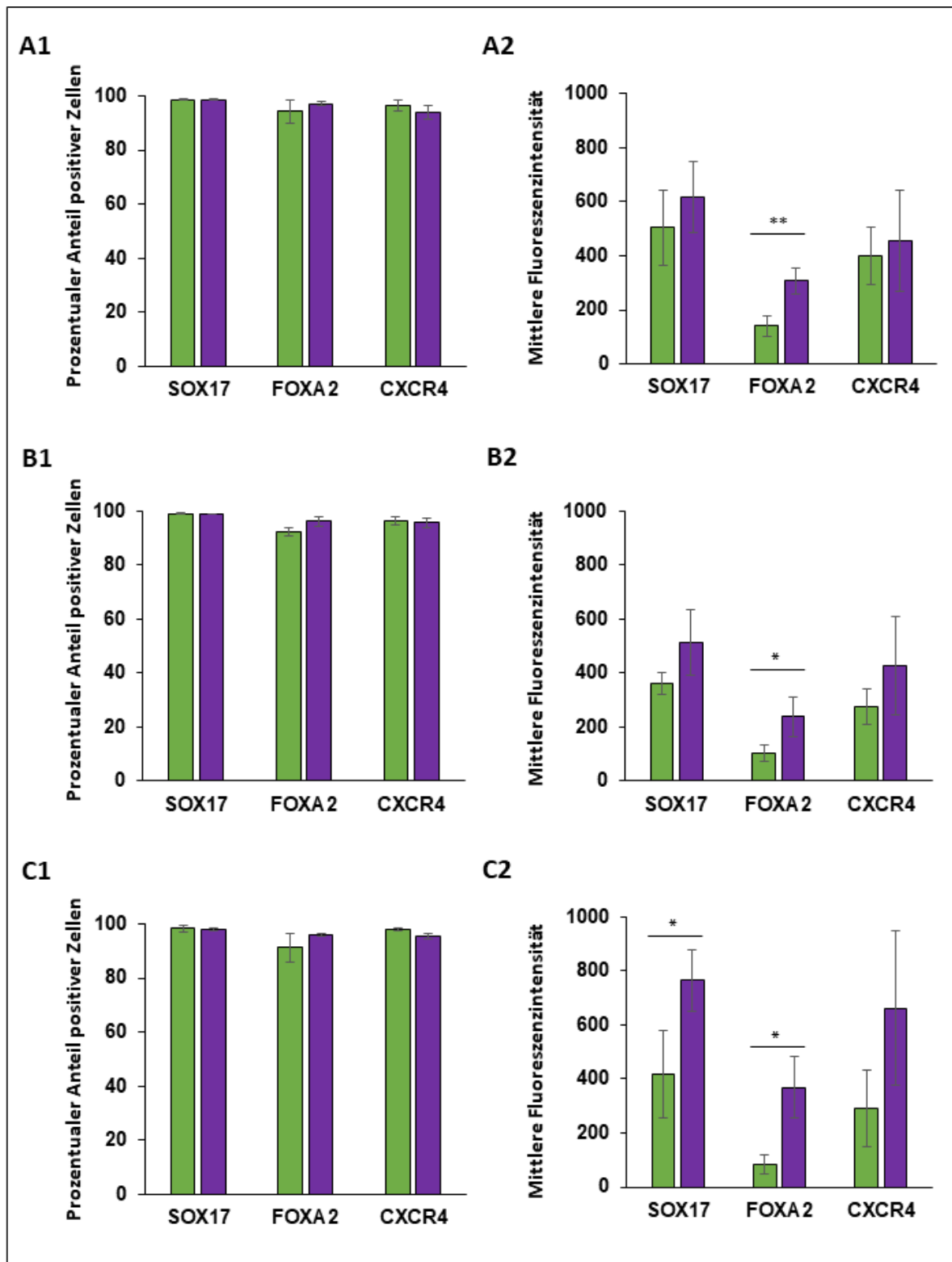


**Abbildung 12: Grafische Darstellung der relativen Quantifizierung von SOX17, FOXA2 und CXCR4 in DE-Zellen an Tag 3.** A: UKKi011-A, B: UKBi005-A, C: BIONi010-C. Grün dargestellt sind 2D-differenzierte DE-Zellen, violett dargestellt sind 3D-differenzierte DE-Zellen. Genexpressionsdiagramme zeigen die y-fache Änderung der Genexpression gegenüber undifferenzierten Kontrollzellen (hiPSCs;  $y=1$ ) des jeweiligen untersuchten Gens. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Konfidenzintervalle 95 %, \* $p<0.05$ , signifikante Abweichung der Messwerte 3D-differenzierter Zellen gegenüber den Messwerten 2D-differenzierter Zellen. Abbildung zu Tab.13.

#### 4.1.2. Proteinexpressionsanalyse

Mithilfe der Durchflusszytometrie konnte der Anteil Marker-positiver Zellen innerhalb einer analysierten Population bestimmt werden. Beide Differenzierungsmethoden resultierten in Zellpopulationen, in welchen mehr als 90 % der analysierten Zellen alle untersuchten DE-Marker auf Proteinebene exprimierten. Hierbei ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen, ob die Zellen unter 2D- oder 3D-Bedingungen differenziert wurden und von welcher Zelllinie sie stammten (Abb.13A1-C1). Hinsichtlich der Anzahl der Antigene in und auf den analysierten Zellen, worüber die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der durchflusszytometrischen Messung Aufschluss gab, konnten für FOXA2 in 3D-differenzierten Zellen signifikant mehr Antigene in allen Zelllinien detektiert werden. Die MFI unterschied sich in UKKi011-A (2D:  $139,93 \pm 36,12$  zu 3D:  $306,67 \pm 45,91$ ) (Abb.13A2), in UKBi005-A (2D:  $102,43 \pm 29,10$  zu 3D:  $237,67 \pm 71,46$ ) (Abb.13B2) und in BIONi010-C (2D:  $84,27 \pm 34,01$  zu 3D:  $368,33 \pm 115,02$ ) (Abb.13C2) jeweils signifikant voneinander. Ebenfalls unterschied sich die MFI von SOX17 in BIONi010-C zwischen 2D und 3D ( $419,00 \pm 161,67$  zu  $763,67 \pm 115,13$ ) (Abb.13C2) signifikant. Bezüglich der Proteinexpressionsintensität von CXCR4, welches zwar auf Genexpressionsebene in 3D-differenzierten

Zellen aller Zelllinien stärker exprimiert vorlag, konnte auf Proteinexpressionsebene kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Anhand der MFI zeigte sich zudem, dass FOXA2 das am schwächsten exprimierte Antigen und SOX17 das am stärksten exprimierte Antigen auf Proteinebene von DE-Zellen zum Analysezeitpunkt war (Abb.13A2-C2).



**Abbildung 13: Proteinexpression von SOX17, FOXA2 und CXCR4 in DE-Zellen an Tag 3.** **A:** UKKi011-A, **B:** UKBi005-A, **C:** BIONi010-C. 1) Prozentualer Anteil positiver Zellen 2) Mittlere Fluoreszenzintensität. Grün dargestellt sind 2D-differenzierte DE-Zellen, violett dargestellt sind 3D-differenzierte DE-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen biologischen Replikaten, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , signifikante Abweichung der Messwerte 3D-differenzierter Zellen gegenüber den Messwerten 2D-differenzierter Zellen. Zweistichproben-t-Test.

## 4.2. Analyse von Anterior Foregut Endoderm (AFE)-Zellen

Aus dem DE geht nachfolgend das AFE hervor, aus welchem sich schließlich auch die Lunge entwickelt. Dieses wird durch die Expression von SOX2 charakterisiert und kennzeichnet mit der Co-Expression von FOXA2 AFE-Zellen. Auch in dieser Analysestufe konnte nachgewiesen werden, dass FOXA2 sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene von 3D-differenzierten AFE-Zellen stärker exprimiert wurde, als von 2D-differenzierten Zellen.

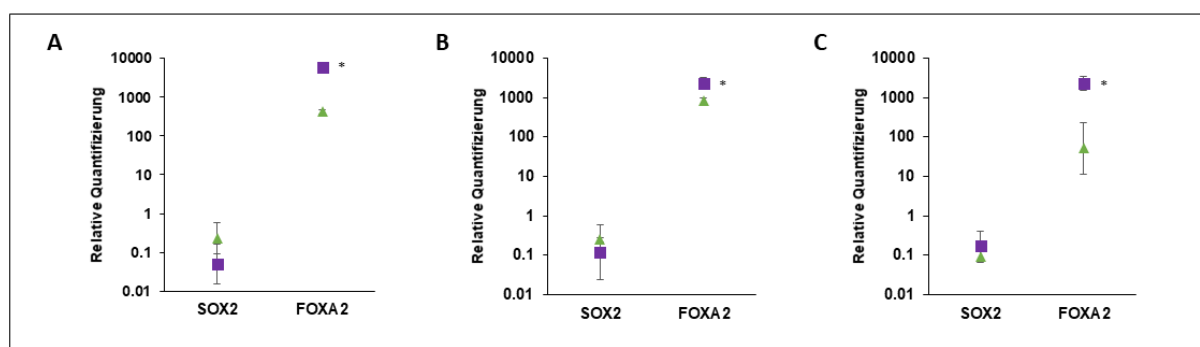
### 4.2.1. Genexpressionsanalyse

FOXA2 wurde auf Genexpressionsebene in AFE-Zellen deutlich geringer exprimiert, als in DE-Zellen. Lag der Wert in diesen noch bei maximal 349.883-facher Expression (Tab.13), lag er nunmehr bei maximal 5.891-facher Expression (Tab.14). Dies entsprach einem 59,39-fachen Expressionsunterschied. Verglich man die FOXA2-Expression innerhalb der AFE-Stufe zwischen 2D und 3D, unterschied sie sich in UKKi011-A um das 13,89-fache (Tab.14), in UKBi005-A um das 2,78-fache (Tab.14) und in BIONi010-C um das 44,37-fache voneinander (Tab.14). Die Unterschiede in der FOXA2-Genexpression zwischen 2D- und 3D-Differenzierung waren in jeder Zelllinie signifikant (Abb.14). Tab.14 zeigt außerdem, dass die SOX2-Genexpression in AFE-Zellen im Vergleich zu undifferenzierten Stammzellen, die diesen Marker durch ihre Reprogrammierung überexprimieren, geringer ausfiel. So lag in UKKi011-A SOX2 in 2D-differenzierten AFE-Zellen 4,2-fach und in 3D-differenzierten AFE-Zellen 20-fach geringer exprimiert vor, als in undifferenzierten hiPSCs. In UKBi005-A war SOX2 in 2D 2-fach und in 3D 8,3-fach und in BIONi010-C in 2D 10-fach und in 3D 5,9-fach schwächer exprimiert, als in den Kalibratorzellen. Verglich man die Genexpression zwischen 2D- und 3D-Differenzierung, wurde SOX2 in UKKi011-A und UKBi005-A in 2D-differenzierten Zellen um das 4,80-fache bzw. 2,08-fache (Tab.14) stärker exprimiert, als in 3D-differenzierten AFE-Zellen. In BIONi010-C war es mit einem 1,7-fachen Unterschied zwischen 2D und 3D umgekehrt. In keiner der Zelllinien fielen die beobachteten Unterschiede in der SOX2-Expression zwischen 2D- und 3D-Differenzierung signifikant aus (Abb.14).



Tabelle 14: Relative Quantifizierung der SOX2- und FOXA2-Genexpression in AFE-Zellen

Untersuchte Zelllinie	Untersuchtes Gen	Relative Quantifikation	95 % Konfidenzintervall	
		Mittelwert	Unteres Limit	Oberes Limit
UKKi011-A	<b>SOX2</b>			
	2D	0,24	0,09	0,60
	3D	0,05	0,02	0,17
	<b>FOXA2</b>			
	2D	424,67	376,66	478,80
	3D	5.891,99	4.569,77	7.596,78
UKBi005-A	<b>SOX2</b>			
	2D	0,25	0,22	0,29
	3D	0,12	0,02	0,59
	<b>FOXA2</b>			
	2D	811,51	666,82	987,60
	3D	2.252,31	1.607,58	3.155,61
BIONi010-C	<b>SOX2</b>			
	2D	0,10	0,07	0,14
	3D	0,17	0,07	0,41
	<b>FOXA2</b>			
	2D	51,24	11,53	227,67
	3D	2.263,81	1.498,07	3.420,98

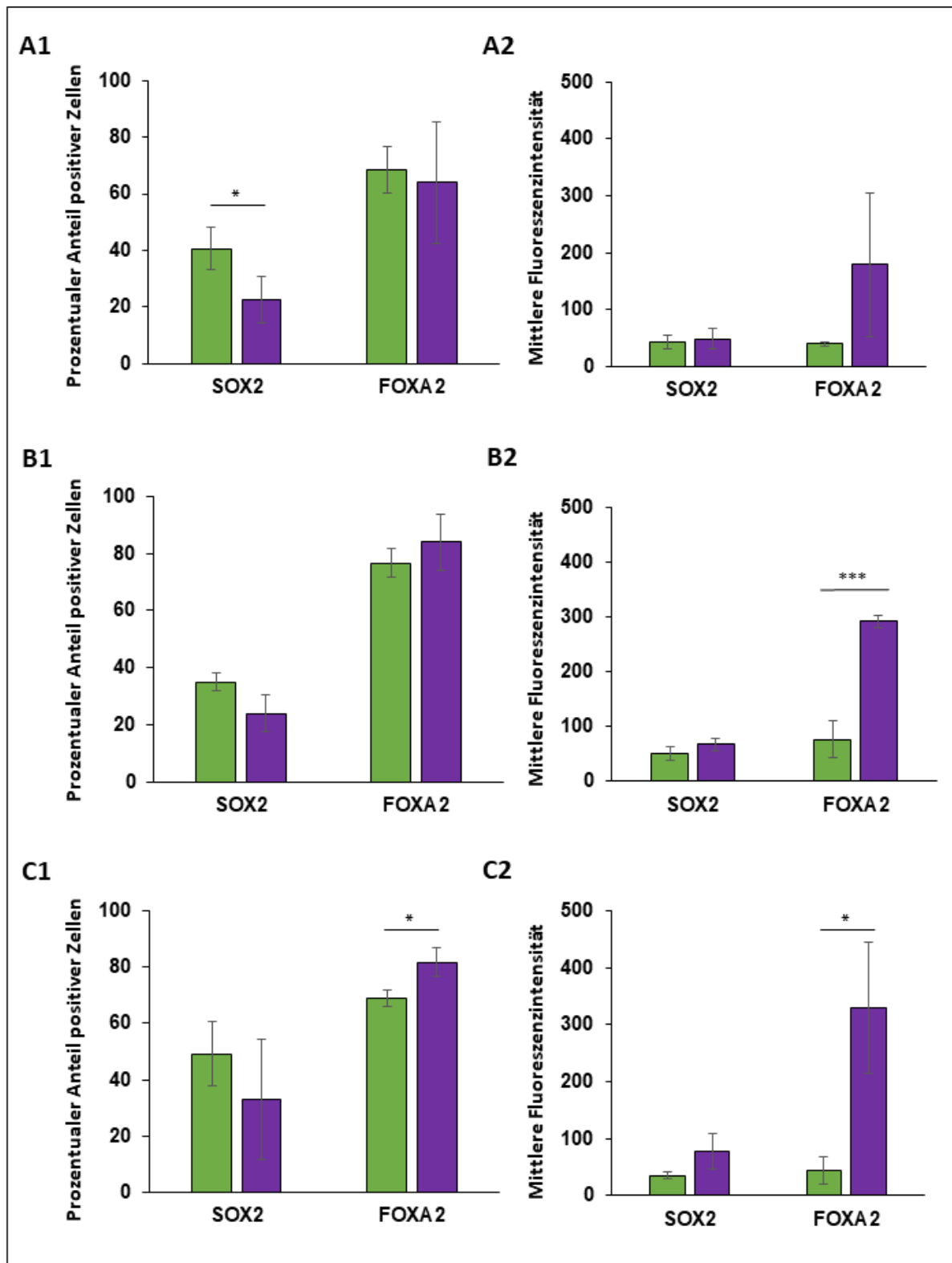


**Abbildung 14: Grafische Darstellung der relativen Quantifizierung von SOX2 und FOXA2 in AFE-Zellen an Tag 7.** **A:** UKKi011-A, **B:** UKBi005-A, **C:** BIONi010-C. Grün dargestellt sind 2D-differenzierte AFE-Zellen, violett dargestellt sind 3D-differenzierte AFE-Zellen. Genexpressionsdiagramme zeigen die y-fache Änderung der Genexpression gegenüber undifferenzierten Kontrollzellen (hiPSCs;  $y=1$ ) des jeweiligen untersuchten Gens. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Konfidenzintervalle 95 %, \* $p<0.05$ , signifikante Abweichung der Messwerte 3D-differenzierter Zellen gegenüber den Messwerten 2D-differenzierter Zellen. Abbildung zu Tab.14.

#### 4.2.2. Proteinexpressionsanalyse

Weniger als die Hälfte der analysierten AFE-Zellen exprimierten SOX2 auf Proteinebene. FOXA2 hingegen wurde von mehr AFE-Zellen exprimiert, als SOX2, jedoch von weniger Zellen, als noch in der vorherigen Differenzierungsstufe. Da  $40,73 \pm 7,50$  % 2D-differenzierter und  $22,73 \pm 8,09$  % 3D-differenzierter UKKi011-A-Zellen SOX2 exprimierten, ergab sich zwischen der 2D- und 3D-Differenzierung ein signifikanter Unterschied bezüglich der SOX2-Proteinexpression in UKKi011-A (Abb.15A1). Verglich man diesbezüglich die Mittelwerte von UKBi005-A und BIONi010-C miteinander, bestätigte sich die Beobachtung, dass SOX2 von mehr 2D- als 3D-differenzierten Zellen exprimiert wurde auch in diesen Zelllinien, die Unterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant (Abb.15B1-C1).

Die Anzahl FOXA2-positiver Zellen unterschied sich hingegen in BIONi010-C signifikant (2D:  $68,83 \pm 2,89$  %, 3D:  $81,79 \pm 5,28$  %) (Abb.15C1), nicht jedoch in UKKi011-A und UKBi005-A (Abb.15A1-B1). Hinsichtlich der MFI wurde deutlich, dass die 3D-differenzierten Zellen in dieser Stufe mehr Antigene für FOXA2 aufwiesen, als 2D-differenzierte Zellen. Dieser beobachtete Unterschied wurde als signifikant für UKBi005-A (2D:  $77,07 \pm 34,04$ , 3D:  $292,67 \pm 12,12$ ) (Abb.15B2) und BIONi010-C (2D:  $43,23 \pm 24,17$ , 3D:  $329,00 \pm 115,13$ ) (Abb.15C2) bestimmt. Die MFI für SOX2 waren bei 2D- und 3D-differenzierten AFE-Zellen vergleichbar, weshalb der zuvor benannte signifikante Unterschied von mehr SOX2-positiven UKKi011-A-Zellen in 2D darauf schließen lässt, dass die weniger detektierten SOX2-positiven Zellen in 3D mehr Antigene für SOX2 aufweisen mussten, da sich andernfalls eine signifikant höhere MFI in 2D gezeigt hätte (Abb.15A2-C2).



**Abbildung 15: Proteinexpression von SOX2 und FOXA2 in AFE-Zellen an Tag 7.** **A** UKKi011-A, **B**: UKBi005-A, **C**: BIONi010-C. 1) Prozentualer Anteil positiver Zellen 2) Mittlere Fluoreszenzintensität. Grün dargestellt sind 2D-differenzierte AFE-Zellen, violett dargestellt sind 3D-differenzierte AFE-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen biologischen Replikaten, \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , signifikante Abweichung der Messwerte 3D-differenzierter Zellen gegenüber den Messwerten 2D-differenzierter Zellen. Zweistichproben-t-Test.

### **4.3. Analyse von Lung Progenitor (LP)-Zellen**

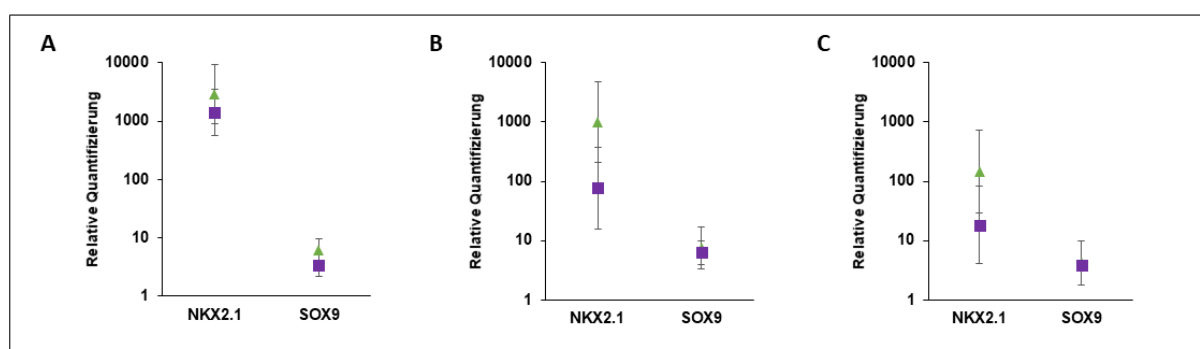
Aus der ventralen Achse des AFE formt sich die Organanlage der Lunge, wo NKX2.1<sup>+</sup>-Zellen, aus welchen distale, SOX9<sup>+</sup>-Epithelvorläuferzellen entstehen, vorzufinden sind. 2D- und 3D-differenzierte LP-Zellen wurden auf die Expression dieser Marker hin untersucht. Auf Genebene wurde deutlich, dass NKX2.1 stärker als SOX9 von LP-Zellen zum Analysezeitpunkt exprimiert wird. Auf Proteinebene wurde SOX9 als das stärker exprimierte Antigen auf LP-Zellen bestimmt.

#### **4.3.1. Genexpressionsanalyse**

Auf Genexpressionsebene wurde deutlich, dass NKX2.1 stärker als SOX9 von LP-Zellen exprimiert wird. Hinsichtlich der NKX2.1-Genexpression zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Zelllinien aus drei unterschiedlichen gesunden Spendern. Von UKKi011-A wurde NKX2.1 am stärksten, um 2.884,36-fach stärker als in der undifferenzierten Kontrollprobe exprimiert (Tab.15). In den beiden anderen Zelllinien lag der frühe Lungenmarker in 2D-differenzierten Zellen mit einer 999,85-fachen bzw. 148,07-fachen Genexpression und in 3D-differenzierten Zellen mit einer 76,47-fachen und 18,20-fachen Genexpression deutlich geringer exprimiert vor (Tab.15). Der daraus resultierende Unterschied, dass NKX2.1 in 2D stärker exprimiert wurde, war jedoch nicht statistisch signifikant. Die SOX9-Expression auf Genexpressionsebene unterschied sich zwischen 2D- und 3D-differenzierten Zellen nicht voneinander und lag bei allen untersuchten Zelllinien unterhalb einer 10-fach erhöhten Genexpression im Vergleich zur undifferenzierten Kontrolle (Abb.16).

Tabelle 15: Relative Quantifizierung der NKX2.1- und SOX9-Genexpression in LP-Zellen

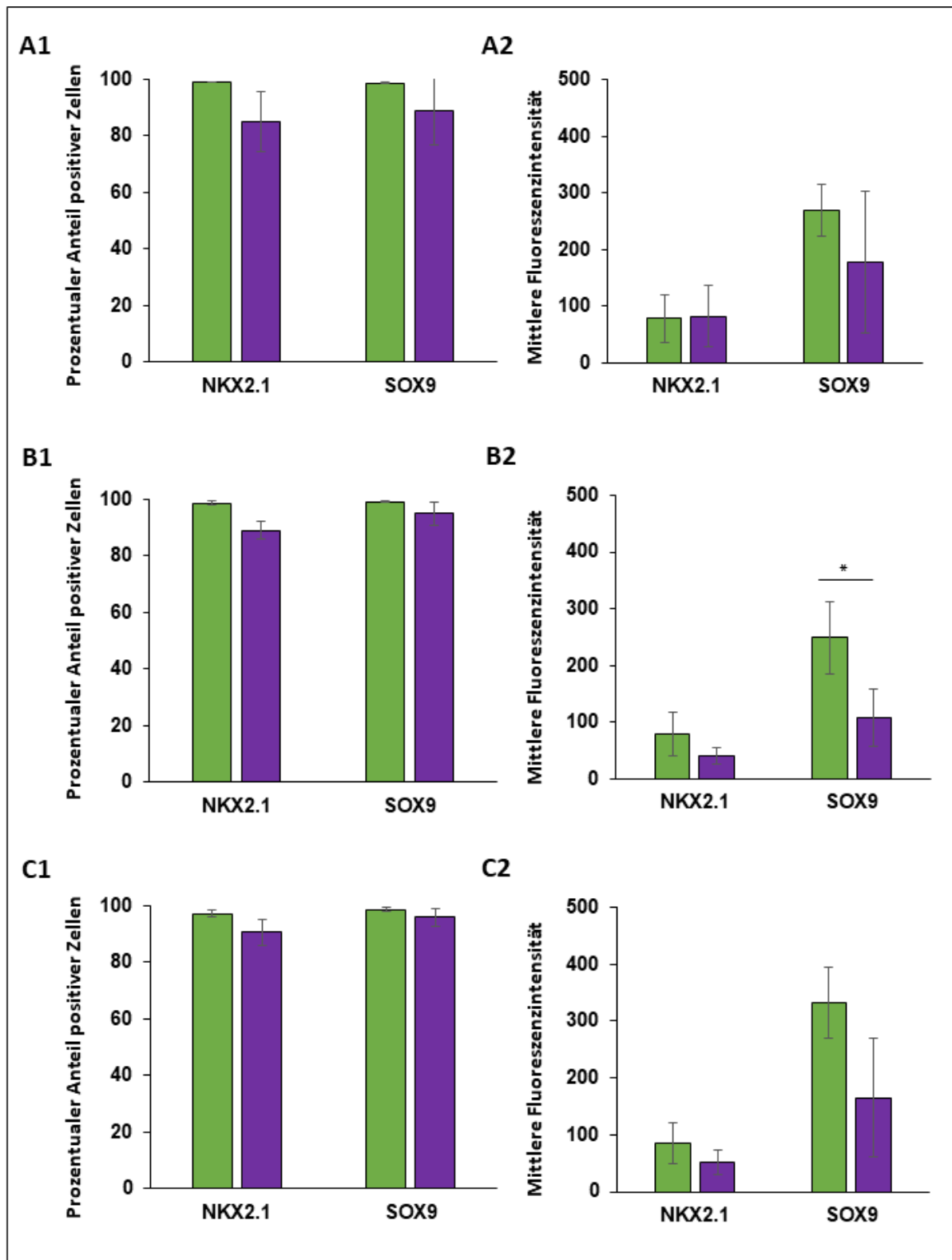
Untersuchte Zelllinie	Untersuchtes Gen	Relative Quantifikation	95 % Konfidenzintervall	
		Mittelwert	Unteres Limit	Oberes Limit
UKKi011-A	<b>NKX2.1</b>			
	2D	2.884,36	904,10	9.201,97
	3D	1.412,91	566,12	3.526,30
	<b>SOX9</b>			
	2D	6,11	3,95	9,44
	3D	3,33	2,19	5,05
UKBi005-A	<b>NKX2.1</b>			
	2D	999,85	206,10	4.850,62
	3D	76,47	15,51	377,17
	<b>SOX9</b>			
	2D	7,43	3,28	16,79
	3D	6,31	4,00	9,97
BIONi010-C	<b>NKX2.1</b>			
	2D	148,07	29,51	742,88
	3D	18,20	4,03	82,10
	<b>SOX9</b>			
	2D	4,13	1,76	9,68
	3D	3,81	3,25	4,45



**Abbildung 16: Grafische Darstellung der relativen Quantifizierung von NKX2.1 und SOX9 in LP-Zellen an Tag 16.** **A:** UKKi011-A, **B:** UKBi005-A, **C:** BIONi010-C. Grün dargestellt sind 2D-differenzierte LP-Zellen, violett dargestellt sind 3D-differenzierte LP-Zellen. Genexpressionsdiagramme zeigen die y-fache Änderung der Genexpression gegenüber undifferenzierten Kontrollzellen (hiPSCs;  $y=1$ ) des jeweiligen untersuchten Gens. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Konfidenzintervalle 95 %, \* $p<0.05$ , signifikante Abweichung der Messwerte 3D-differenzierter Zellen gegenüber den Messwerten 2D-differenzierter Zellen. Abbildung zu Tab.15.

### 4.3.2. Proteinexpressionsanalyse

Der prozentuale Anteil der Zellen, der in der analysierten Population als positiv für eine NKX2.1- oder SOX9-Expression bestimmt wurde, unterschied sich zwischen beiden Differenzierungsmethoden nicht signifikant voneinander. Unter 2D-Differenzierungsbedingungen konnten Zellpopulationen generiert werden, die zu mindestens 97,09 % NKX2.1<sup>+</sup> waren und zu mindestens 98,66 % SOX9<sup>+</sup>. In 3D waren die generierten Zellen zu mindestens 84,97 % NKX2.1<sup>+</sup> und zu mindestens 89,06 % SOX9<sup>+</sup> (Abb.17A1-C1). Somit eigneten sich beide Differenzierungsmethoden, nahezu homogene Zellpopulationen zu generieren, die die beiden Lungen-vorläufermarker auf Proteinebene exprimierten. Die MFI zeigten zudem, dass die analysierten LP-Zellen mehr Antigene für SOX9 aufwiesen, als für NKX2.1 (Abb.17A2-C2). Ein signifikanter Unterschied der Fluoreszenzintensität von SOX9 wurde in der Zelllinie UKBi005-A festgestellt, wo sie in 2D-differenzierten Zellen im Vergleich zu 3D-differenzierten Zellen um 2,29-fach (2D:  $249,00 \pm 63,01$ , 3D:  $108,50 \pm 51,27$ ) erhöht war (Abb.17B2). Dieser Unterschied zeichnete sich auch in den beiden anderen untersuchten Zelllinien tendenziell ab, war jedoch nicht statistisch signifikant. Signifikante Unterschiede in der Fluoreszenzintensität von NKX2.1 zwischen 2D- und 3D-differenzierten LP-Zellen konnten ebenfalls nicht festgestellt werden.



**Abbildung 17: Proteinexpression von NKX2.1 und SOX9 in LP-Zellen an Tag 16.** A: UKKi011-A, B: UKBi005-A, C: BIONi010-C. 1) Prozentualer Anteil positiver Zellen 2) Mittlere Fluoreszenzintensität. Grün dargestellt sind 2D-differenzierte LP-Zellen, violett dargestellt sind 3D-differenzierte LP-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen biologischen Replikaten, \*  $p < 0,05$ , signifikante Abweichung der Messwerte 3D-differenzierter Zellen gegenüber den Messwerten 2D-differenzierter Zellen. Zweistichproben-t-Test.

#### 4.4. Analyse von Alveolaren Epithelzellen Typ 2 (AT2)

SOX9-positive Zellen entwickeln sich zu distalen Epithelzellen, AT2, welche in dieser Arbeit zu zwei verschiedenen Zeitpunkten analysiert wurden, da diese Stufe mit 14 Tagen, die längste aller Differenzierungsphasen darstellte. Es wurden Marker ausgewählt, die AT2-Zellen spezifisch nachweisen, wie die Surfactantproteine-C, -B und -D, als auch Marker, die für die weitere Anwendung der Zellen eine bedeutende Rolle spielen, wie CFTR, das bei auftretenden Mutationen und fehlerhafter Funktionsweise die Krankheit CF auslöst. Daher wurden ab dieser Differenzierungsstufe zwei zusätzliche hiPS-Zelllinien (BIONi010-C-O16 und DYP0250) differenziert und analysiert, die in ihrem Erbgut die häufigste CF-Mutation, F508del, tragen und somit potentielle Zelllinien für CF-Krankheitsmodelle darstellen. AT2 wurden zudem kürzlich als Zielzellen von SARS-CoV-2 identifiziert, da sie die Membranrezeptoren ACE2 und TMPRSS2 exprimieren. Aus diesem Grund wurden sie ebenfalls als typische Merkmale von AT2 festgelegt und analysiert.

##### 4.4.1. Genexpressionsanalyse

Zu den beiden Analysezeitpunkten an Tag 23 und 30, wurden die sechs definierten AT2-Marker auf Genexpressionsebene in 2D- und 3D-differenzierten Zellen nachgewiesen. Zusätzlich wurden die Marker in humaner adulter Lungen-RNA quantifiziert, um Referenzwerte zur ausgereiften Lunge zu erhalten. Die Expressionsstärke einiger Marker unterschied sich zwischen den beiden Analysezeitpunkten und den Differenzierungsmethoden. So stieg die Genexpression von SP-C und SP-B von Tag 23 zu 30 stark an, während SP-D und ACE2 stagnierten oder nur leicht anstiegen. CFTR und TMPRSS2 hingegen waren an Tag 23 höher exprimiert, als an Tag 30. Zum früheren Analysezeitpunkt, an Tag 23 der alveolaren Differenzierung, war SP-C in 2D-differenzierten AT2 aus UKKi011 A 19,18-fach stärker exprimiert, als in 3D-differenzierten AT2 (Tab.16). Bei der Zelllinie DYP0250 war SP-C in 3D-differenzierten AT2 stärker exprimiert, alle anderen 2D- und 3D-differenzierten Zelllinien unterschieden sich hinsichtlich ihrer SP-C-Genexpression nicht signifikant voneinander (Tab.16). Ein weiteres Surfactantprotein, SP-B, war in zwei 2D-differenzierten Zelllinien, UKKi011 A und UKBi005 A, signifikant um das 124,60-fache bzw. 7,99-fache (Tab.16) im Vergleich zu 3D-differenzierten AT2 aus denselben Zelllinien erhöht. Die SP-D-Genexpression unterschied sich an Tag 23 und 30 in keiner der analysierten Zelllinien zwischen 2D- und 3D-Differenzierung signifikant (Abb.18+19). CFTR wurde an Tag 23 stets in 3D-differenzierten AT2 höher exprimiert, als in 2D-differenzierten Zellen (Abb.18). So unterschied sich die Genexpression von CFTR in 3D- gegenüber 2D-differenzierten AT2 in UKKi011 A um das 47,66-fache, in BIONi010-C um das 84,38-fache, in BIONi010 C-O16 um das 31,19-fache und in DYP0250 um das 12,18-fache (Tab.16). In diesen vier der fünf untersuchten Zelllinien waren die genannten Genexpressionsunterschiede statistisch signifikant (Abb.18A-E). In der fünften Zelllinie,



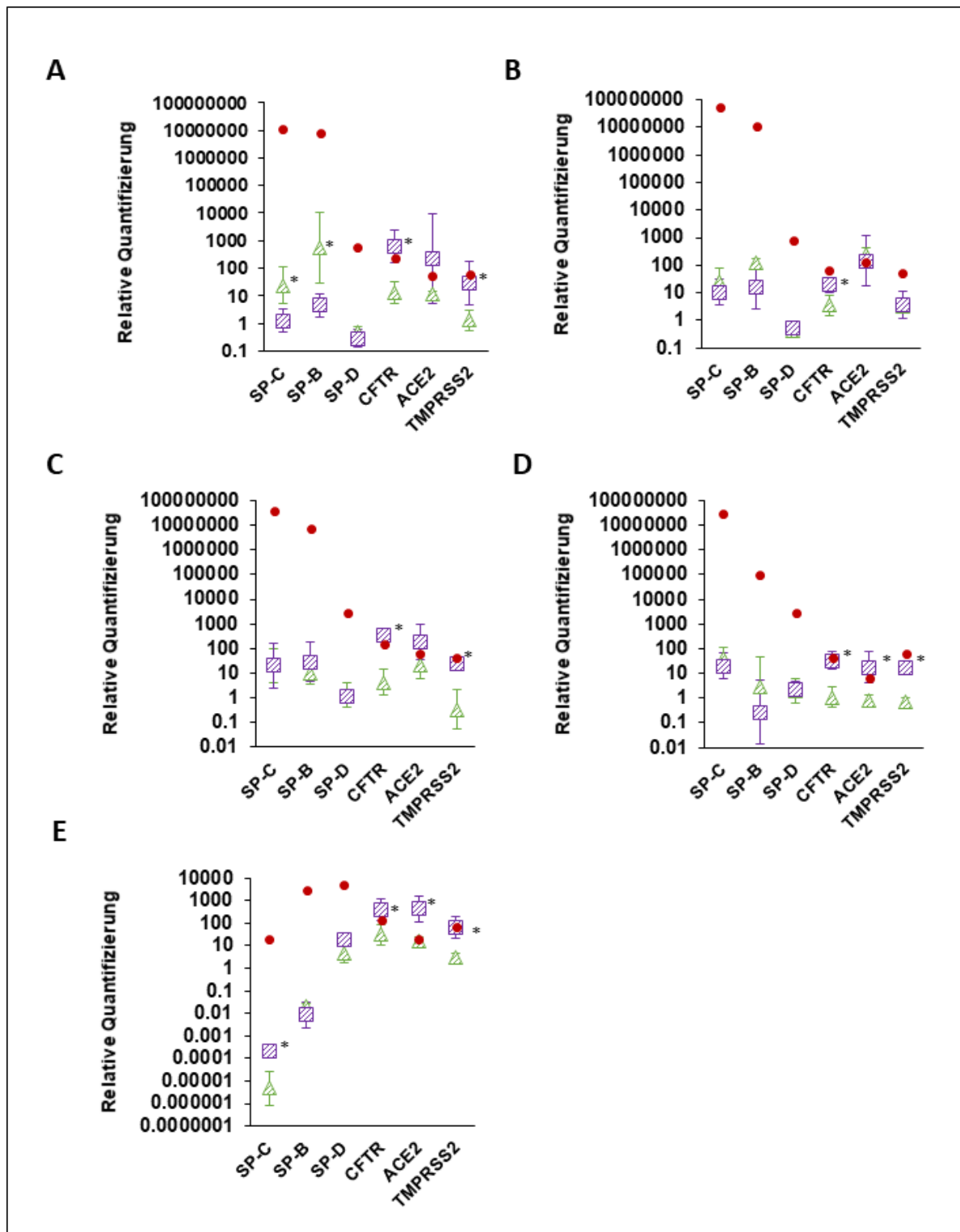
UKBi005-A, war der 5,61-fache Expressionsunterschied von CFTR zwischen 2D und 3D nicht signifikant (Tab.16). Auch an Tag 30 wurde CFTR in 3D-differenzierten Zellen stets stärker exprimiert (Abb.18). Die 121,05-fache Expression in UKKi011-A und die 35,52-fache Expression in BIONi010-C-O16 unterschied sich jeweils signifikant gegenüber der CFTR-Expression in 2D-differenzierten AT2 (Abb.19A+D). ACE2 wurde ebenfalls von 3D-differenzierten AT2 an Tag 23 aus vier von fünf untersuchten Zelllinien signifikant stärker exprimiert (Abb.18). Aus UKKi011-A 3D-differenzierte AT2 exprimierten ACE2 18,65-fach stärker, als 2D-differenzierte AT2 (Tab.16). Bei BIONi010-C war ein 9,23-facher Unterschied zu verzeichnen, bei BIONi010-C-O16 ein 22,18-facher und bei DYP0250 ein 25,06-facher Unterschied (Tab.16). Eine der fünf differenzierten Zelllinien exprimierte ACE2 in 2D hingegen stärker als in 3D (UKBi005 A, 1,82-fach höher in 2D) (Tab.16). An Tag 30 wurde ACE2 von nur noch zwei 3D-differenzierten Zelllinien signifikant stärker exprimiert. In UKKi011-A lag ein 87,55-facher ACE2-Expressionsunterschied zwischen 2D- und 3D-differenzierten Zellen vor und in BIONi010-C-O16 ein 9,56-facher Unterschied (Tab.17). Vier von fünf 3D-differenzierten Zelllinien exprimierten TMPRSS2 an Tag 23 signifikant stärker (Abb.18). So war in UKKi011-A ein 22,44-facher Expressionsunterschied zwischen 2D und 3D zu verzeichnen, in BIONi010-C war TMPRSS2 67,32-fach, in BIONi010-C-O16 24,99-fach und in DYP0250 20,84-fach stärker in 3D exprimiert (Tab.16), als in 2D-differenzierten Zellen. An Tag 30 unterschied sich die Genexpression von TMPRSS2 zwischen 2D- und 3D-Differenzierung in nur noch zwei Zelllinien signifikant: In UKKi011-A lag ein 148,18-facher und in BIONi010-C ein 30,06-facher Expressionsunterschied vor (Tab.17). Nur an Tag 23 wurde beobachtet, dass zwei Marker in 2D höher exprimiert wurden: SP-B in UKKi011-A und UKBi005-A und SP-C in UKKi011-A (Abb.17A+B). An Tag 30 wurde keiner der analysierten Marker in 2D-differenzierten Zellen höher exprimiert, als in 3D-differenzierten Zellen (Abb.18). Verglichen zur adulten humanen Lunge, die als Referenz herangezogen wurde, konnten sehr große Unterschiede in der Genexpression der Surfactantproteine festgestellt werden. Sie lagen in der adulten Lunge etwa 200.000-fach höher exprimiert vor, als in 2D- und 3D-differenzierten AT2 aus hiPSCs. CFTR, ACE2 und TMPRSS2 hingegen lagen in differenzierten AT2 auf einem vergleichbaren Niveau zur adulten Lunge (Abb.18+19).

Tabelle 16: Relative Quantifizierung der Genexpression in AT2 an Tag 23

<i>Untersuchte Zelllinie</i>	<i>Untersuchtes Gen</i>	<i>Relative Quantifikation</i>		
		<i>Mittelwert</i>	<i>Unteres Limit</i>	<i>Oberes Limit</i>
<b>UKKi011-A</b>	<b>SP-C</b>			
	2D	23,98	5,08	113,23
	3D	1,25	0,47	12,05
	<b>SP-B</b>			
	2D	569,44	30,06	10.788,58
	3D	4,57	1,73	12,05
	<b>SP-D</b>			
	2D	0,46	0,27	0,79
	3D	0,29	0,14	0,61
	<b>CFTR</b>			
	2D	12,61	5,07	31,39
	3D	601,35	157,77	2.292,04
	<b>ACE2</b>			
	2D	12,01	10,00	14,42
3D	223,94	5,10	9.824,54	
<b>TMPRSS2</b>				
2D	1,28	0,56	2,94	
3D	28,72	4,69	175,88	
<b>UKBi005-A</b>	<b>SP-C</b>			
	2D	24,90	7,73	80,19
	3D	10,50	3,62	30,43
	<b>SP-B</b>			
	2D	123,61	84,68	180,45
	3D	15,48	2,47	96,96
	<b>SP-D</b>			
	2D	0,44	0,23	0,84
	3D	0,55	0,39	0,76
	<b>CFTR</b>			
	2D	3,47	1,51	7,97
	3D	19,49	10,21	37,20
	<b>ACE2</b>			
	2D	256,53	161,89	406,48
3D	140,63	17,09	1.157,46	
<b>TMPRSS2</b>				
2D	3,41	2,62	4,43	
3D	3,73	1,17	11,94	

<i>Untersuchte Zelllinie</i>	<i>Untersuchtes Gen</i>	<i>Relative Quantifikation</i>	<i>95 % Konfidenzintervall</i>	
		<i>Mittelwert</i>	<i>Unteres Limit</i>	<i>Oberes Limit</i>
<b>BIONi010-C</b>	<b>SP-C</b>			
	2D	20,61	4,20	101,03
	3D	20,19	2,53	161,18
	<b>SP-B</b>			
	2D	10,47	3,57	30,73
	3D	28,73	4,40	187,61
	<b>SP-D</b>			
	2D	1,34	0,41	4,34
	3D	1,17	0,86	1,58
	<b>CFTR</b>			
	2D	4,34	1,28	14,68
	3D	366,22	223,84	599,17
	<b>ACE2</b>			
	2D	20,26	6,06	67,73
3D	187,09	36,88	949,20	
<b>TMPRSS2</b>				
2D	0,34	0,06	2,08	
3D	22,89	17,10	30,65	
<b>BIONi010-C-O16</b>	<b>SP-C</b>			
	2D	39,15	14,30	107,21
	3D	19,85	5,81	67,83
	<b>SP-B</b>			
	2D	2,74	0,16	46,24
	3D	0,26	0,01	5,12
	<b>SP-D</b>			
	2D	1,88	0,61	5,80
	3D	2,23	1,09	4,56
	<b>CFTR</b>			
	2D	1,08	0,43	2,72
	3D	33,69	14,16	80,18
	<b>ACE2</b>			
	2D	0,80	0,46	1,39
3D	17,74	4,08	77,14	
<b>TMPRSS2</b>				
2D	0,70	0,47	1,04	
3D	17,49	9,62	31,83	

<b>Untersuchte Zelllinie</b>	<b>Untersuchtes Gen</b>	<b>Relative Quantifikation</b>	<b>95 % Konfidenzintervall</b>	
		<i>Mittelwert</i>	<i>Unteres Limit</i>	<i>Oberes Limit</i>
<b>DYP0250</b>	<b>SP-C</b>			
	2D	4,63 x 10 <sup>-6</sup>	8,22 x 10 <sup>-7</sup>	2,61 x 10 <sup>-5</sup>
	3D	2,16 x 10 <sup>-4</sup>	1,56 x 10 <sup>-4</sup>	2,99 x 10 <sup>-4</sup>
	<b>SP-B</b>			
	2D	2,10 x 10 <sup>-2</sup>	1,72 x 10 <sup>-2</sup>	2,55 x 10 <sup>-2</sup>
	3D	8,92 x 10 <sup>-3</sup>	2,39 x 10 <sup>-3</sup>	3,34 x 10 <sup>-2</sup>
	<b>SP-D</b>			
	2D	4,45	1,73	11,44
	3D	17,76	9,25	34,08
	<b>CFTR</b>			
	2D	30,22	10,57	86,37
	3D	368,12	121,90	1.111,63
	<b>ACE2</b>			
	2D	17,13	11,24	26,10
	3D	429,27	109,95	1.676,02
	<b>TMPRSS2</b>			
	2D	3,10	2,13	4,52
	3D	64,61	21,58	193,45



**Abbildung 18: Grafische Darstellung der relativen Quantifizierung von SP-C, SP-B, SP-D, CFTR, ACE2 und TMPRSS2 in AT2 an Tag 23 aus gesunden und F508del-hiPS-Zelllinien. A:** UKKi011-A, **B:** UKBi005-A, **C:** BIONI010-C, **D:** BIONI010-C-016, **E:** DYP0250. Grün schraffiert dargestellt sind 2D-differenzierte AT2, violett schraffiert dargestellt sind 3D-differenzierte AT2. Genexpressionsdiagramme zeigen die y-fache Änderung der Genexpression gegenüber undifferenzierten Kontrollzellen (hiPSCs;  $y=1$ ) des jeweiligen untersuchten Gens. Rote Punkte zeigen die jeweilige Genexpression in adulter humaner Lunge. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Konfidenzintervalle 95 %, \* $p < 0.05$ , signifikante Abweichung der Messwerte 3D-differenzierter Zellen gegenüber den Messwerten 2D-differenzierter Zellen. Abbildung zu Tab.16.

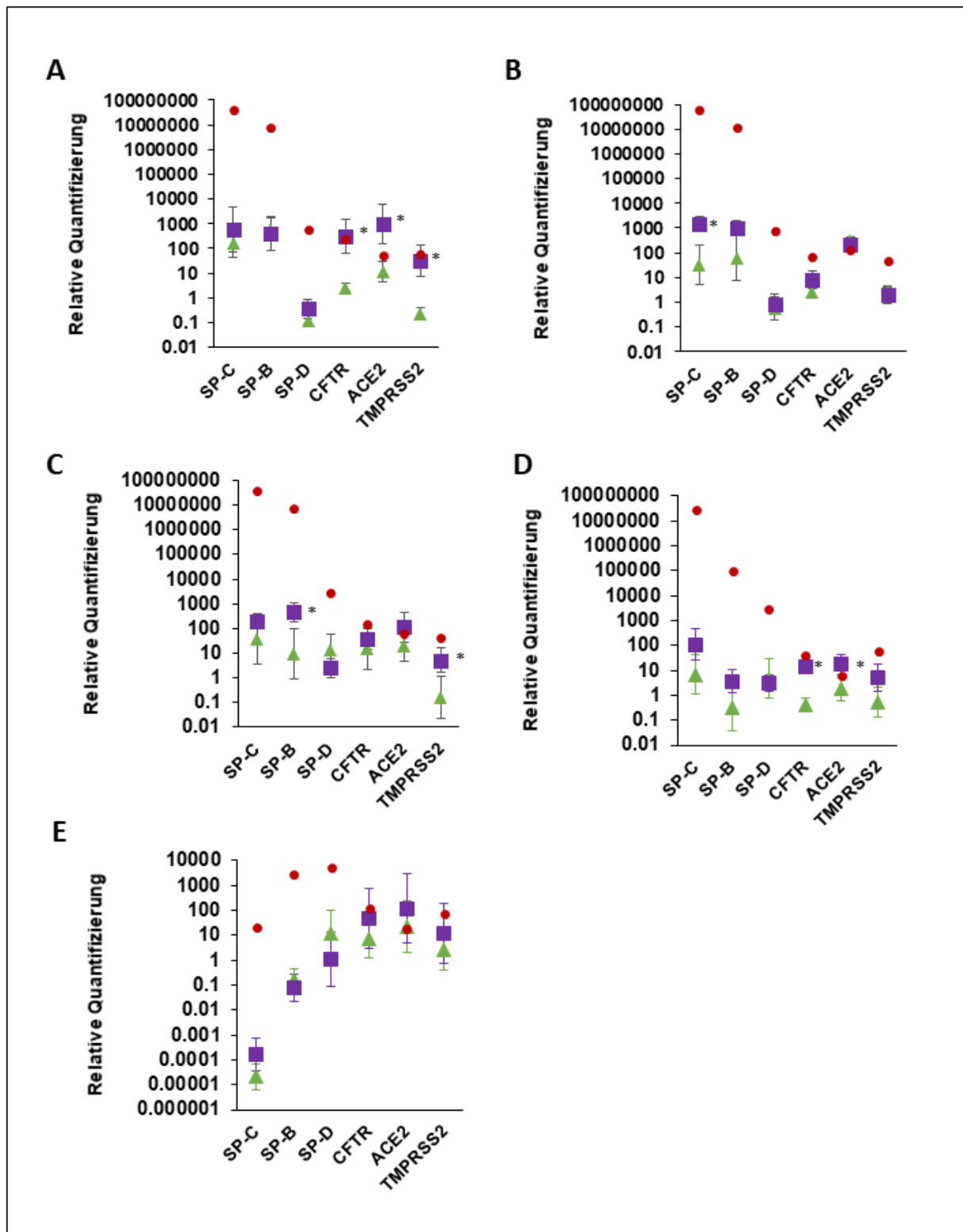
Tabelle 17: Relative Quantifizierung der Genexpression in AT2 an Tag 30

Untersuchte Zelllinie	Untersuchtes Gen	Relative Quantifikation		
		Mittelwert	Unteres Limit	Oberes Limit
UKKi011-A	<b>SP-C</b>			
	2D	160,21	44,69	574,30
	3D	553,34	69,18	4.425,82
	<b>SP-B</b>			
	2D	614,01	190,75	1.976,47
	3D	382,92	80,96	1.811,20
	<b>SP-D</b>			
	2D	0,12	0,08	0,18
	3D	0,35	0,15	0,83
	<b>CFTR</b>			
	2D	2,57	1,75	3,75
	3D	311,11	66,51	1.455,22
	<b>ACE2</b>			
	2D	11,51	4,62	28,72
3D	1.007,70	159,84	6.353,08	
<b>TMPRSS2</b>				
2D	0,22	0,12	0,42	
3D	32,60	7,60	139,91	
UKBi005-A	<b>SP-C</b>			
	2D	31,57	5,11	195,21
	3D	1.434,32	709,98	2.897,67
	<b>SP-B</b>			
	2D	61,36	7,74	486,54
	3D	1.004,71	536,14	1.882,78
	<b>SP-D</b>			
	2D	0,55	0,18	1,62
	3D	0,81	0,30	2,18
	<b>CFTR</b>			
	2D	2,64	1,64	4,24
	3D	8,33	3,59	19,35
	<b>ACE2</b>			
	2D	333,41	243,57	456,39
3D	224,82	205,27	246,23	
<b>TMPRSS2</b>				
2D	2,96	2,22	3,94	
3D	2,02	0,92	4,42	

Untersuchte Zelllinie	Untersuchtes Gen	Relative Quantifikation	95 % Konfidenzintervall	
		Mittelwert	Unteres Limit	Oberes Limit
BIONI010-C	<b>SP-C</b>			
	2D	38,11	3,47	418,26
	3D	201,06	97,87	1.170,46
	<b>SP-B</b>			
	2D	9,19	0,90	94,04
	3D	470,61	189,22	1.170,46
	<b>SP-D</b>			
	2D	13,97	3,47	418,26
	3D	2,52	1,09	5,82
	<b>CFTR</b>			
	2D	14,77	2,25	97,04
	3D	39,37	14,60	106,18
	<b>ACE2</b>			
	2D	20,38	4,91	84,50
	3D	114,84	27,95	471,89
	<b>TMPRSS2</b>			
	2D	0,17	0,02	1,23
	3D	5,11	1,64	15,90
BIONI010-C-O16	<b>SP-C</b>			
	2D	6,68	1,07	41,59
	3D	108,91	24,59	482,35
	<b>SP-B</b>			
	2D	0,33	0,04	2,75
	3D	3,65	1,30	10,25
	<b>SP-D</b>			
	2D	4,65	0,76	28,33
	3D	3,21	1,53	6,75
	<b>CFTR</b>			
	2D	0,44	0,23	0,82
	3D	14,31	10,95	18,69
	<b>ACE2</b>			
	2D	1,76	0,59	5,27
	3D	16,83	6,16	45,98
	<b>TMPRSS2</b>			
	2D	0,53	0,14	2,02
	3D	5,04	1,50	16,91

<b>Untersuchte Zelllinie</b>	<b>Untersuchtes Gen</b>	<b>Relative Quantifikation</b>	<b>95 % Konfidenzintervall</b>	
		<i>Mittelwert</i>	<i>Unteres Limit</i>	<i>Oberes Limit</i>
<b>DYP0250</b>	<b>SP-C</b>			
	2D	2,16 x 10 <sup>-5</sup>	6,50 x 10 <sup>-6</sup>	7,19 x 10 <sup>-5</sup>
	3D	1,64 x 10 <sup>-4</sup>	3,62 x 10 <sup>-5</sup>	7,42 x 10 <sup>-4</sup>
	<b>SP-B</b>			
	2D	0,16	0,06	0,43
	3D	0,07	0,02	0,26
	<b>SP-D</b>			
	2D	11,31	1,21	105,47
	3D	1,07	0,09	12,72
	<b>CFTR</b>			
	2D	7,15	1,22	41,86
	3D	48,74	3,12	762,50
	<b>ACE2</b>			
	2D	22,62	2,13	240,67
	3D	119,99	4,88	2.948,14
	<b>TMPRSS2</b>			
	2D	2,59	0,42	16,15
	3D	11,97	0,79	182,00



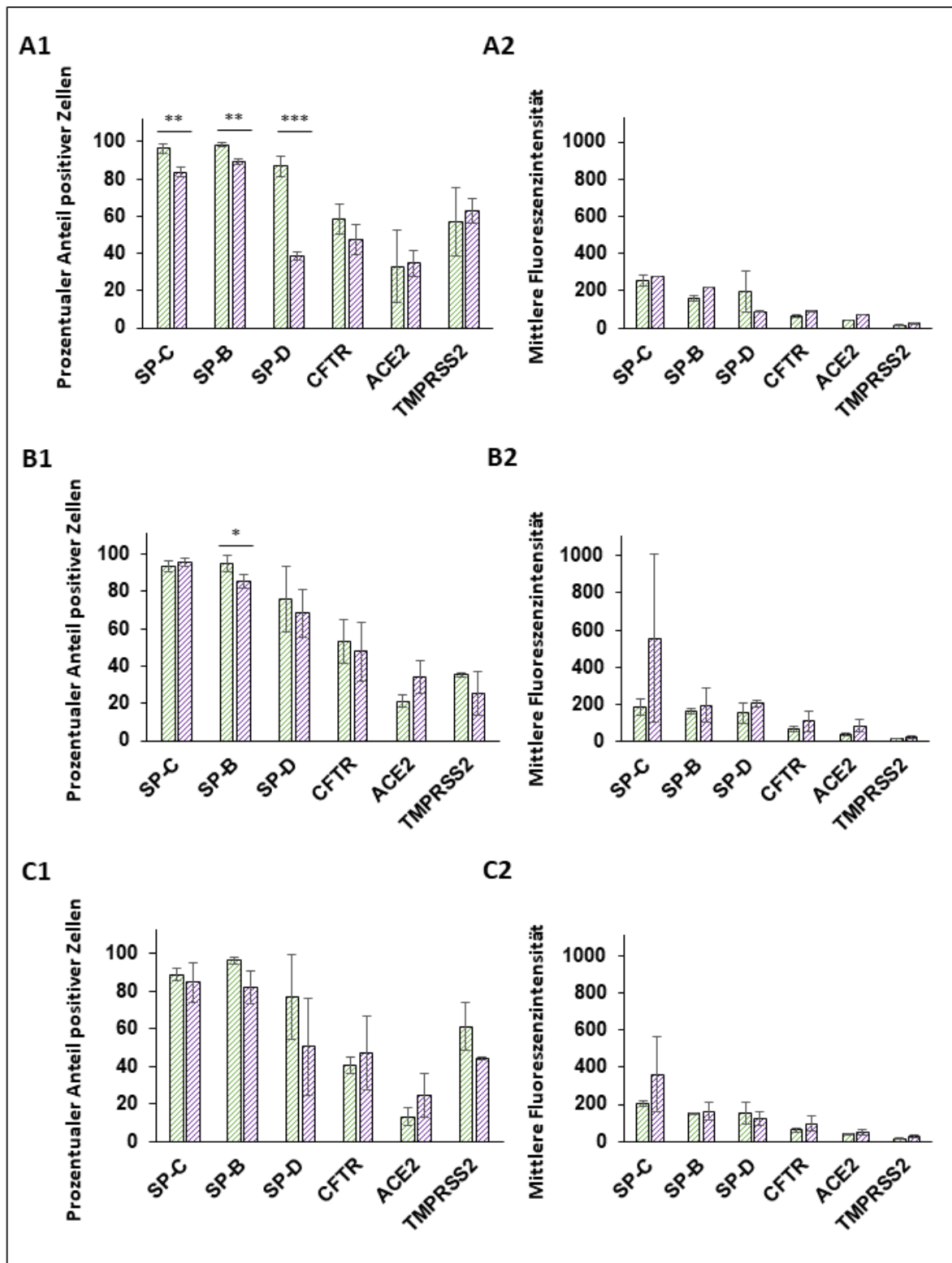


**Abbildung 19. Grafische Darstellung der relativen Quantifizierung von SP-C, SP-B, SP-D, CFTR, ACE2 und TMPRSS2 in AT2 an Tag 30 aus gesunden und F508del-hiPS-Zelllinien. A:** UKKi011-A, **B:** UKBi005-A, **C:** BIONI010-C, **D:** BIONI010-C-O16, **E:** DYP0250. Grün dargestellt sind 2D-differenzierte AT2, violett dargestellt sind 3D-differenzierte AT2. Genexpressionsdiagramme zeigen die y-fache Änderung der Genexpression gegenüber undifferenzierten Kontrollzellen (hiPSCs;  $y=1$ ) des jeweiligen untersuchten Gens. Rote Punkte zeigen die jeweilige Genexpression in adulter humaner Lunge. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Konfidenzintervalle 95 %, \* $p < 0.05$ , signifikante Abweichung der Messwerte 3D-differenzierter Zellen gegenüber den Messwerten 2D-differenzierter Zellen. Abbildung zu Tab.17.

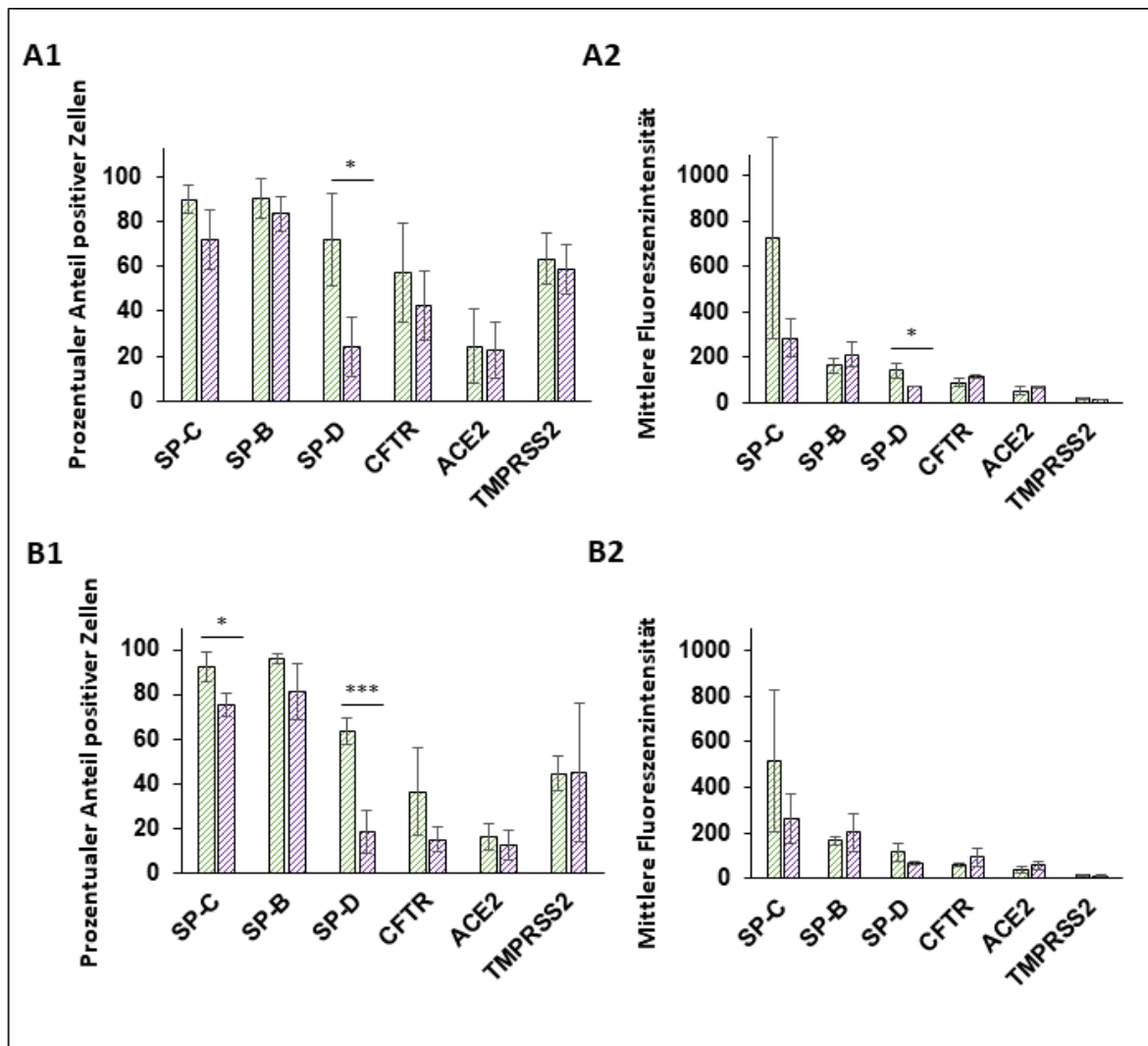
#### 4.4.2. Proteinexpressionsanalyse

Auch die Proteinexpression der sechs definierten AT2-Marker konnte an Tag 23 und 30 in 2D- und 3D-differenzierten Zellen nachgewiesen werden. SP-C wurde zu beiden Analysezeitpunkten von der Mehrheit differenzierter AT2 synthetisiert. An Tag 23 wurde SP-C von  $96,42 \pm 2,47$  % 2D-differenzierter und  $83,69 \pm 2,66$  % 3D-differenzierter AT2 aus UKKi011-A (Abb.20A1) und von  $92,46 \pm 6,51$  % 2D-differenzierter und  $75,46 \pm 5,30$  % 3D-differenzierter AT2 aus DYP0250 exprimiert (Abb.21B1). Diese Unterschiede waren jeweils signifikant. An Tag 30 bestätigte sich diese Beobachtung erneut und war sogar noch deutlicher ausgeprägt. In vier der fünf untersuchten Zelllinien wurden von signifikant mehr AT2 SP-C exprimiert, als von 3D-differenzierten AT2 (Abb.22+23). In UKKi011-A wurde SP-C zu  $87,59 \pm 7,06$  % (2D) und  $70,14 \pm 3,69$  % (3D) exprimiert (Abb.22A1), in BIONi010-C zu  $97,46 \pm 0,87$  % (2D) gegenüber  $50,48 \pm 2,24$  % (3D) (Abb.22C1), in BIONi010-C-O16 enthielten  $81,90 \pm 10,73$  % (2D) und  $44,65 \pm 0,58$  % (3D) SP-C (Abb.23A1) und in DYP0250 wurden von  $89,83 \pm 4,45$  % (2D) und  $75,64 \pm 6,16$  % (3D) SP-C exprimiert (Abb.23B1). Somit exprimierten stets mehr als 80 % aller analysierter, 2D-differenzierter AT2 und mehr als 70 % aller analysierter 3D-differenzierter AT2 aus fünf verschiedenen hiPS-Zelllinien SP-C an Tag 23 und 30 (Abb.22A1-C1+23A1-C1). Auch SP-B und SP-D wurden von der Mehrheit der analysierten Zellen exprimiert. An Tag 23 wurde SP-B von mindestens 93 % 2D-differenzierter und mindestens 82 % 3D-differenzierter AT2 exprimiert (Abb.20+21). Signifikant war der Unterschied zwischen 2D und 3D an Tag 23 für UKBi005-A (2D:  $95,16 \pm 4,60$  %, 3D:  $85,42 \pm 3,63$  %) (Abb.20B1) und an Tag 30 für UKKi011-A (2D:  $93,81 \pm 3,50$  %, 3D:  $71,84 \pm 1,68$  %) (Abb.21A1), BIONi010-C (2D:  $96,75 \pm 2,43$  %, 3D:  $50,36 \pm 5,11$  %) (Abb.21C1) und BIONi010-C-O16 (2D:  $83,46 \pm 12,69$  %, 3D:  $42,88 \pm 2,24$  %) (Abb.22A1). SP-D wurde von allen drei analysierten Surfactantproteinen in den wenigsten Zellen nachgewiesen, in 2D zu mindestens 76 % und 3D zu mindestens 38 %. Signifikante Unterschiede an Tag 23 zwischen 2D und 3D wurden für die Zelllinien UKKi011-A (2D:  $86,87 \pm 5,66$  %, 3D:  $38,50 \pm 2,34$  %) (Abb.20A1), BIONi010-C-O16 (2D:  $71,62 \pm 20,59$  %, 3D:  $24,22 \pm 13,07$  %) (Abb.21A1) und für DYP0250 (2D:  $63,39 \pm 5,78$  %, 3D:  $18,46 \pm 9,60$  %) (Abb.21B1) bestimmt. An Tag 30 gab es signifikante Unterschiede zwischen 2D und 3D in UKKi011-A (2D:  $93,81 \pm 3,50$  %, 3D:  $71,84 \pm 1,68$  %) (Abb.22A1), BIONi010-C (2D:  $80,82 \pm 6,01$  %, 3D:  $8,98 \pm 2,01$  %) (Abb.22C1) und BIONi010-C-O16 (2D:  $40,84 \pm 6,60$  %, 3D:  $13,81 \pm 1,97$  %) (Abb.23A1). Für die weiteren analysierten Marker CFTR, ACE2 und TMPRSS2 gab es in keiner der untersuchten Zelllinien an Tag 23 Unterschiede zwischen der 2D- und 3D-Differenzierung, jedoch an Tag 30. CFTR wurde von signifikant mehr 2D-differenzierten AT2 aus BIONi010-C (2D:  $67,78 \pm 13,25$  %, 3D:  $6,35 \pm 2,10$  %) (Abb.22C1) und BIONi010-C-O16 (2D:  $46,42 \pm 7,64$  %, 3D:  $5,99 \pm 3,03$  %) (Abb.23A1) exprimiert. ACE2 wurde ebenfalls von signifikant mehr 2D-differenzierten AT2 aus BIONi010-C (2D:  $30,04 \pm 10,38$  %, 3D:  $2,95 \pm 1,11$  %) (Abb.22C1)

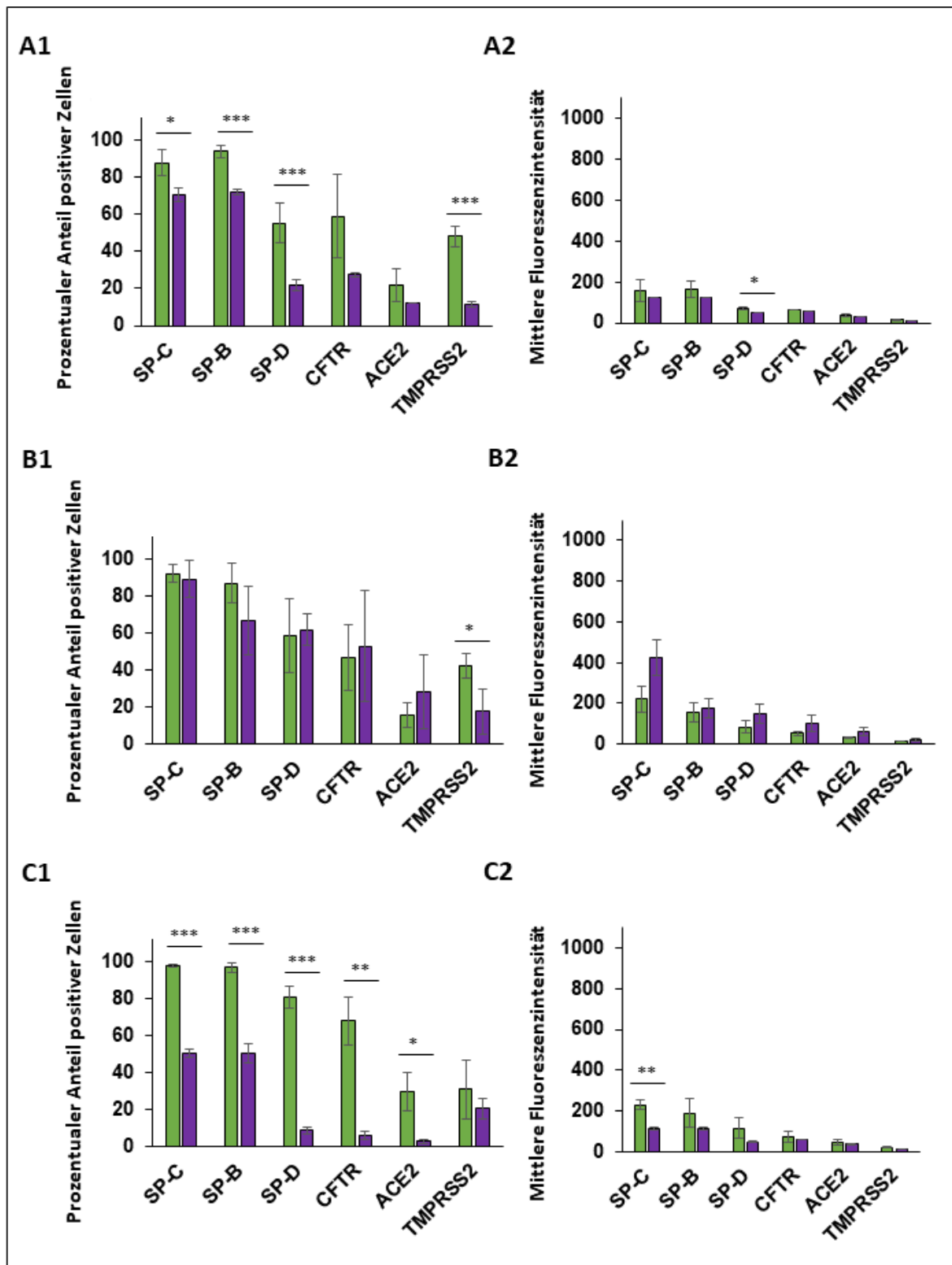
exprimiert. Des Weiteren wurde TMPRSS2 von signifikant mehr 2D-differenzierten AT2 aus UKKi011-A (2D:  $48,00 \pm 5,31$  %, 3D:  $11,34 \pm 1,62$  %) (Abb.22A1) und UKBi005-A (2D:  $42,31 \pm 6,66$  %, 3D:  $17,55 \pm 11,85$  %) (Abb.22B1) exprimiert. Hinsichtlich der Intensität der jeweiligen Marker-Expression, für dessen Interpretation die MFI herangezogen wurden, gab es an Tag 23 nur einen signifikanten Unterschied bezüglich der SP-D-Expression in BIONi010-C-O16, die 2D ( $142,00 \pm 32,32$ ) gegenüber 3D ( $75,80 \pm 0,71$ ) erhöht vorlag (Abb.21A2). An Tag 30 kehrte sich die Beobachtung um, da SP-D nämlich in 3D-differenzierten AT2 aus derselben Zelllinie nun signifikant stärker nachgewiesen wurde (2D:  $93,67 \pm 15,85$ , 3D:  $132,00 \pm 0,82$ ) (Abb.23A2). Dies war ebenso der Fall in UKKi011-A A (2D:  $70,97 \pm 8,39$ , 3D:  $48,17 \pm 1,91$ ) (Abb.22A2). ACE2 lag in 3D-differenzierten AT2 aus BIONi010-C-O16 ebenfalls stärker exprimiert vor, als in 2D-differenzierten AT2 (Abb.23A2). Sie war somit die einzige Zelllinie, auf deren 3D-differenzierten AT2 signifikant mehr Antigene für ACE2 vorzufinden waren. In derselben Zelllinie wurden an Tag 30 nun auch signifikant stärkere Intensitäten für SP-C (2D:  $344,00 \pm 96,02$ , 3D:  $189,00 \pm 0,82$ ), SP-B (2D:  $228,67 \pm 18,62$ , 3D:  $188,33 \pm 8,99$ ) und SP-D (2D:  $93,67 \pm 15,85$ , 3D:  $132,00 \pm 0,82$ ) in 2D-differenzierten AT2 gemessen (Abb.23A2). Eine signifikant stärkere Proteinexpression für SP-C in 2D-differenzierten Zellen wurde ebenfalls in BIONi010-C (2D:  $229,67 \pm 24,50$ , 3D:  $110,00 \pm 6,48$ ) nachgewiesen (Abb.22C2).



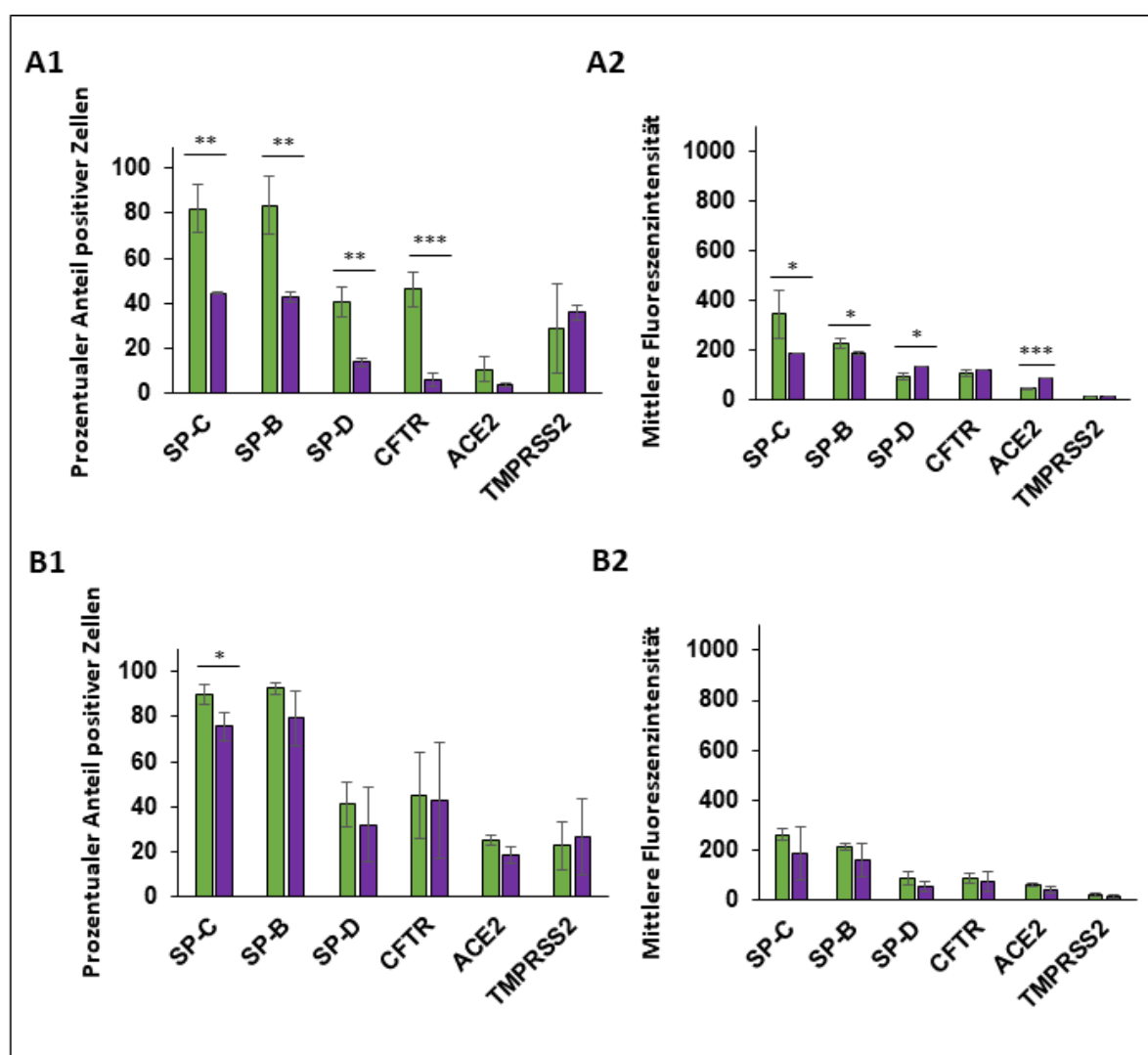
**Abbildung 20: Proteinexpression von SP-C, SP-B, SP-D, CFTR, ACE2 und TMPRSS2 in AT2 an Tag 23 aus gesunden hiPS-Zelllinien. A:** UKKi011-A, **B:** UKBi005-A, **C:** BIONi010-C. 1) Prozentualer Anteil positiver Zellen 2) Mittlere Fluoreszenzintensität. Grün schraffiert dargestellt sind 2D-differenzierte AT2, violett schraffiert dargestellt sind 3D-differenzierte AT2. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen biologischen Replikaten, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , signifikante Abweichung der Messwerte 3D-differenzierter Zellen gegenüber den Messwerten 2D-differenzierter Zellen. Zweistichproben-t-Test.



**Abbildung 21: Proteinexpression von SP-C, SP-B, SP-D, CFTR, ACE2 und TMPRSS2 in AT2 an Tag 23 aus F508del-hiPS-Zelllinien. A:** BIONi010-C-O16, **B:** DYP0250. 1) Prozentualer Anteil positiver Zellen 2) Mittlere Fluoreszenzintensität. Grün schraffiert dargestellt sind 2D-differenzierte AT2, violett schraffiert dargestellt sind 3D-differenzierte AT2. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen biologischen Replikaten, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , signifikante Abweichung der Messwerte 3D-differenzierter Zellen gegenüber den Messwerten 2D-differenzierter Zellen. Zweistichproben-t-Test.



**Abbildung 22: Proteinexpression von SP-C, SP-B, SP-D, CFTR, ACE2 und TMPRSS2 in AT2 an Tag 30 aus hiPS-Zelllinien gesunder Spender. A:** UKKi011-A, **B:** UKBi005-A, **C:** BIONi010-C. 1) Prozentualer Anteil positiver Zellen 2) Mittlere Fluoreszenzintensität. Grün dargestellt sind 2D-differenzierte AT2, violett dargestellt sind 3D-differenzierte AT2. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen biologischen Replikaten, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , signifikante Abweichung der Messwerte 3D-differenzierter Zellen gegenüber den Messwerten 2D-differenzierter Zellen. Zweistichproben-t-Test.



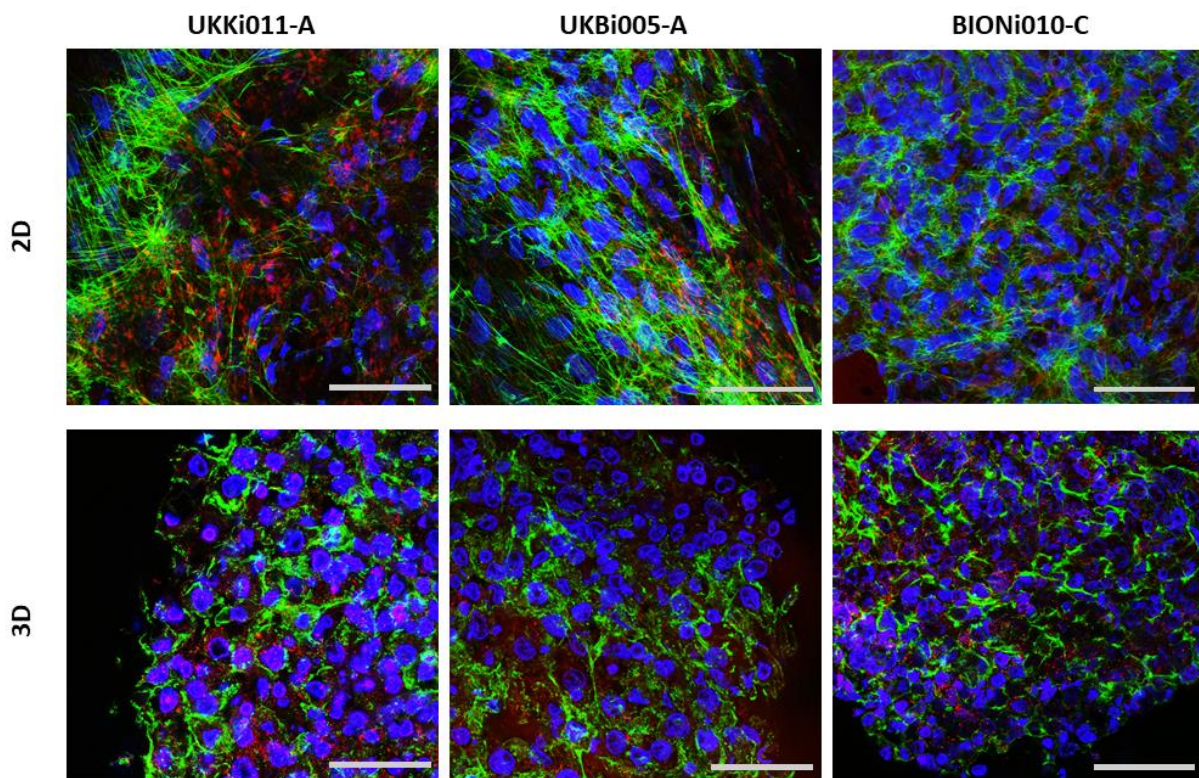
**Abbildung 23: Proteinexpression von SP-C, SP-B, SP-D, CFTR, ACE2 und TMPRSS2 in AT2 an Tag 30 aus F580del-hiPS-Zelllinien. A:** BIONi010-C-O16, **B:** DYP0250. 1) Prozentualer Anteil positiver Zellen 2) Mittlere Fluoreszenzintensität. Grün dargestellt sind 2D-differenzierte AT2, violett dargestellt sind 3D-differenzierte AT2. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen biologischen Replikaten, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , signifikante Abweichung der Messwerte 3D-differenzierter Zellen gegenüber den Messwerten 2D-differenzierter Zellen. Zweistichproben-t-Test.

#### 4.4.3. Immunhistochemischer Nachweis von SP-C

In 2D- und 3D-differenzierten AT2 wurden außerdem immunhistochemische Färbungen vorgenommen, um die Zellmorphologie und Verteilung von SP-C innerhalb der Zellen vergleichend zu bestimmen. Um die Zellmorphologie erkennbar zu machen, wurden die Zellkerne mittels DAPI (blau) und Aktinfilamente des Zytoskeletts mittels Phalloidin (grün) angefärbt. Die Form der Zellkerne unterschied sich in 2D zwischen den einzelnen Zelllinien der drei gesunden Spender (UKKi011-A, UKBi005-A, BIONi010-C) voneinander (Abb.24). Ebenso die Beschaffenheit der Aktinfilamente unterschied sich insbesondere in BIONi010-C gegenüber UKKi011-A und UKBi005-A. In 3D konnten zwischen den untersuchten Zelllinien keine deutlichen Unterschiede



festgestellt werden. Verglichen zu 2D, unterschied sich hier wiederum die Zellmorphologie deutlich in der Form der Zellkerne und Aussehen der Aktinfasern gegenüber 2D-differenzierter AT2. Die Zellkerne lagen noch näher beieinander, als in 2D und die Aktinfilamente waren nicht lang und faserig ausbreitend, sondern komprimiert in den 3D-Sphäroiden vorzufinden. SP-C, das mit einem spezifischen Antikörper rot angefärbt wurde, wird in speziellen Organellen von AT2-Zellen, den LBs synthetisiert und wurde demzufolge im Zytoplasma der Zellen lokalisiert (Abb.24). In allen Proben konnte SP-C im Zytoplasma nachgewiesen werden, die Intensität oder Menge des SP-C variierte jedoch zwischen den Zelllinien und 2D- und 3D-Proben. Insbesondere in Abb.24, UKKi011-A, 2D, sah man deutliche zytoplasmatische Akkumulationen des SP-C, das 3D inhomogener und kompakter verteilt zu sein schien.



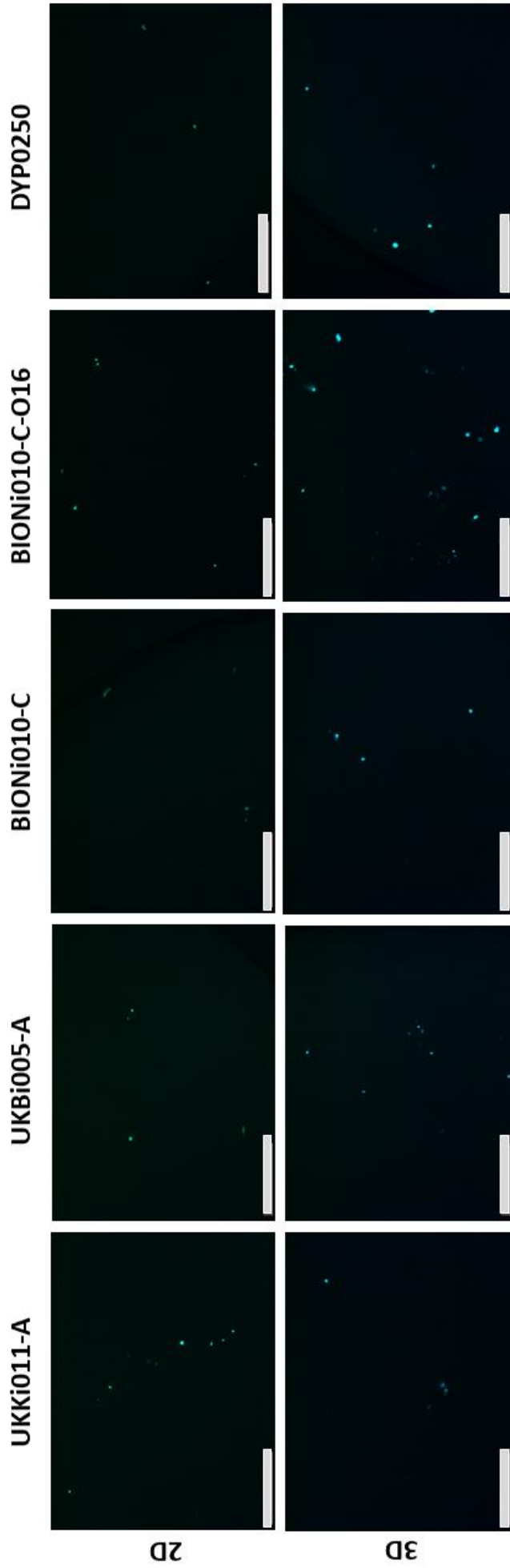
**Abbildung 24: Vergleichende immunzytochemische Färbung von 2D- und 3D-differenzierten AT2 an Tag 30 aus den hiPS-Zelllinien gesunder Spender.** Die Zellkerne wurden blau angefärbt (DAPI), die Aktinfasern des Zytoskeletts grün (Phalloidin) und SP-C in rot. Die Zellmorphologie (Zellkerne und Zytoskelett) und SP-C Expression unterscheidet sich zwischen 2D und 3D und den verschiedenen Zelllinien. Maßbalken 50  $\mu\text{m}$ . Helligkeit und Kontrast +40 %.



#### 4.4.4. Nachweis der ACE2/TMPRSS2-Funktionalität mit SARS-CoV-2-Pseudoviren

Kürzlich wurde nachgewiesen, dass SARS-CoV-2 die Membranrezeptoren ACE2 und TMPRSS2 zur Adsorption und Eintritt in die Wirtszelle nutzt [21]. AT2 wurden als Zielzellen identifiziert, da sie die genannten Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Nachweise, dass die in dieser Arbeit 2D- und 3D-differenzierten AT2 aus verschiedenen Zelllinien diese Rezeptoren auf Gen- und Proteinebene exprimieren, wurden bereits erbracht (Kapitel 4.4). Um diese Zellen zukünftig für die Medikamentenentwicklung für COVID-19 einsetzen zu können, ist die Funktionalität der vorhandenen Proteine essentiell.

Anhand von SARS-CoV-2-Pseudoviren, die am Fraunhofer IBMT in der Abteilung „Biologische Prozesse & Infrastruktur“ hergestellt wurden, gelang der Nachweis über die In-vitro-Infektion mit SARS-CoV-2 an AT2 und damit der Beweis zur Funktionalität von ACE2 und TMPRSS2 auf der Zelloberfläche von 2D- sowie 3D-differenzierten AT2 aus drei gesunden Zelllinien, sowie zwei Zelllinien mit F508del-Mutation. Diese wurden zuvor über einen Zeitraum von 72 Stunden SARS-CoV-2-Pseudoviren ausgesetzt, ehe die Anzahl von *fluorescence forming units* (ffu) durch die Expression von eGFP (*enhanced green fluorescent protein*) infizierter Zellen bestimmt wurde (Abb. 25). Als Kontrolle für die Funktionalität der verwendeten SARS-CoV-2-Pseudoviren wurde die Infektion mit der Nieren-Zelllinie HEK293T, die stabil für die Co-Expression von ACE2 und TMPRSS2 transfiziert wurde und bislang als Modellzellen zur SARS-CoV-2-Infektion eingesetzt wird, durchgeführt. Im Vergleich zu den 2D- und 3D-differenzierten AT2 aus den fünf verwendeten hiPS-Zelllinien, waren bei HEK293T-ACE2-TMPRSS2 enorme Unterschiede in der Anzahl infizierter Zellen gegeben (Abb.25).



HEK293T-ACE2-TMPRSS2

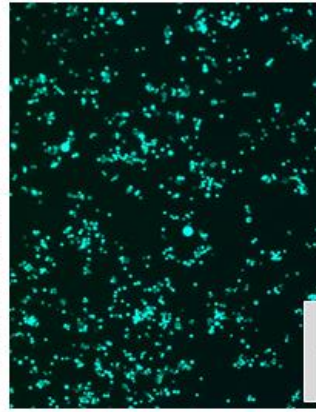
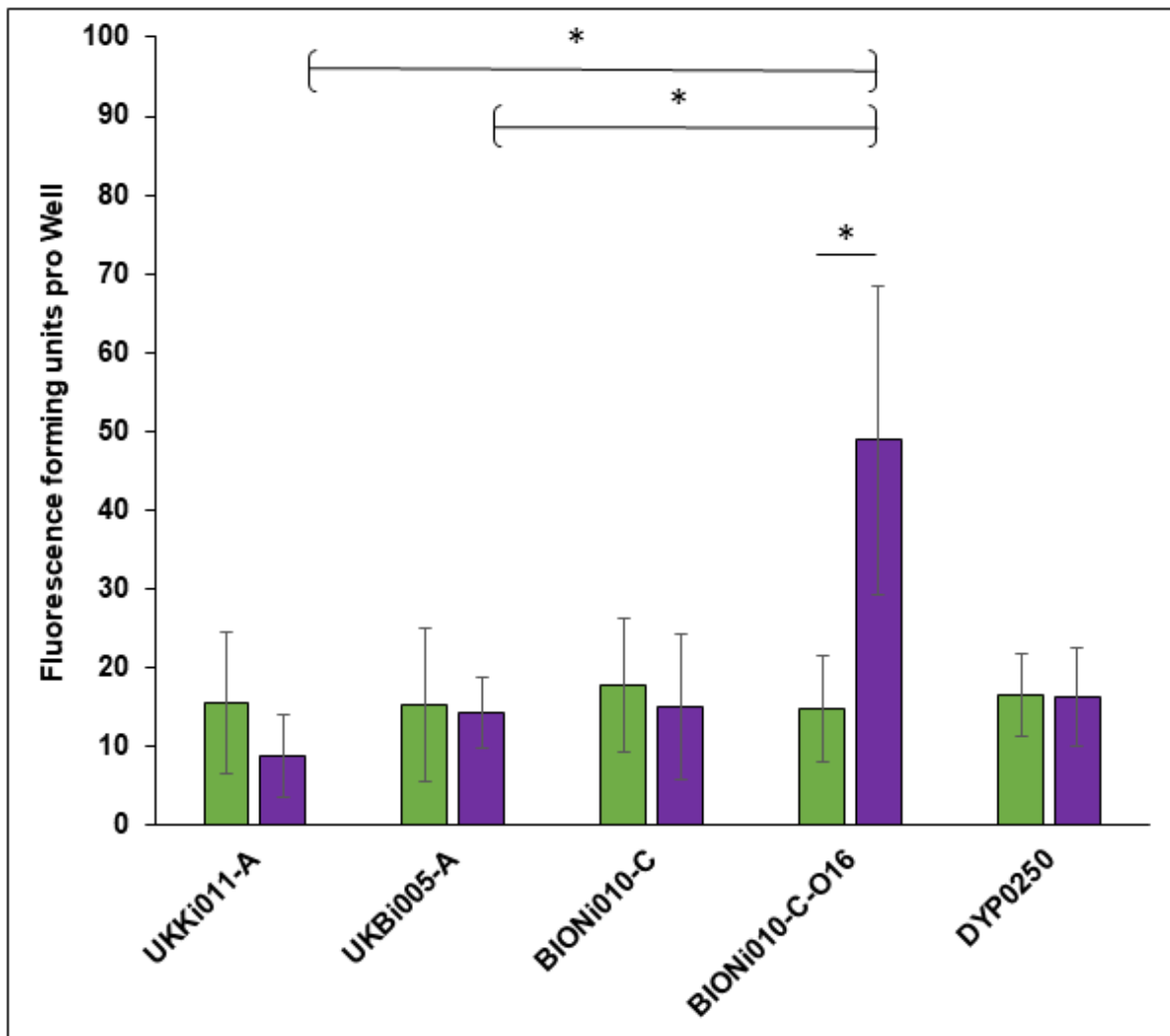


Abbildung 25: Mikroskopische Aufnahmen der SARS-CoV-2-Pseudoviren-Infektion von 2D- und 3D-differenzierten AT2 aus den Zelllinien drei gesunder Spender (UKKi011-A, UKBi005-A und BIONi010-C), zwei Zelllinien mit F508deletion (BIONi010-C-O16, DYP0250) und der Kontrollzelllinie HEK293T-ACE2-TMPRSS2. Dargestellt sind die fluorescence forming units (ffu) in einem repräsentativen Well, die für die vergleichende Analyse (Abb.26) bestimmt wurden. Fluoreszenzaufnahme mit GFP-Filter. Maßbalken 500 µm.

Im Durchschnitt wurden  $16,25 \pm 0,52$  2D-differenzierte AT2 gesunder Zelllinien und  $15,67 \pm 0,7$  2D-differenzierte AT2 aus Zelllinien mit CF-Mutation infiziert. Von 3D-differenzierten Zellen wurden durchschnittlich  $12,75 \pm 2,08$  Zellen von gesunden Spendern und  $32,63 \pm 6,63$  Zellen mit CF-Mutation infiziert (Abb. 26). Zwischen den gesunden Zelllinien wurden keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl infizierter Zellen festgestellt, ebenso waren die ffu zwischen 2D und 3D vergleichbar (Abb.25+26). Dies galt auch für die Zelllinie DYP0250, die aus einem CF-Spender stammt. Die ffu von 3D-differenzierten AT2 aus BIONi010-C-O16 unterschied sich hingegen signifikant mit  $48,92 \pm 19,57$  gegenüber 2D-differenzierten Zellen derselben Zelllinie mit einem Wert von  $14,83 \pm 6,67$ , sowie gegenüber 3D-differenzierten AT2 aus UKKi011-A ( $8,83 \pm 5,18$ ) und UKBi005-A ( $14,33 \pm 4,4$ ) (Abb.26). Obgleich der Eindruck entstehen könnte, gegenüber der Parentalzelllinie BIONi010-C und der CF-Zelllinie DYP0250 bestehe ebenfalls ein signifikanter Unterschied, ist dies aufgrund einzelner abweichender Datenpunkte der Datenreihe nicht der Fall. Hier ist nochmals hervorzuheben, dass BIONi010-C-O16 in der Proteinexpressionsanalyse als einzige Zelllinie an Tag 30 ACE2 signifikant stärker exprimierte (Abb.23A2), als alle anderen Zelllinien. Eine Abhängigkeit der Vireninfektion mit der Anzahl von ACE2 auf der Zelloberfläche ist daher naheliegend.



**Abbildung 26: Vergleichende SARS-CoV-2-Pseudoviren-Infektion von 2D- und 3D-differenzierten AT2 aus den Zelllinien drei gesunder Spender (UKKi011-A, UKBi005-A und BIONi010-C) und zwei F508del-Zelllinien (BIONi010-C-O16, DYP0250).** Dargestellt sind die fluorescence forming units (ffu) pro analysiertem Well. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen biologischen Replikaten. Signifikant unterscheiden sich die Messwerte von 2D- und 3D-differenzierten BIONi010-C-O16-AT2 und die Messwerte 3D-differenzierter AT2 zwischen den Zelllinien UKKi011-A, UKBi005-A und BIONi010-C-O16. \*  $p < 0.05$ , Zweistichproben-t-Test.

#### 4.5. Analyse von Alveolaren Epithelzellen Typ 1 (AT1)

AT1 stellen die zum Gasaustausch benötigte Oberfläche zur Verfügung und entstehen aus ihren natürlichen Vorläuferzellen AT2. Spezifische Marker, die AT1 charakterisieren, sind unter anderen Caveolin-1 (CAV1), Aquaporin-5 (AQP5) und Podoplanin (PDPN). Diese Marker konnten in 2D- und 3D-differenzierten AT1 aus fünf hiPS-Zelllinien nachgewiesen werden. Somit konnte auch die Fähigkeit von AT2, als Vorläuferpopulation für AT1 zu dienen, bewiesen werden.

##### 4.5.1. Genexpressionsanalyse

Die Genexpression der zuvor genannten AT1 fiel in den untersuchten Zellen zum Analysezeitpunkt an Tag 37 schwach aus und unterschied sich zwischen 2D und 3D in allen gesunden Zelllinien nicht signifikant voneinander (Abb.27). Die Ausnahme hiervon bildete BIONi010-C, wo AQP5 in 2D-differenzierten AT1 signifikant höher exprimiert vorlag, als in 3D-differenzierten AT1 (Abb.27C). Bei den Zelllinien mit CF-Mutation konnte ein signifikanter Unterschied für CAV1 in BIONi010-C-O16 und DYP0250 bestimmt werden, welches 7,80- bzw. 10,05-fach stärker in 2D exprimiert wurde (Tab.18). Dies war ebenso der Fall für AQP5, welches in DYP0250 3,58-fach höher in 2D-differenzierten AT1 exprimiert wurde (Tab.18). Im Allgemeinen wurden die untersuchten AT1-Marker auf Genexpressionsebene schwach exprimiert, auch in adulter Lunge lag der höchste Wert, in diesem Fall CAV1 in BIONi010-C-O16, bei einer 228,43-fachen Expression im Vergleich zu undifferenzierten hiPSCs. Für AQP5 lag der höchste Wert bei 96,12-facher Expression im Vergleich zu undifferenzierten BIONi010-C (Abb.27). PDPN war in adulter Lunge geringer exprimiert, als in 2D- und 3D-differenzierten AT1 aus hiPSCs. Zusammenfassend zur Genexpression in AT1 lässt sich festhalten, dass bei signifikanten Unterschieden in dieser Stufe stets 2D-differenzierte AT1 die stärkere Genexpression der definierten Marker aufwiesen.

**Tabelle 18: Relative Quantifizierung der Genexpression in AT1 an Tag 37**

<i>Untersuchte Zelllinie</i>	<i>Untersuchtes Gen</i>	<i>Relative Quantifikation</i>	<i>95 % Konfidenzintervall</i>	
		<i>Mittelwert</i>	<i>Unteres Limit</i>	<i>Oberes Limit</i>
<b>UKKi011-A</b>	<b>CAV1</b>			
	2D	0,58	0,38	0,89
	3D	0,81	0,78	0,85
	<b>AQP5</b>			
	2D	0,18	0,09	0,38
	3D	0,23	0,21	0,26
	<b>PDPN</b>			
	2D	1,15	0,31	4,28
	3D	1,79	1,61	1,99

UKBi005-A

<b>CAV1</b>			
2D	2,95	1,90	4,56
3D	2,74	1,19	6,31
<b>AQP5</b>			
2D	0,46	0,34	0,63
3D	0,22	0,11	0,43
<b>PDPN</b>			
2D	8,50	4,92	14,70
3D	2,37	0,88	6,37

BIONi010-C

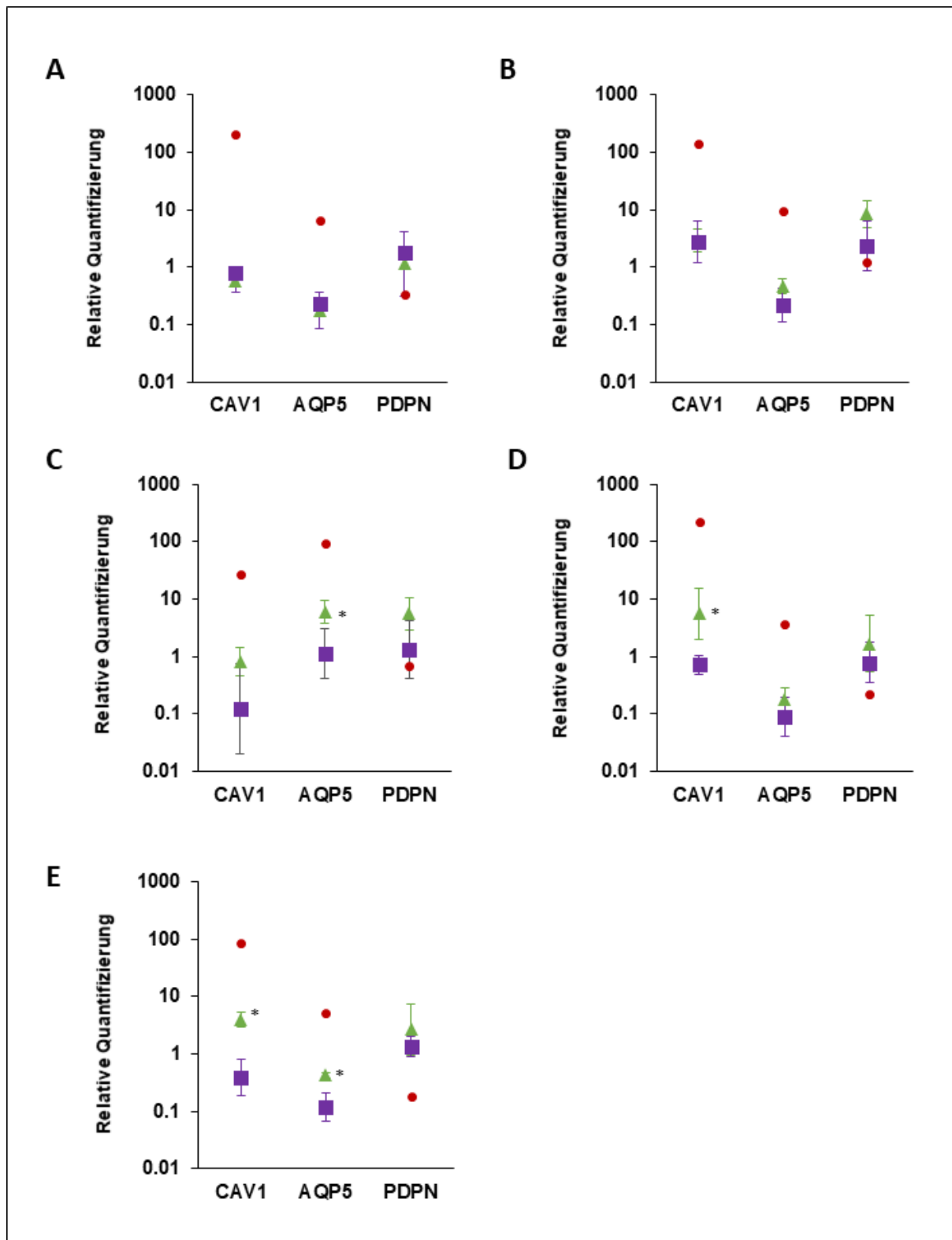
<b>CAV1</b>			
2D	0,81	0,47	1,42
3D	0,12	0,02	0,75
<b>AQP5</b>			
2D	5,93	3,77	9,33
3D	1,12	0,42	4,24
<b>PDPN</b>			
2D	5,56	2,94	10,53
3D	1,33	0,42	4,24

BIONi010-C-O16

<b>CAV1</b>			
2D	5,62	2,00	15,78
3D	0,72	0,49	1,04
<b>AQP5</b>			
2D	0,18	0,11	0,28
3D	0,09	0,04	0,19
<b>PDPN</b>			
2D	1,69	0,56	5,11
3D	0,79	0,35	1,79

DYP0250

<b>CAV1</b>			
2D	3,92	2,96	5,19
3D	0,39	0,18	0,81
<b>AQP5</b>			
2D	0,43	0,39	0,48
3D	0,12	0,07	0,21
<b>PDPN</b>			
2D	2,69	0,96	7,53
3D	1,33	0,89	2,00

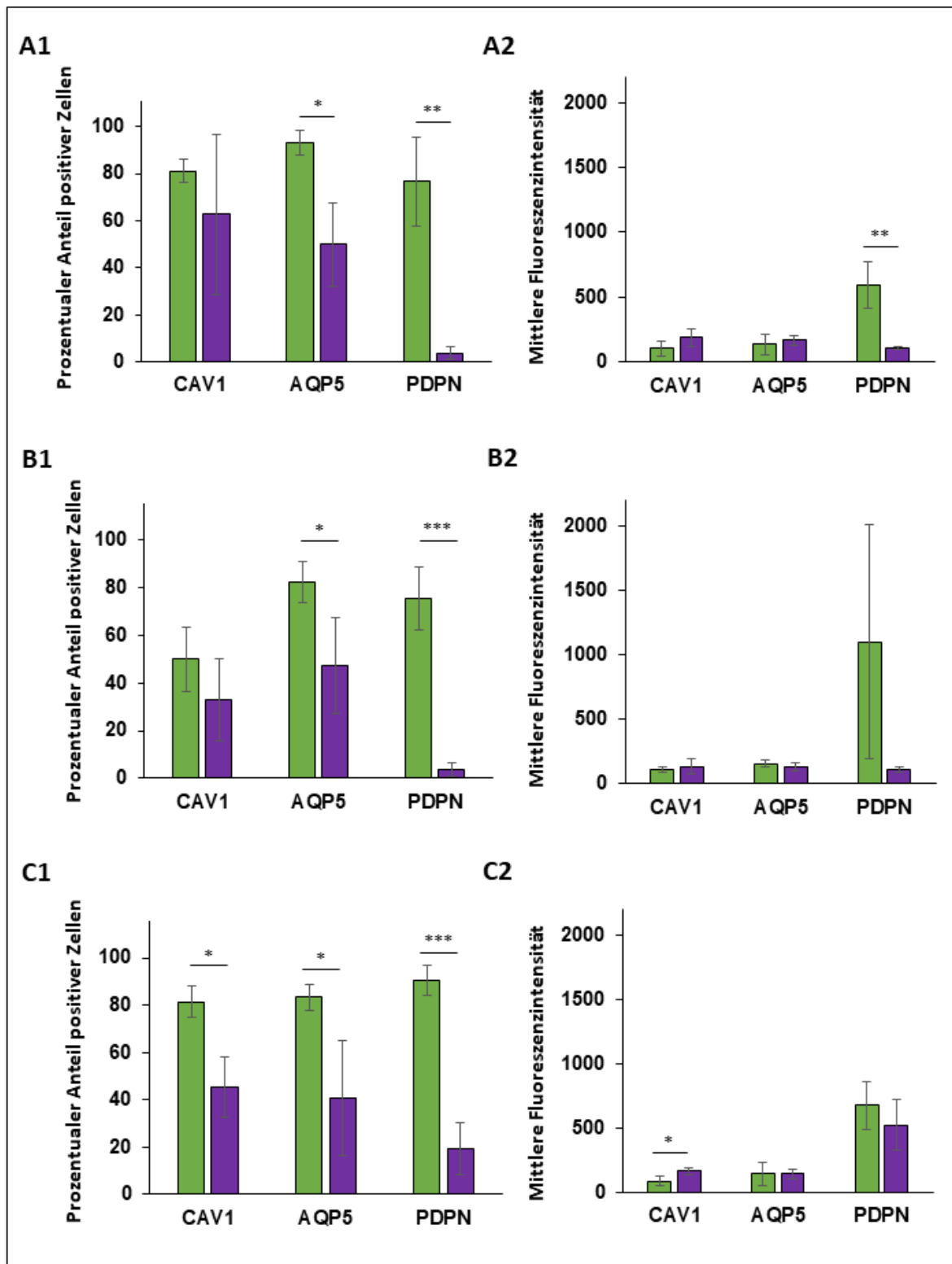


**Abbildung 27: Grafische Darstellung der relativen Quantifizierung von CAV1, AQP5 und PDPN in AT1 an Tag 37 aus gesunden und F508del-hiPS-Zelllinien. A:** UKKi011-A, **B:** UKBi005-A, **C:** BIONi010-C, **D:** BIONi010-C-O16, **E:** DYP0250. Grün dargestellt sind 2D-differenzierte AT1-Zellen, violett dargestellt sind 3D-differenzierte AT1-Zellen. Genexpressionsdiagramme zeigen die y-fache Änderung der Genexpression gegenüber undifferenzierten Kontrollzellen (hiPSCs;  $y=1$ ) des jeweiligen untersuchten Gens. Rote Punkte zeigen die jeweilige Genexpression in adulter humaner Lunge. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Konfidenzintervalle 95 %, \* $p<0.05$ , signifikante Abweichung der Messwerte 3D-differenzierter Zellen gegenüber den Messwerten 2D-differenzierter Zellen. Abbildung zu Tab.18.

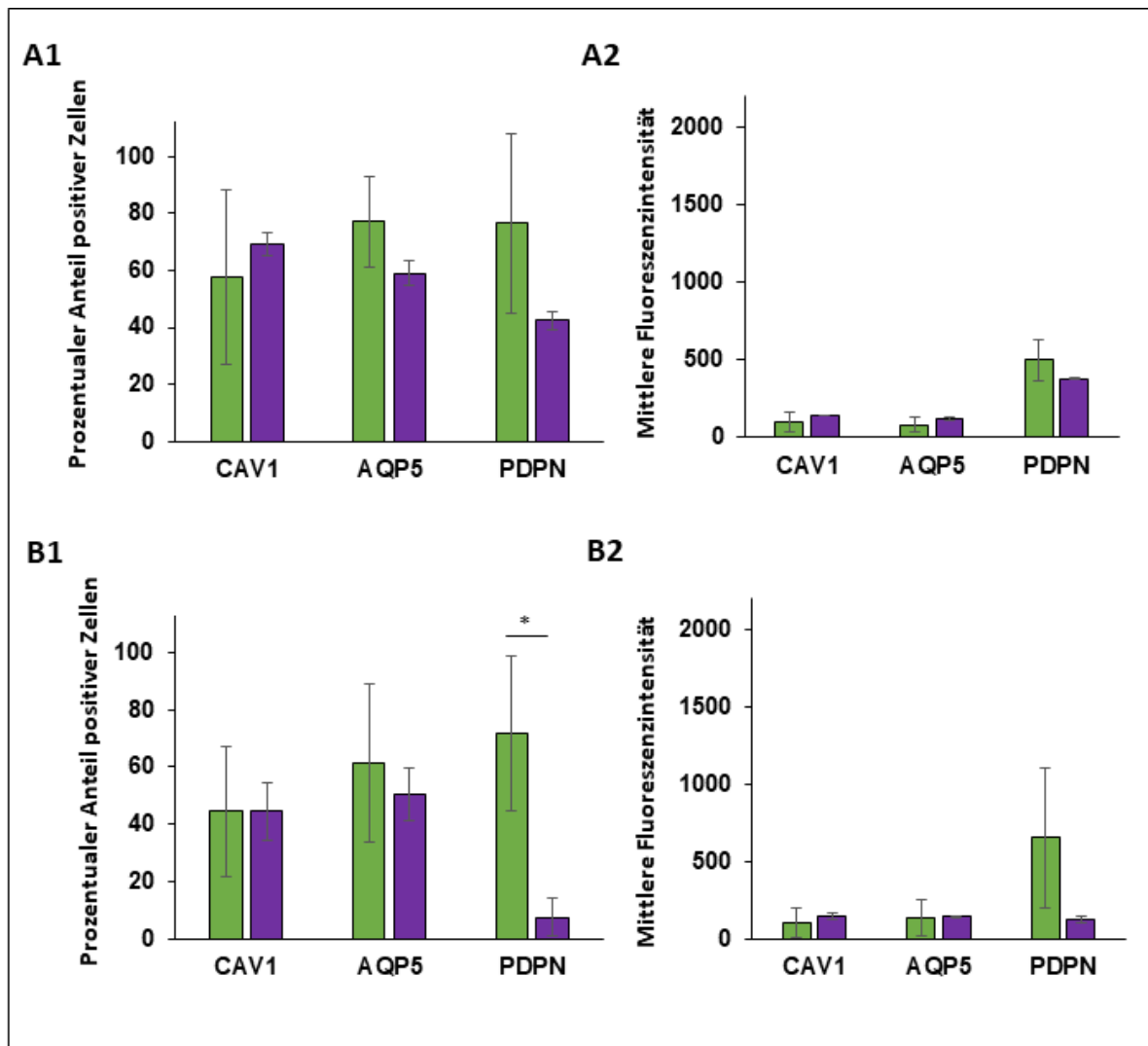
#### 4.5.2. Proteinexpressionsanalyse

AQP5 und PDPN wurden von signifikant mehr 2D-differenzierten AT1 aus den Zelllinien gesunder Spender exprimiert, als von 3D-differenzierten AT1 (Abb.28A). AQP5 wurde von  $93,29 \pm 5,20$  % (2D) und  $49,96 \pm 17,65$  % (3D) UKKi011-A-AT1 exprimiert (Abb.28A1), von  $82,20 \pm 8,36$  % (2D) und  $47,26 \pm 20,06$  % (3D) UKBi005-A-AT1 (Abb.28B1) und von  $83,36 \pm 5,53$  % (2D) und  $40,78 \pm 24,43$  % (3D) BIONi010-C-AT1 (Abb.28C1). PDPN wurde von  $76,68 \pm 18,82$  % (2D) und  $3,77 \pm 2,50$  % (3D) UKKi011-A-AT1 exprimiert (Abb.28A1), von  $75,15 \pm 13,14$  % (2D) und  $3,71 \pm 2,85$  % (3D) UKBi005-A-AT1 (Abb.28B1) und von  $90,49 \pm 6,60$  % (2D) und  $19,21 \pm 10,94$  % (3D) BIONi010-C-AT1 (Abb.28C1). PDPN wurde ebenfalls von signifikant mehr DYP0250-AT1, die 2D-differenziert wurden exprimiert, als von solchen, die 3D-differenziert wurden (2D:  $71,52 \pm 27,04$  %, 3D:  $7,43 \pm 6,54$  %) (Abb.29B1). Signifikant mehr 2D-differenzierte AT1 aus BIONi010-C exprimierten CAV1 (2D:  $81,33 \pm 6,70$  %, 3D:  $45,24 \pm 12,87$  %) (Abb.28C1). In allen anderen untersuchten Zelllinien gab es keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl CAV1-exprimierender AT1 zwischen 2D- und 3D-Differenzierung. 3D-differenzierte AT1 aus BIONi010-C exprimierten mehr CAV1 auf ihrer Zelloberfläche, als 2D-differenzierte Zellen (2D:  $88,37 \pm 39,34$ , 3D:  $165,67 \pm 25,72$ ) (Abb.28C2). Dieser beobachtete Unterschied bestätigte sich für die anderen vier untersuchten Zelllinien jedoch nicht erneut. Die MFI-Analyse zeigte zudem, dass PDPN das am stärksten exprimierte Protein von AT1-Zellen ist (Abb.28A2-C2+29A2-B2). In UKKi011-A hatten AT1, die 2D-differenziert wurden, signifikant mehr Antigene für PDPN, als 3D-differenzierte AT1 (2D:  $596,00 \pm 180,62$ , 3D:  $107,83 \pm 11,55$ ) (Abb.28A2). Weitere signifikante Unterschiede in anderen Zelllinien bezüglich der Proteinexpressionsstärke von PDPN in 2D- und 3D-differenzierten Zellen blieben aus. PDPN wurde außerdem in immunzytochemischen Färbungen in 2D- und 3D-differenzierten Zellen aus drei gesunden Spendern intrazellulär nachgewiesen (Abb.30). Die Expressionsstärke zwischen den Zelllinien drei gesunder Spender unterschied sich dabei nicht, allerdings schien die PDPN-Expression in den untersuchten 3D-Sphäroiden stärker zu sein, als in 2D-Monolayern.

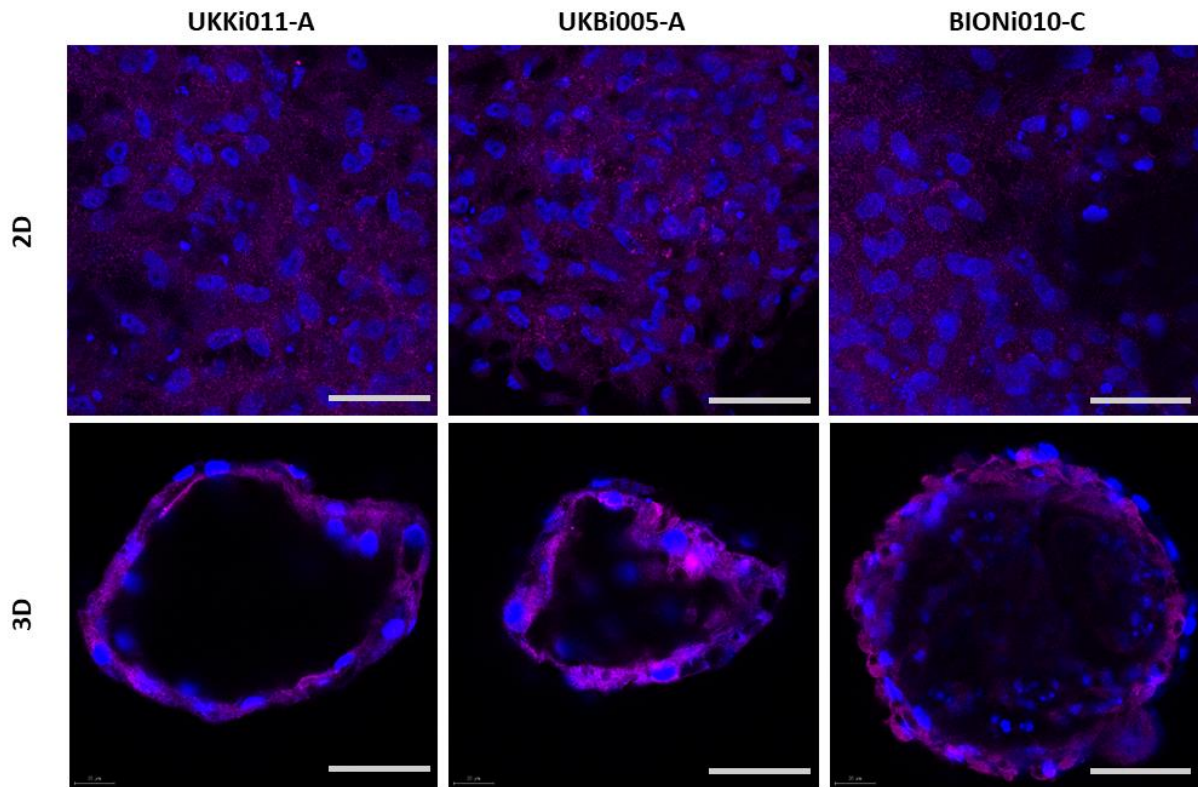




**Abbildung 28: Proteinexpression von CAV1, AQP5 und PDPN in AT1 an Tag 37 aus gesunden hiPS-Zelllinien. A:** UKKi011-A, **B:** UKBi005-A, **C:** BIONi010-C. 1) Prozentualer Anteil positiver Zellen 2) Mittlere Fluoreszenzintensität. Grün dargestellt sind 2D-differenzierte AT1, violett dargestellt sind 3D-differenzierte AT1. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen biologischen Replikaten, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , signifikante Abweichung der Messwerte 3D-differenzierter Zellen gegenüber den Messwerten 2D-differenzierter Zellen. Zweistichproben-t-Test.



**Abbildung 29: Proteinexpression von CAV1, AQP5 und PDPN in AT1 an Tag 37 aus F508del-hiPS-Zelllinien. A:** BIONi010-C-O16, **B:** DYP0250. 1) Prozentualer Anteil positiver Zellen 2) Mittlere Fluoreszenzintensität. Grün dargestellt sind 2D-differenzierte AT1, violett dargestellt sind 3D-differenzierte AT1. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen biologischen Replikaten, \*  $p < 0.05$ , signifikante Abweichung der Messwerte 3D-differenzierter Zellen gegenüber den Messwerten 2D-differenzierter Zellen. Zweistichproben-t-Test.



**Abbildung 30: Vergleichende immunzytochemische Färbung von 2D- und 3D-differenzierten AT1 an Tag 37 aus gesunden hiPS-Zelllinien.** Die Zellkerne wurden blau angefärbt (DAPI) und PDPN in magenta. Maßbalken 50  $\mu\text{m}$ . Helligkeit und Kontrast +40 %.

#### **4.6. AT2-Differenzierung aus kryokonservierten LP-Zellen**

Um die Anwendung von AT2 als zukünftige Zellquelle für In-vitro-Lungenmodelle zu vereinfachen, wurde die Möglichkeit der Kryokonservierung von Lungenvorläuferzellen und deren Fähigkeit, nach dem Kryokonservierungs- und Auftauprozess in AT2 weiterdifferenziert zu werden, untersucht. Als Pilotstudie zu möglichen nachfolgenden Forschungsarbeiten wurde hierfür zunächst das langsame Einfrieren von 2D-differenzierten Zellen angewendet. Die Gen- und Proteinexpression der AT2-Marker wurde zwischen nicht-kryokonservierten und kryokonservierten Zellen verglichen.

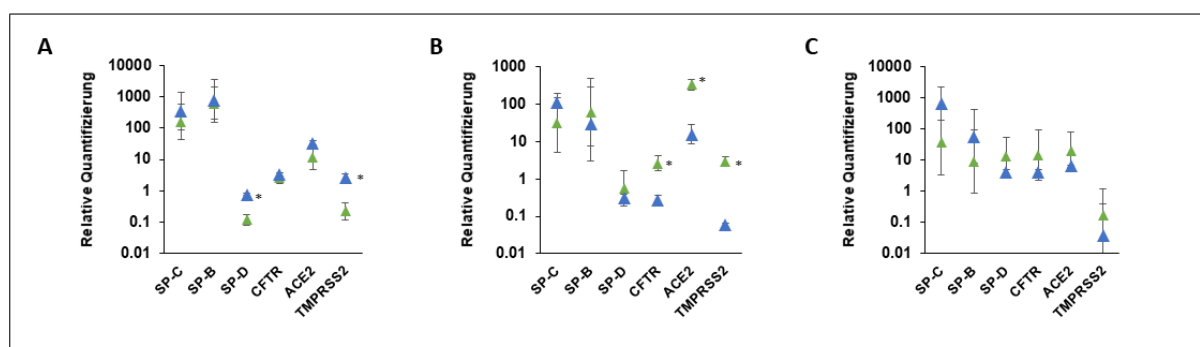
##### **4.6.1. Genexpressionsanalyse**

Alle AT2-Marker waren in UKKi011-A in aus kryokonservierten Zellen differenzierten AT2 höher exprimiert, als in AT2, die nie kryokonserviert waren (Tab.19). So unterschied sich die SP-C-Expression um das 2,20-fache, die SP-B-Expression um das 1,19-fache, die SP-D-Expression um das 6,50-fache, die CFTR-Expression um das 0,60-fache, die ACE2-Expression um das 2,90-fache und die TMPRSS2-Expression um das 11,95-fache (Tab.19). Statistisch signifikant waren hierbei die Expressionsunterschiede von SP-D und TMPRSS2 (Abb.31A). Die aus der Zelllinie UKBi005-A differenzierten AT2 verhielten sich anders. So waren CFTR 9,78-fach, ACE2 21,06-fach und TMPRSS2 49,33-fach und signifikant stärker in nicht-kryokonservierten Zellen exprimiert (Tab.19, Abb.31B). Bei BIONi010-C gab es keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression zwischen kryokonservierten und nicht-kryokonservierten Zellen (Tab.19, Abb.31C).

Tabelle 19: Relative Quantifizierung der Genexpression in AT2 nach Kryokonservierung

<i>Untersuchte Zelllinie</i>	<i>Untersuchtes Gen</i>	<i>Relative Quantifikation</i>		
		<i>Mittelwert</i>	<i>Unteres Limit</i>	<i>Oberes Limit</i>
<i>UKKi011-A</i>	<b>SP-C</b>			
	2D	160,21	44,69	88,47
	3D	352,69	574,30	1.406,06
	<b>SP-B</b>			
	2D	614,01	190,75	3.458,90
	3D	732,82	155,26	1.976,47
	<b>SP-D</b>			
	2D	0,12	0,08	3,75
	3D	0,78	0,70	0,87
	<b>CFTR</b>			
	2D	2,57	1,75	3,75
	3D	3,32	2,96	3,73
	<b>ACE2</b>			
	2D	11,51	4,62	28,72
3D	33,43	27,12	41,21	
<b>TMPRSS2</b>				
2D	0,22	0,12	0,42	
3D	2,63	2,06	3,37	
<i>UKBi005-A</i>	<b>SP-C</b>			
	2D	31,57	5,11	195,21
	3D	111,88	81,75	153,12
	<b>SP-B</b>			
	2D	61,36	7,74	486,54
	3D	29,92	3,03	295,26
	<b>SP-D</b>			
	2D	0,55	0,18	1,62
	3D	0,32	0,25	0,40
	<b>CFTR</b>			
	2D	2,64	1,64	4,24
	3D	0,27	0,20	0,37
	<b>ACE2</b>			
	2D	333,41	243,57	456,39
3D	15,83	8,47	29,57	
<b>TMPRSS2</b>				
2D	2,96	2,22	3,94	
3D	0,06	0,05	0,07	

Untersuchte Zelllinie	Untersuchtes Gen	Relative Quantifikation		
		Mittelwert	Unteres Limit	Oberes Limit
<b>BIONi010-C</b>	<b>SP-C</b>			
	2D	38,11	3,47	418,26
	3D	672,69	192,72	2.347,95
	<b>SP-B</b>			
	2D	9,19	0,90	94,04
	3D	58,33	8,19	415,70
	<b>SP-D</b>			
	2D	13,97	3,47	56,31
	3D	4,05	3,23	5,08
	<b>CFTR</b>			
	2D	14,77	2,25	97,04
	3D	4,27	3,59	5,07
	<b>ACE2</b>			
	2D	20,38	4,91	84,50
	3D	6,58	6,06	7,14
	<b>TMPRSS2</b>			
	2D	0,17	0,02	1,23
	3D	0,04	0,00	0,40

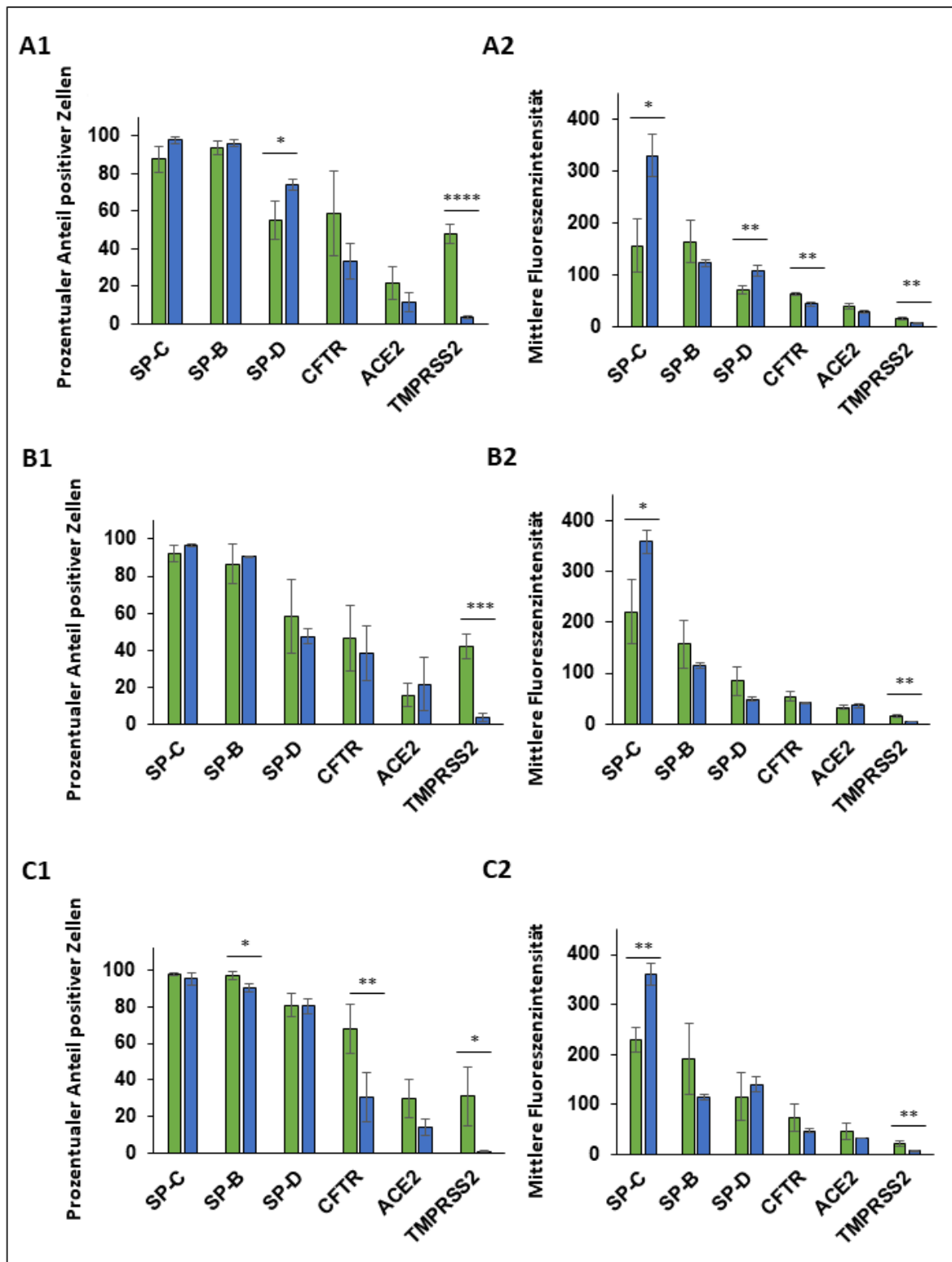


**Abbildung 31: Grafische Darstellung der relativen Quantifizierung von SP-C, SP-B, SP-D, CFTR, ACE2 und TMPRSS2 in AT2 nach Kryokonservierung. A:** UKKi011-A, **B:** UKBi005-A, **C:** BIONi010-C. Grün dargestellt sind 2D-differenzierte AT2 ohne Zwischenschritt der Kryokonservierung. Blau dargestellt sind AT2, die aus kryokonservierten LP-Zellen 14 Tage 2D-differenziert wurden. Genexpressionsdiagramme zeigen die y-fache Änderung der Genexpression gegenüber undifferenzierten Kontrollzellen (hiPSCs;  $y=1$ ) des jeweiligen untersuchten Gens. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Konfidenzintervalle 95 %, \* $p<0.05$ , signifikante Abweichung der Messwerte 3D-differenzierter Zellen gegenüber den Messwerten 2D-differenzierter Zellen. Abbildung zu Tab.19.

#### 4.6.2. Proteinexpressionsanalyse

Die durchflusszytometrische Analyse zeigte in den drei hiPS-Zelllinien gesunder Spender, die entweder aus kryokonservierten LP-Zellen oder nicht-kryokonservierten LP-Zellen in AT2 differenziert wurden, einzelne signifikante Unterschiede im Prozentanteil Marker-positiver Zellen auf (Abb.32). In der Zelllinie UKKi011-A exprimierten signifikant mehr AT2, die aus kryokonservierten LP-Zellen differenziert wurden, SP-D (live:  $55,27 \pm 10,41$  %, cryo:  $74,10 \pm 2,65$  %) (Abb.32A1). Bei weiteren als statistisch signifikant bestimmten Unterschieden, exprimierten jeweils mehr nicht-kryokonservierte Zellen die entsprechenden Marker. So exprimierten mit  $96,75 \pm 2,43$  % mehr nicht-kryokonservierte Zellen SP-D, als  $90,03 \pm 2,09$  % kryokonservierte BIONi010-C-AT2 (Abb.32C1). Auch bei der Anzahl CFTR-exprimierender AT2 wurde in dieser Zelllinie ein statistisch signifikanter Unterschied bestimmt (live:  $67,78 \pm 13,25$  %, cryo:  $30,87 \pm 13,34$  %) (Abb.32C1). TMPRSS2 wurde in allen untersuchten Zelllinien von signifikant mehr nicht-kryokonservierten AT2 exprimiert, als von kryokonservierten (Abb.32A1-C1). Ein hoch signifikanter Unterschied ( $p < 0,0001$ ) ergab sich für UKKi011-A (live:  $48,00 \pm 5,31$  %, cryo:  $3,74 \pm 0,98$  %) (Abb.32A1), ein sehr signifikanter Unterschied ( $p < 0,001$ ) für UKBi005-A (live:  $42,31 \pm 6,66$  %, cryo:  $3,51 \pm 2,22$  %) (Abb.32B1) und ein ebenfalls signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) für BIONi010-C (live:  $31,06 \pm 15,99$  %, cryo:  $1,15 \pm 0,35$  %) (Abb.32C1).

Die AT2 aller Zelllinien synthetisierten signifikant mehr SP-C, wenn sie aus kryokonservierten LP-Zellen abstammten. So unterschied sich die MFI von UKKi011-A mit  $329,67 \pm 41,02$  (cryo) zu  $156,03 \pm 52,15$  (live) signifikant voneinander (Abb.32A2), ebenso wie bei UKBi005-A (live:  $220,00 \pm 62,98$ , cryo:  $359,00 \pm 22,73$ ) (Abb.32B2) und BIONi010-C (live:  $229,67 \pm 24,50$ , cryo:  $360,33 \pm 22,57$ ) (Abb.32C2). Dies war auch der Fall bei SP-D in UKKi011-A (live:  $70,97 \pm 8,39$ , cryo:  $108,47 \pm 10,68$ ). In dieser Zelllinie war auch die CFTR-Expression stärker, jedoch in den nicht kryokonservierten AT2, sondern in den nicht kryokonservierten Zellen (live:  $63,73 \pm 2,74$ , cryo:  $43,17 \pm 4,27$ ) (Abb.32A2). TMPRSS2 wurde in jeder Zelllinie signifikant stärker von nicht-kryokonservierten AT2 exprimiert (UKKi011-A:  $15,57 \pm 3,03$  (live),  $5,89 \pm 0,19$  (cryo), UKBi005-A  $14,80 \pm 2,41$  (live),  $4,81 \pm 0,31$  (cryo), BIONi010-C  $21,60 \pm 4,71$  (live),  $6,11 \pm 0,15$  (cryo)) (Abb.32A2-C2).



**Abbildung 32: Proteinexpression von SP-C, SP-B, SP-D, CFTR, ACE2 und TMPRSS2 in AT2 nach Kryokonservierung.** A: UKKi011-A, B: UKBi005-A, C: BIONi010-C. 1) Prozentualer Anteil positiver Zellen 2) Mittlere Fluoreszenzintensität. Grün dargestellt sind 2D-differenzierte AT2 ohne Zwischenschritt der Kryokonservierung. Blau dargestellt sind AT2, die aus kryokonservierten LP-Zellen 14 Tage 2D-differenziert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen biologischen Replikaten, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , signifikante Abweichung der Messwerte 3D-differenzierter Zellen gegenüber den Messwerten 2D-differenzierter Zellen. Zweistichproben-t-Test.



## 5. Diskussion

Jährlich sterben nach Angabe der Weltgesundheitsorganisation (WHO) 7,9 Millionen Menschen in Folge einer Lungenerkrankung. Nach deren Einschätzung werden Lungenkrankheiten in den nächsten Jahren weiter an Bedeutung zunehmen [1]. Am Beispiel von COVID-19 wurde deutlich, wie notwendig die Entwicklung von Behandlungsmöglichkeiten für (neu) auftretende Lungenkrankheiten ist und zukünftig sein wird. Dieser Prozess wird jedoch durch das Fehlen von adäquaten Testmodellen für die humane Lunge und durch das Zurückgreifen auf Tiermodelle erschwert [61]. Humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSCs) bringen Eigenschaften mit sich, die zur Entwicklung physiologisch relevanter In-vitro-Modelle für die humane Lunge vielversprechend sind. Bis aus hiPSCs generierte Lungenzelltypen eine ausreichende Qualität aufweisen, um sie in präklinischer und klinischer Forschung einsetzen zu können, müssen bestehende Hürden überwunden werden [162]. Zu diesen zählt beispielsweise auch das Finden einer geeigneten Strategie, den komplex ablaufenden Differenzierungsprozess im Hochdurchsatz ökonomisch und reproduzierbar durchzuführen zu machen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die in zwei Differenzierungsstrategien (2D und 3D) generierten alveolaren Epithelzellen aus hiPSCs hinsichtlich ihrer Gen- und Proteinexpression in den einzelnen Differenzierungsstufen untersucht. So konnte demonstriert werden, dass das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Protokoll für die 2D-Differenzierung stabil und reproduzierbar ist und sich auf die Bioreaktor-basierte 3D-Differenzierung transferieren lässt. Das entwickelte, uniforme 2D-/3D-Protokoll eignet sich außerdem zur Differenzierung alveolarer Epithelzellen aus Cystische Fibrose-Krankheitszelllinien und ist auch für die SARS-CoV-2-Forschung einsetzbar. Dieser vielversprechende Differenzierungsansatz könnte somit in Zukunft für die Generierung alveolarer Epithelzellen aus hiPSCs in der Entwicklung neuer Medikamente eingesetzt werden.

### 5.1. Verwendete Zelllinien

Zur Durchführung der Gen- und Proteinexpressionsanalyse wurden mindestens drei hiPS-Zelllinien verschiedener Spender festgelegt, damit die statistische Aussagekraft der Ergebnisse erhöht wird. Experimentelle Arbeiten mit hiPSCs unterliegen Schwankungen, da es sich von der Entnahme der Spenderzellen, über die Reprogrammierung und Differenzierung bis hin zum gewünschten Zelltyp, um einen mehrstufigen Prozess handelt, in denen sich kleine Varianzen summieren und zu unterschiedlichen Ergebnissen führen können [163]. Die Schwankungen zwischen einzelnen Zelllinien aus unterschiedlichen Spendern aufgrund ihres variierenden genetischen Hintergrundes wurde dabei oftmals als eine der größten Variabilitätsursachen festgestellt [95, 164]. Aber auch das epi-

genetische Gedächtnis oder neu erlangte Eigenschaften während des Reprogrammierungsprozesses spielen vermutlich eine Rolle [162]. Daher ist es zur Entwicklung eines robusten und reproduzierbaren Differenzierungsprotokolls unerlässlich, auf mehrere Zelllinien verschiedener Spender zurückzugreifen [163, 165]. Im Falle der vergleichenden Analyse in der vorliegenden Arbeit, ermöglichte das Heranziehen mehrerer Zelllinien, aufgetretene Unterschiede in der Gen- und Proteinexpression auf die jeweilige Differenzierungsmethode (2D und 3D) zurückzuführen. Die ersten drei Differenzierungsstufen wurden mit drei qualitätskontrollierten EBiSC-Zelllinien gesunder Spender, UKKi011-A, UKBi005-A und BIONi010-C, durchgeführt [93]. Jede der verwendeten Zelllinien wurde aus Fibroblasten generiert, die von Spendern unterschiedlichen Alters stammen. Alle Spender waren männlich, mit Ausnahme einer Spenderin, aus deren Fibroblasten mithilfe eines integrierten Retrovirus die Zelllinie UKBi005-A generiert wurde. Alle anderen, männlichen, Ausgangszellen wurden episomal reprogrammiert. Um Rückschlüsse auf eventuell auftretende Unterschiede in der alveolaren Differenzierung aufgrund von Eigenschaften wie Reprogrammierungsmethode, Alter oder Geschlecht des Spenders ziehen zu können, müssten mindestens drei Zelllinien, die jeweils die gleichen Eigenschaften aufweisen, untersucht und miteinander verglichen werden. Dies war jedoch nicht der Forschungsgegenstand dieser Arbeit, weshalb aufgetretene Expressionsunterschiede zwischen verschiedenen Zelllinien nicht sicher auf ihre Herkunft oder Reprogrammierungsart in dieser Arbeit zurückführbar sind. Da jedoch alle Zelllinien aus Fibroblasten generiert wurden, kann zumindest der Ausgangszelltyp als Grund für Differenzierungsunterschiede ausgeschlossen werden. Die finalen Differenzierungsstufen, alveolare Epithelzellen Typ 2 (AT2) und Typ 1 (AT1), wurden neben den drei gesunden Zelllinien mit zwei weiteren hiPS-Zelllinien durchgeführt, die in ihrem Erbgut die F508del-Mutation tragen, die für 70 % aller CF-Fälle weltweit verantwortlich ist [46]. So sollte die Übertragbarkeit des entwickelten Differenzierungsprotokolls auf Krankheitszelllinien demonstriert werden. Die Zelllinien, die als CF-Modelllinien in dieser Arbeit dienten, trugen beide die F508del-Mutation in ihrem Erbgut, jedoch aufgrund unterschiedlicher Ursachen. DYP0250 stammt aus einem 16-jährigen, männlichen CF-Patienten, der homozygot für diese Mutation ist. Die Ausgangszellen für diese Zelllinie trugen also bereits diese Mutation und auch in den reprogrammierten hiPSCs wurde sie erneut vom Hersteller nachgewiesen. Solche hiPS-Zelllinien aus CF-Patienten, wie sie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, eignen sich für Ansätze in der personalisierten Medizin, um die Effektivität eines Medikaments vorab auf zellulärer und molekularer Ebene zu testen und die beste Therapie für jeden CF-Patienten zu finden [71]. Im Falle sehr seltener Mutationen, für die es bislang keine therapeutischen Ansätze gibt, sind solche hiPS-Zelllinien wertvolle Testmodelle für die Entwicklung von Pharmazeutika [55]. Daher wird auch die Errichtung einer CF-Biobank angestrebt, um die personalisierte CF-Therapie voranzutreiben [54]. Die erfolgreiche Generierung von hiPS-Zelllinien aus CF-Spenderzellen mit unterschiedlichen Mutationen, meist Keratinozyten,

Haut-Fibroblasten, oder CD34<sup>+</sup>-Zellen aus Blut wurden bereits mit verschiedenen Reprogrammierungsansätzen beschrieben [166–169]. hiPS-Zelllinien mit CF-Mutation konnten bereits erfolgreich in Lungenvorläuferzellen [55], Atemwegsepithelzellen [150], Atemwegsorganoiden [151] und Darmorganoiden [170] differenziert werden. An den Atemwegs- und Darmorganoiden konnte außerdem ein Forskolin-induziertes Anschwellen erzeugt werden, um die CFTR-Aktivität *in vitro* zu bestimmen. Dieser Test kann eingesetzt werden, um ein Ansprechen der CFTR-Funktion auf Modulatoren in CF-Patienten zu überprüfen [171]. Denkbar wäre auch die zukünftige Anwendung dieses Assays auf die in dieser Arbeit generierten alveolaren Sphäroide.

Als zweite CF-Modelllinie wurde für diese Arbeit eine Genommodifizierung von extern beauftragten Spezialisten (Synthego Inc., USA) an der Parentalzelllinie BIONi010-C vorgenommen. Hierfür wurden sogenannte Knock-in Klone hergestellt, die durch eine CRISPR/Cas-9 Genommodifizierung die F508del-Mutation im CFTR-Gen tragen. BIONi010-C-O16 ist einer dieser Klone und stellt somit eine künstlich erkrankte Modellzelllinie zur isogenen, gesunden Kontrolle BIONi010-C dar. Somit war ein direkter Vergleich zwischen der gesunden BIONi010-C-Zelllinie und der CF-BIONi010-C-O16-Zelllinie möglich, da sie die gleichen genetischen Informationen aufweisen. Eine vergleichbare Generierung einer CF-Modellzelllinie durch das Einfügen der Zielmutation mittels CRISPR/Cas-9 wurde bisher nicht für hiPSCs beschrieben. Es existiert eine Studie, die solch einen Ansatz mit der immortalisierten humanen bronchialen Epithelzelllinie 16HBE14o- beschreibt. Aus dieser geht hervor, dass drei CF-Mutationen durch CRISPR/Cas-9-Modifizierung in die Zellen eingebracht wurden, und so drei isogene CF-Zelllinien mit unbegrenztem Zugang zur CF-Modellierung hergestellt werden konnten [172]. Die Generierung solcher isogener Kontrollpaare kann für die personalisierte Medikamenten- und Toxizitätstestung als ein sehr vielversprechendes Werkzeug angesehen werden, da sie es erlauben, die Wirkung eines Medikaments am kranken Individuum zu testen und sie an einer gesunden Kopie zu verifizieren [173]. Die CRISPR/Cas-9-Technologie, die DNA-Abschnitte sehr gezielt modifiziert, läutete aber auch ein neues Zeitalter in der Gentherapie vererbbarer Krankheiten mit Hoffnung auf Heilung ein [38]. Im Falle von F508del konnte die Mutation in primären und hiPSC-abgeleiteten Atemwegszellen bereits korrigiert werden [174–176]. Klinische Studien zum In-vivo-Transfer modifizierter Zellen in die Atemwege laufen derzeit, bahnbrechende Erfolge konnten jedoch noch keine erzielt werden [38, 177, 178].

## 5.2. 2D- und 3D-Differenzierungsstrategien

2D- und 3D-Differenzierungsstrategien bringen sowohl Vor- als auch Nachteile für den Differenzierungsprozess und für dessen spätere Anwendung in der pharmazeutischen Forschung und Industrie mit sich. Die 2D-Zellkultur vertraut auf die Adhärenz der Zellen auf planaren Oberflächen, meist Polystyrol, um Zellen eine mechanische Stütze zum Wachstum zur Verfügung zu stellen [138]. Dabei erlangen die Zellen stets gleiche Mengen an Nährstoffen und Wachstumsfaktoren, was zu einem gleichmäßigen Wachstum und Zellteilung führt [138, 179]. Diese Charakteristika und ihre Effektivität, Simplizität und vergleichbar geringen Kosten machen 2D-Zellkulturen für die Forschung attraktiv, weshalb sie als potentielle Differenzierungsstrategie in dieser Arbeit untersucht wurde. Dennoch weichen sie hinsichtlich des Zellverhaltens erheblich von den Bedingungen *in vivo* ab. So wurde festgestellt, dass einige Charakteristika von Tumorzellen in 2D nicht abgebildet werden können [180, 181]. Die 3D-Zellkultur kann die Umgebung einer Zelle *in vivo* sehr viel besser simulieren, da Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen, die im Körper die Funktion der Organe steuern, involviert sind [138, 179].

In dieser Arbeit wurde die alveolare Epithelzelldifferenzierung von hiPSCs in einem 2D- und 3D-Modell entwickelt und vergleichend untersucht, um Unterschiede im Differenzierungsverhalten der Zellen, abhängig von der Zellkulturumgebung zu bestimmen. Als 2D-Differenzierungsmodell wurde hierfür die planare Kultivierung in Matrix-beschichteten Polystyrol-Platten ausgewählt. Die EZM-Beschichtung (Matrigel®) stellt dabei den Zellen eine physiologische Wachstums Umgebung aus Proteinen wie Laminin, Kollagen und Entaktin zur Verfügung und wird bei der Kultivierung von Stammzellen zum Erhalt der Pluripotenz benötigt [159, 182]. Die Proteinmischung wird aus dem Engelbreth-Holm-Swarm-Sarkom in Mäusen gewonnen und enthält laut einer Proteomanalyse mehr als 1800 verschiedene Proteine [159]. Es handelt sich daher um eine sehr komplexe Proteinmischung undefinierter Natur, dessen Auswirkung auf die Zell-Differenzierung schwer nachzuvollziehen ist [159]. Eine Studie berichtete von der Beobachtung, dass primäre Hepatozyten bei 2D-Kultivierung auf EZM tumorösen Ursprungs de-differenzierten [183], während eine weitere Studie von positiven Effekten berichtete, welches Matrigel® auf die Differenzierung von dopaminergen Neuronen brachte [184]. Matrigel® wird auch zur Generierung von 3D-Modellen wie Organoiden verwendet [139, 185–187]. Aufgrund der genannten Limitationen und aufgrund des spezie fremden Ursprungs, der es nicht erlaubt, Organoide mit Matrigel®-Bestandteilen für Transplantationszwecke einzusetzen, wird für eine Entwicklung von Matrigel®-freien 3D-Modellen plädiert [188]. Auch das Tierleid, das zur Produktion von Matrigel® in Kauf genommen wird, sollte stets berücksichtigt werden.

Das in dieser Arbeit verwendete 3D-Differenzierungsmodell ist frei von Matrigel® und anderen Gerüststrukturen (Mikrocarrier), es handelt sich um eine Aggregatsuspensionskultur. Die

Kultivierung von Aggregaten verbessert die biologischen Eigenschaften von Zellen, verglichen zu 2D-Monolayern, was sich in einer erhöhten Zellviabilität, Proliferation und Differenzierung zeigt, aber auch ein physiologisch relevanter Metabolismus, Phänotyp und Genotyp wird repräsentiert [189]. Die Aggregatsuspensionskultur in der vorliegenden Arbeit besteht anfänglich aus Embryoid Bodies (EBs). Sie sind eine Sonderform von Zellaggregaten, bilden sich selbst-organisiert aus pluripotenten Stammzellen wie ESCs oder hiPSCs und ahmen zum Teil die frühe Embryonalentwicklung nach. EBs dienen als idealer Ausgangspunkt für die Differenzierung in die drei Keimblätter, da die Zellaggregate den Mustern eines Embryos entsprechen [142]. Sie wurden in publizierten Protokollen bereits für die Differenzierung zerebraler Organoide [190], neuraler Vorläuferzellen [191], Endothel- und Blutvorläuferzellen [192], Nieren-Organoide [193], Kardiomyozyten [194] oder Hepatozyten [195] als Startpunkt eingesetzt. EBs entstehen durch die Kultur von pluripotenten Einzelzellen in Suspension. In der vorliegenden Arbeit wurde die EBs-Herstellung im CERO 3D-Bioreaktor durchgeführt, der durch alternierende Rotationsbewegungen die Zellen in Suspension hält. Nach 24 Stunden dienten die gebildeten EBs als Ausgangspunkt für die alveolare Epithelzelldifferenzierung unter dynamischen Bedingungen. Im CERO 3D-Bioreaktor wurden ebenfalls aus EBs Kardiosphären [196], Hepatozyten [195], Neuronen [197] und aus mit hiPSCs besiedelten Alginat-Beads renale Vorläuferzellen [157] differenziert. Daneben eignet sich der Bioreaktor zur Kultivierung und Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen [198] und zur Expansion von undifferenzierten hiPSCs [156].

Die Implementierung von Stammzellen und deren abgeleiteter Zelltypen als Testsystem in der präklinischen und klinischen Forschung erfordert automatisierbare, parallelisierbare, simplifizierte und kostengünstige Ansätze zur Stammzellkultivierung. Daher werden spezielle Bioreaktoren, wie Schüttelkolben, Perfusionsbioreaktoren und Spinner-Flaschen eingesetzt, die in der Lage sind, diese Anforderungen zu erfüllen. Sie umfassen allerdings mehrere Liter und benötigen daher große Medien-Volumina, erfahrene Anwender und langwierige und umständliche Vorbereitungen und Durchführungen der Prozesse. Der CERO 3D-Bioreaktor erlaubt es hingegen, verschiedene patientenspezifische Zelllinien parallel zum Biobanking vorzubereiten oder als Testsystem in bis zu vier 50 ml-Suspensionsgefäßen zu differenzieren [157]. Durch die hydrodynamischen Bedingungen, die in der Suspensionskultur herrschen, wird eine homogene Nährstoffversorgung erzielt [157]. Durch die Einstellung der Rotationsparameter ist der im System herrschende Scherstress durch die Bewegung der Flüssigkeit reproduzierbar. Dieser mechanische Stimulus fehlt in statischen 2D-Kulturen gänzlich. Dabei sind fluidische Bewegungen im Organismus fundamental für die Organogenese, zelluläre Signalgebungen und Organfunktionen. Zellen sind in der Lage, mechanische Kräfte zu spüren und sie in biologische Antworten umzuwandeln. Die Mechanismen, die diesem Zellverhalten zugrunde liegen sind komplex, zumeist aber auf Oberflächenrezeptoren,

Zelladhäsionsmoleküle und heterodimere G-Proteine zurückzuführen [199]. In primären Hepatozyten hat Scherstress in mehreren Studien dazu geführt, dass die Zellviabilität und die CYP450 Expression erhöht wurde. Insbesondere die Differenzierung von Endothelzellen aus PSC werden durch die dynamischen Kräfte, die sie auch *in vivo* erfahren, stimuliert [200–202]. Es gibt eindeutige Beweise, dass mechanische Kräfte bei der Bildung embryonaler Gewebe beteiligt sind. Daher exprimieren EBs unter dynamischen Bedingungen Pluripotenzmarker höher und reifen ausgeprägter und homogener, als EBs unter statischen Bedingungen [203]. Die Auswirkungen des dynamischen 3D-Kultivierungssystems auf die Gen- und Proteinexpression während der alveolaren Differenzierung wird im folgendem Kapitel 5.3. beschrieben. Verglichen wurde stets zum bereits beschriebenen, statischen 2D-Modell. Die Durchführung einer vergleichenden Analyse erforderte ein uniformes Protokoll zur alveolaren Epithelzeldifferenzierung. Diese sollte unter 2D-Bedingungen stabil und reproduzierbar durchführbar sein und ebenso auf die Bioreaktor-basierte 3D-Differenzierung übertragbar sein. Zur Entwicklung des Protokolls wurden bereits publizierte Differenzierungsstrategien von pluripotenten Stammzellen zu DE-Zellen [204] und alveolaren Epithelzellen Typ 2 [120] und Typ 1 [153] über die Zwischenstufen des AFE und Lungenvorläuferzellen herangezogen und entsprechend adaptiert. Diese waren entweder Mischformen aus 2D-differenzierten Vorläuferzellen, die zur Reifung in ein 3D-Modell mit Matrigel® übertragen wurden [120], oder es handelte sich um ein 3D-Modell mit enthaltenen Lungenfibroblasten [153]. Da publizierte Strategien zur alveolaren Differenzierung von hiPSCs gewöhnlich 3D-Differenzierungsschritte, wie eine Bildung von EBs oder Organoiden beinhalten und eine 2D-Differenzierungsstrategie nie zuvor publiziert wurde, lag der Verdacht nahe, dass sich hiPSCs unter planaren 2D-Bedingungen nicht in alveolare Epithelzellen differenzieren ließen und komplexe 3D-Bedingungen zwingend erforderlich seien [118, 119]. Durch die Anpassung der bestehenden Differenzierungsprotokolle konnte jedoch in dieser Arbeit ein geeignetes 2D-Differenzierungsprotokoll entwickelt werden, das die Herstellung von AT2 und AT1 erlaubt. Dies konnte durch die Expression relevanter Marker über alle Stufen hinweg bewiesen werden. Der anfänglich bestehende Verdacht konnte somit ausgeräumt und durch eine kürzlich erschienene Publikation unterstützt werden. Diese beschreibt ebenfalls die stufenweise 2D-Differenzierung von hiPSCs in AT2 mit der Besonderheit des miniaturisierten 96-well-Maßstabs und einer Ausreifung an der Air-Liquid-Interface (ALI) [205]. Die unterschiedlichen Kulturbedingungen (2D/3D) erschwerten bei der Entwicklung des Differenzierungsprotokolls die Festlegung geeigneter Konzentrationen an Wachstumsfaktoren und Chemikalien sowie der benötigten Differenzierungsdauer. Die Proliferation läuft beispielsweise unter 2D-Bedingungen unnatürlich schnell ab, während in 3D das Proliferationsverhalten realistisch abgebildet wird. Die Metabolisierung von Substanzen unterscheidet sich zwischen beiden Kulturbedingungen ebenfalls, in 3D-Modellen kann diese physiologischer abgebildet werden [179, 206]. Bezüglich

des Differenzierungsverhaltens von 2D- und 3D-Zellkulturen gibt es ebenso deutliche Unterschiede. Zellen in 3D-Modellen benötigen mehr Zeit zu differenzieren [138]. In einer hämatopoetischen vergleichenden 2D/3D-Differenzierung aus pluripotenten Stammzellen konnte sogar gezeigt werden, dass die intrinsische Hämatopoese unter 2D-Bedingungen nicht induziert werden kann [207]. Auch die Morphologie der Zellen unterscheidet sich, da sie in 3D-Modellen in mehreren Schichten wachsen, innenliegende Zellen von weniger Nährstoffen erreicht werden und ein höherer Druck ausgeübt wird. All diese Parameter stellen bei der Entwicklung einer uniformen 2D- und 3D-Differenzierungsstrategie immerzu Herausforderungen dar, die berücksichtigt und angepasst werden mussten. Bei den aufgezeigten Unterschieden wird außerdem deutlich, dass die auf die Differenzierung einflussnehmenden Parameter im dynamischen 3D-Modell physiologischer abgebildet werden können, als im 2D-Monolayer.

### 5.3. Vergleichende Gen- und Proteinexpressionsanalyse

Die Gen- und Proteinexpressionsmuster von 2D-kultivierten Zellen weichen laut Literatur enorm von In-vivo-Modellen ab, während solche von 3D-kultivierten Zellen meist den Zelltypen *in vivo* entsprechen [179]. Anhand einer vergleichenden Gen- und Proteinexpressionsanalyse von 2D- und 3D-differenzierten Zellen sollten in dieser Arbeit Unterschiede im Verlauf der einzelnen Entwicklungsstufen in Abhängigkeit von der Differenzierungsmethode bestimmt werden, um eingehende Kenntnisse zum Differenzierungsverhalten von hiPSCs in alveolare Epithelzellen zu erhalten. Dieses Wissen ist für die Implementierung von alveolaren Epithelzellen in der prä-klinischen und klinischen Forschung notwendig, damit geeignete Differenzierungsstrategien zur Herstellung qualitativer und funktioneller Zelltypen angewendet werden können.

Bei der Interpretation der Ergebnisse ist die Berücksichtigung der zeitlichen Verschiebung von Gen- und Proteinexpression sehr wichtig. Beide Analysen wurden zu den gleichen Zeitpunkten durchgeführt, wodurch man eine Momentaufnahme der Genexpression zu diesem Zeitpunkt und eine Momentaufnahme der Proteinexpression zum gleichen Zeitpunkt erhält. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass die Genexpression der Proteinexpression zeitlich vorangeht, das heißt bei einer hohen Proteinexpression muss eine hohe Genexpression vorangegangen sein. Zum Analysezeitpunkt kann diese aber aufgrund der bereits ablaufenden Proteinsynthese wieder herunterreguliert worden sein [208].

In den ersten beiden analysierten Differenzierungsstufen, die die frühen Entwicklungsstufen der Lunge im Embryo repräsentieren, DE und AFE, wurden Unterschiede in der Gen- und Proteinexpression zwischen 2D und 3D, insbesondere hinsichtlich der Expression des Transkriptionsfaktors FOXA2, bestimmt. Da FOXA2 in allen untersuchten Zelllinien sowohl auf Gen-, als auch

auf Proteinexpressionsebene in 3D signifikant stärker exprimiert war, als in 2D, kann gefolgert werden, dass die FOXA2-Expression unter dynamischen 3D-Bedingungen im EB stärker aktiviert wird, als unter statischen 2D-Bedingungen. Dies gilt auch für die CXCR4-Genexpression in DE-Zellen, die in allen untersuchten Zelllinien signifikant höher war. Dass diese Beobachtung gerade in den frühen Differenzierungsstufen in 3D auftrat, kann mit hoher Wahrscheinlichkeit mit der dynamischen Umgebung und der strukturellen Anordnung der EBs begründet werden. Wie im vorherigen Kapitel 5.2. bereits beschrieben wurde, erfahren auch embryonale Stammzellen *in vivo* Scherstress und werden zur Organogenese angeregt. Die dynamische 3D-Differenzierung simuliert für dieses ablaufende Szenario Stammzellnischen offensichtlich besser, als die statische 2D-Kultivierung. Zudem ähnelt der Aufbau von EBs dem eines frühen Embryos, der in späteren Entwicklungsstufen an Komplexität zunimmt und die strukturellen Unterschiede zwischen *in vivo* und 2D/3D immer größer werden. In darauffolgenden Differenzierungsstufen, die den späteren Entwicklungsstadien der Lunge entsprechen, konnten daher solche signifikanten Unterschiede, die alle Zelllinien gleichermaßen betreffen, nicht mehr bestimmt werden. Es handelte sich um einzelne aufgetretene Unterschiede, die verschiedene Marker, verschiedene Zeitpunkte und verschiedene Zelllinien betrafen. Die Differenzierung von NKX2.1<sup>+</sup>-Lungenvorläuferzellen wurde in der Literatur mit einer Ausbeute von 20-90 % positiver Zellen pro Differenzierungsansatz als anspruchsvoll und zelllinienabhängig beschrieben [120]. In der vorliegenden Arbeit konnten unabhängig von der Zelllinie und der Kulturbedingung mehr als 90 % NKX2.1<sup>+</sup>-LP-Zellen generiert werden. Vermutlich lässt sich dies auf die erhöhte Retinsäure-Konzentration im Differenzierungsmedium zurückführen, die im Zuge der Entwicklung eines uniformen 2D-/3D-Differenzierungsprotokolls von 100 nM auf 500 nM erhöht wurde. Die 3D-Generierung von NKX2.1<sup>+</sup>-LP-Zellen gelang mit der zunächst geringen Retinsäurekonzentration, die für eine 2D-Differenzierung in der Literatur beschrieben ist, nicht, weshalb sie im Rahmen dieser Arbeit erhöht werden musste. Dies ist auf den vorher beschriebenen Zusammenhang der abweichenden Metabolisierung von Substanzen in 2D- und 3D-Modellen zurückzuführen. Um den gleichen Effekt einer Substanz in 3D zu erzielen, wie in 2D, muss die Dosis für gewöhnlich erhöht werden [206]. Da Retinsäure als ein kritischer regulatorischer Faktor während der Embryonalentwicklung der Lunge identifiziert wurde und ebenso bei der post-natalen Alveolarisierung eine wichtige Rolle spielt, war die Erhöhung der Dosis in diesem Fall zur Steigerung der Differenzierungseffizienz ausschlaggebend [209]. Die 2D- und 3D-differenzierten LP-Zellen wurden auch als SOX9<sup>+</sup> identifiziert und stellen somit einen idealen Ausgangspunkt zur alveolaren Ausreifung dar, da SOX9 während der Lungenmorphogenese in den distalen Verzweigungsenden exprimiert und gleichzeitig mit der Bildung von AT2 und AT1 herunterreguliert wird [210]. Die effektive Differenzierung von AT2 aus NKX2.1<sup>+</sup>/SOX9<sup>+</sup>-LP-Zellen unter 2D- und 3D-Bedingungen konnte durch die Expression der Surfactantproteine C, B und D sowie der funktionellen Membranproteine



CFTR, ACE2 und TMPRSS2 auf Gen- und Proteinexpressionsebene nachgewiesen werden. AT2 synthetisieren, sekretieren und recyceln alle Komponente des Lungensurfactants. SP-C ist das einzige der vier Surfactantproteine, das nur von AT2 und keinem anderen Zelltyp im Körper hergestellt werden kann. Es ist daher ein sehr wichtiger und spezifischer Marker dieses Zelltyps. Die Synthese von SP-B hängt wiederum über den sekretorischen Signalweg der AT2-Zelle und den LBs mit der SP-C-Synthese zusammen [8]. So ließe sich erklären, weshalb die Proteinexpression von SP-C und SP-B in den analysierten Zellen stets vergleichbar war. Die Anwesenheit von LBs ist für die Synthese der beiden Surfactantproteine vorausgesetzt. Die speziellen Organellen wurden in dieser Arbeit zwar nicht transmissionselektronenmikroskopisch nachgewiesen, ohne deren Präsenz wäre ein SP-C- und SP-B-Nachweis auf Proteinebene aber ausgeblieben, auch wenn sie auf Genexpressionsebene detektiert werden könnten [115]. Durch den Nachweis der beiden Surfactant-Bestandteile auf Proteinebene kann daher davon ausgegangen werden, dass die LBs in den 2D- und 3D-differenzierten AT2 vorhanden sein müssen. Während SP-C und SP-B hydrophob sind und die alveolare Oberflächenspannung zum Ermöglichen des Atmungsprozesses herabsetzen, ist SP-D ein hydrophiles Surfactantprotein, das nicht von LBs gebildet wird. Gemeinsam mit SP-A, das in dieser Arbeit nicht analysiert wurde, gehört es zur Familie der Kollektine und ist Teil der angeborenen Immunabwehr der Lunge. Sie erkennen und opsonieren eindringende Pathogene und rekrutieren Immunzellen in die Alveole. SP-D wurde ebenfalls von den in dieser Arbeit differenzierten AT2 synthetisiert. Es konnte somit gezeigt werden, dass die Surfactantsynthese unter beiden untersuchten Kulturbedingungen stattfindet. Hinsichtlich der Genexpression zeigte sich jedoch eine enorme Diskrepanz zwischen der Surfactantproteinexpression in der mRNA von 2D- und 3D-differenzierten AT2 aus hiPSCs und der mRNA aus adulter humaner Lunge. Zwar lagen 3D-differenzierte AT2 an Tag 30 näher an den Werten der adulten Lunge, als 2D-differenzierte AT2, dieser Unterschied war jedoch vernachlässigbar im Hinblick auf den über 200.000-fachen Expressionsunterschied zur adulten Lunge. Es ist im Allgemeinen bekannt, dass aus hiPSCs differenzierte Zelltypen einen fetal-ähnlichen Zustand erlangen [80, 211, 212] und auch aus hiPSCs generierte Lungenzelltypen eher des Stadiums der fetalen Lunge zuzuordnen sind, als der adulten [139]. Daher werden bei einigen Studien murine oder humane fetale Lunge als Referenzmaterial herangezogen [119, 139, 213]. Berücksichtigt man die Tatsache, dass der Prozess der Alveolarisierung ein lang andauernder ist, der ab der 36. Schwangerschaftswoche stattfindet und bis zum Ende des dritten Lebensjahres fortgeführt wird, ist es kaum verwunderlich, dass in einer 30-tägigen Differenzierung *in vitro* nicht der Reifegrad einer adulten Lunge erzielt wird. Zudem ist die vollständige Ausreifung der adulten Lunge erst im frühen Erwachsenenalter abgeschlossen und findet durch Kontakt und Durchflutung mit Luft unter Atmungsbewegungen statt [114, 214]. Dieses Szenario wird in den hier verwendeten Differenzierungsstrategien nicht abgebildet. In aktuellen Studien geht man davon aus, dass eine

erhöhte Reifung, insbesondere bezüglich der Surfactantproteine, unter ALI-Bedingungen erzielt werden kann [205, 215–217]. Weitere Studien berichten von einer ausgeprägten Differenzierung primärer fetaler AT2 unter mechanischer Dehnung [218, 219]. In dieser Arbeit konnte auch ein Zusammenhang der Kultivierungsdauer und der Proteinexpression von AT2-Markern in 2D und 3D gezeigt werden. Bei Betrachtung der Proteinexpression nach 23 Tagen und 30 Tagen 2D-Differenzierung wird deutlich, dass die Proteinsynthese zugenommen hat oder zumindest konstant blieb, während sie in 3D an Tag 30, verglichen zu Tag 23, geringer ausfiel. An Tag 30 war jedoch die Genexpression dieser Marker in 3D höher, was dafürspricht, dass die Genexpression hochreguliert wurde und darauf eine höhere Proteinexpression folgte.

Neben den Surfactantproteinen wurden weitere spezifische Marker, die von AT2 exprimiert werden und für die spätere Anwendung eine Rolle spielen, untersucht. CFTR, das bei einer F508del-Mutation fehlerhaft vorliegt und so die Aufgabe des Ionentransports über die Zellmembran nicht erfüllen kann, wurde sowohl in den aus gesunden, als auch aus den CF-Modelllinien differenzierten AT2 exprimiert. Die Stärke der Gen- und Proteinexpression von CFTR unterschied sich dabei zwischen den gesunden und kranken Zelllinien nicht voneinander. Die mRNA für CFTR wird nämlich in Zelllinien aus CF-Spendern ebenfalls gebildet, nur enthält diese die Mutation, die sich erst bei der ablaufenden Proteinsynthese bemerkbar macht. Die Mutation führt zu einer inkorrekten Faltung des CFTR-Proteins, die vom Endoplasmatischen Retikulum erkannt wird und in Folge dessen durch Zellproteasen abgebaut wird, bevor es die Zelloberfläche erreicht [220]. Im Zytosol befindet sich jedoch trotzdem ständig die missgefaltete, unreife Form von CFTR, das somit auf Proteinebene in der Analyse nachgewiesen werden kann. Verglich man 2D- mit 3D-differenzierten AT2, wurde CFTR zu beiden Analysezeitpunkten in 3D stets stärker exprimiert. Die Proteinexpressionstärke unterschied sich zu diesen untersuchten Zeitpunkten jedoch nicht zwischen den Differenzierungsbedingungen. Hier muss sich erneut ins Gedächtnis gerufen werden, dass ein späterer Analysezeitpunkt auch eine eventuell höhere Proteinexpression in 3D ergeben hätte, da die Genexpression, die vorausging, ebenfalls in 3D höher vorlag. In einigen der untersuchten Zelllinien konnten durch die 3D-Differenzierung sogar Genexpressionen erzielt werden, die mit den Werten aus der adulten Lunge übereinstimmen. Die Werte, die hingegen durch eine 2D-Differenzierung erreicht wurden, lagen deutlich darunter. Diese Erkenntnis spricht erneut für die physiologischere Simulation der In-vivo-Situation durch eine 3D-Kultivierung. Während eine starke Surfactantproteinexpression in AT2-Zellen für ein reiferes Entwicklungsstadium der Lunge spricht, ist über die physiologische Anzahl an CFTR-Kanälen auf der Zelloberfläche von Lungenzellen nichts bekannt. Die Ergebnisse der Genexpressionsstudie sprechen aber dafür, dass CFTR bereits in den 3D-differenzierten AT2-Zellen aus hiPSCs einem fortgeschrittenen Entwicklungsstand entspricht, der mit dem der adulten Lunge vergleichbar ist. Dass die endogene Expression von CFTR verglichen zu SP-C sehr gering sein soll [221], wurde durch die Messungen der adulten humanen Lungen-

RNA ebenfalls bestätigt. Würde man bezüglich der Funktionalität des CFTR-Kanals weitere Untersuchungen durchführen und zwischen gesunden und CF-Zelllinien vergleichen, müsste aufgrund der unreifen Form von CFTR ein Funktionsnachweis in den CF-Zelllinien ausbleiben, während sie bei gesunden Zelllinien physiologische Ergebnisse liefern müssten. Geeignet wäre dazu beispielsweise die Patch-Clamp-Technik [222] oder das Forskolin-induzierte Anschwellen [151, 223, 224]. Ein isogenes Kontrollpaar, wie es in dieser Arbeit Anwendung fand, ist hierfür prädestiniert, da man einen direkten Vergleich genetisch identischer Zellen mit und ohne F508del-Mutation und deren Auswirkung auf die CFTR-Funktionalität durchführen kann. Eine weitere Mutation heranzuziehen, die zu einer verringerten Bildung von CFTR führt, wäre für das Verständnis der vorkommenden Menge an CFTR und für die Interpretation der Ergebnisse hilfreich.

Des Weiteren wurde die Gen- und Proteinexpression von ACE2 und TMPRSS2, welche ebenfalls charakteristische Merkmale von AT2 sind, in 2D- und 3D-differenzierten AT2 aus gesunden und CF-hiPS-Zelllinien verglichen. Sie wurden als Zielproteine von SARS-CoV-2 identifiziert und neben der Lunge, auch in Herz, Nieren, Gastrointestinaltrakt, Leber, Gehirn, Pankreas, Schilddrüse und Prostata vorgefunden [225]. In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden Membranproteine auf Gen- und Proteinexpressionsebene erfolgreich in AT2 aus hiPSCs nachgewiesen, dabei waren sie auf Genebene in einzelnen Zelllinien zu beiden Analysezeitpunkten in 3D höher exprimiert. Die bereits diskutierten Einflussfaktoren und Unterschiede, die zwischen 2D- und 3D-Kulturbedingungen bestehen, könnten hierauf ebenfalls Einfluss genommen haben. In einigen der untersuchten Zelllinien konnten durch beide Differenzierungsbedingungen Genexpressionswerte erreicht werden, die mit der adulten humanen Lunge auf einem vergleichbaren Niveau liegen. Dabei war stets die 3D-Differenzierung der 2D-Differenzierung, wie auch bei CFTR, überlegen. Auf Proteinexpressionsebene gab es keine Unterschiede der ACE2- und TMPRSS2-Expression zwischen 2D- und 3D-differenzierten AT2, mit Ausnahme der aus der BIONi010-C-O16-Zelllinie differenzierten AT2, die 3D signifikant mehr ACE2-Antigene aufwies. Eine erhöhte Anzahl von ACE2-Rezeptoren auf der Zelloberfläche steht in Verdacht, schwerere COVID-19 Erkrankungen auszulösen, da mehr Viruspartikel in die Zelle eindringen können [22]. Die Funktionalität von ACE2 und TMPRSS2 wurde in 2D- und 3D-differenzierten AT2 aus hiPSCs mittels Pseudoviren nachgewiesen und wird in nachfolgendem Kapitel 5.4. diskutiert.

Von aus Primärmaterial gewonnenen AT2 ist bekannt, dass sie schnell in einen AT1-assoziierten Phänotyp differenzieren, wenn sie auf flachen Oberflächen kultiviert werden [115, 226]. Dies stellt ein Problem dar, wenn AT2 als Forschungsgegenstand, wie beispielsweise in der SARS-CoV-2-Wirkstofftestung, benötigt werden, aber nicht in Kultur gehalten werden können. Von hiPSC-abgeleitete AT2 können die bestehenden Limitationen von Primärzellen umgehen, da sie selbst-erneuernde Eigenschaften besitzen [120]. Es wurde vermutet, dass der beschriebene Prozess der

Transdifferenzierung von AT2, der auch *in vivo* nach Verlust von AT1 natürlicherweise auftritt, unter 3D-Bedingungen nicht abgebildet werden kann, da die benötigte Stammzellnische aufgrund des Fehlens von mesenchymalen Lungenzellen nicht nachgeahmt werden könne [227]. Weitere publizierte Arbeiten wiesen auf die Aufrechterhaltung der Stammzeleigenschaften von AT2 unter 3D-Kulturbedingungen hin [226]. Aus hiPSCs differenzierte Alveolosphären, die viele natürliche Eigenschaften mit primären AT2 teilen, wurden als nicht bereitwillig beschrieben, in AT1 zu differenzieren [120], was die zuvor aufgestellte Hypothese bestärkt. Kürzlich publizierten Kanagaki et. al. eine Methode, hiPSC-abgeleitete AT2 unter 3D-Bedingungen in Organoiden mit und ohne Fibroblasten über die Inhibierung des WNT-Signalwegs in AT1 zu differenzieren [153]. Es wurde beschrieben, dass in Fibroblasten-enthaltenden Organoiden mehr AT1 mit transkriptomischen Ähnlichkeiten zu primären AT1 gewonnen werden konnten, als in Fibroblasten-freien Organoiden oder durch eine 2D-basierte Differenzierung. Die Autoren beschrieben Fibroblasten-enthaltende alveolare Organoiden als eine vielversprechende In-vitro-Methode, den Differenzierungsprozess von AT2 in AT1 zu untersuchen [153]. In dieser Arbeit wurde das Konzept der WNT-Signalweg-Inhibierung angewendet, um 2D- und 3D-differenzierte AT2 in AT1 zu differenzieren. So konnte hier demonstriert werden, dass die zuvor gewonnenen AT2 in der Lage waren, als natürliche Vorläuferzellen zu dienen und in AQP5-, CAV1- und PDPN-positive AT1 unter beiden Kulturbedingungen zu differenzieren. Auf Genexpressionsebene waren die AT1-Marker zum Analysezeitpunkt nur schwach exprimiert und bei drei der fünf untersuchten Zelllinien gab es signifikante Unterschiede zwischen der Genexpressionsstärke von 2D- und 3D-differenzierten AT1. Dabei wiesen stets 2D-differenzierte AT1 die stärkere Genexpression der definierten Marker auf und auch auf Proteinebene exprimierten mehr 2D-differenzierte Zellen die AT1-Marker. 3D-differenzierte Zellen müssen hingegen mehr Antigene exprimiert haben, da die Proteinexpressionsstärke sich nicht signifikant von 2D-differenzierten Zellen unterschied. Der Prozess der Transdifferenzierung von AT2 in AT1 konnte somit auch im dynamischen 3D-System abgebildet werden, obwohl keine Basalmembran, mesenchymale Zellen oder Fibroblasten in dem Modell vorhanden waren. Da dies bisher in der Literatur nicht beschrieben wurde, stellt das Bioreaktor-basierte 3D-Modell eine neue Möglichkeit dar, AT1 aus hiPSCs im 3D-Modell ohne Basalmembran zu generieren und sie für die präklinische Forschung einzusetzen. Im Vergleich zur adulten Lunge traten keine etwaigen starken Diskrepanzen zu den 2D- und 3D-differenzierten Zellen auf, wie es bei AT2 der Fall war, da die untersuchten AT1-Marker in adulter Lunge verglichen zu den Surfactantproteinen in AT2 schwach exprimiert waren. PDPN war in adulter Lunge weniger exprimiert, als in 2D- und 3D-differenzierten AT1 aus hiPSCs. Das kann durch das erhöhte Vorkommen von PDPN während der embryonalen Lungenentwicklung und Ausbildung der Alveoli erklärt werden, welches im ausgereiften Zustand der Lunge abnimmt [228]. Diese Beobachtung spricht erneut für die Tatsache, dass es sich bei den differenzierten alveolaren Epithelzellen um

solche in der späten embryonalen Entwicklung handelt, die keinem reifen, sondern einem fetal-ähnlichen Stadium der humanen Lunge entsprechen.

#### 5.4. SARS-CoV-2-Pseudovirus-Infektion von AT2

Da AT2 als Zielzellen von SARS-CoV-2 identifiziert wurden, sind sie derzeit gefragte Zelltypen in der Wirksamkeitstestung bestehender oder neu entwickelter pharmazeutischer Substanzen gegen SARS-CoV-2 [23]. Die Infektion von hiPSC-abgeleiteten AT2 mit dem Virus wurde kürzlich bereits von einer im Feld der hiPSC-Lungendifferenzierung führenden Arbeitsgruppe publiziert [229]. In dieser Arbeit sollte die Funktionalität der exprimierten Membranproteine ACE2 und TMPRSS2 mithilfe von SARS-CoV-2-eGFP-Pseudoviren in 2D- und 3D-differenzierten AT2 demonstriert und verglichen werden. 2D- und 3D-differenzierte AT2 aus allen verwendeten Zelllinien dienten als Wirtszelle für das Virus, was das Auftreten von *fluorescence forming units*, die das Eindringen des Pseudovirus und die anschließende Expression von eGFP in der Wirtszelle anzeigen, bewies. In der Anzahl infizierter Zellen zwischen 2D- und 3D-differenzierten Zellen konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Ein Zusammenhang der ACE2-Expression mit der Anzahl der infizierten Zellen konnte bei einer Zelllinie, BIONi010-C-O16, beobachtet werden. Wie zuvor bereits erwähnt wurde, exprimierten AT2 aus dieser Zelllinie in 3D mehr ACE2-Antigene auf der Zelloberfläche, als die anderen Zelllinien. Dementsprechend waren mehr der 3D-differenzierten Zellen aus dieser Zelllinie infiziert worden. Da diese Beobachtungen in der parentalen Zelllinie nicht auftraten, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die erhöhte ACE2-Expression im Zusammenhang mit der mittels Genommodifizierung eingebrachten Mutation im Erbgut der BIONi010-C-O16 steht. Dem entgegen steht, dass AT2, die aus DYP0250 differenziert wurden und aufgrund des angeborenen Erbfehlers die Mutation aufweisen, keine erhöhte ACE2-Expression zeigten. In der Literatur wurde die veränderte ACE2- und TMPRSS2-Expression von CF-Patienten im Vergleich zu gesunden Personen bereits diskutiert. Tatsächlich sollen Mutationen im CFTR-Gen dazu führen, dass mehr ACE2 und weniger TMPRSS2 in Atemwegsepithelzellen von CF-Patienten exprimiert werden [230]. Dies würde bedeuten, dass durch die 3D-Differenzierung von BIONi010-C-O16 die ACE2-Expression eines CF-Patienten wahrheitsgemäß im Vergleich zur gesunden Kontrolle abgebildet werden konnte, nicht wiederum durch DYP0250, zu welcher es jedoch auch keine genetisch identische Kontrolle gab. Dass die TMPRSS2-Expression in CF-Patienten geringer sei, konnte in dieser Arbeit ebenfalls nicht bestätigt werden. Dabei ist aber zu berücksichtigen, dass die Daten aus zitierten Studien aus Atemwegsepithelzellen stammen und nicht aus alveolaren Epithelzellen [230]. Gerade einmal  $1,4 \pm 0,4$  % primär isolierter AT2 sind positiv auf eine ACE2-Expression getestet worden [231]. In dieser Arbeit waren  $20,7 \pm 6,8$  % der 2D-differenzierten AT2 und  $13,2 \pm 9,4$  % der 3D-differenzierten AT2 an Tag 30 ACE2<sup>+</sup>. Die Anzahl ACE2-exprimierender

Zellen liegt bei 3D-Kulturbedingungen also näher an der In-vivo-Situation. Trotz, dass dies ein viel höherer Anteil positiver Zellen darstellt, als er tatsächlich im distalen Bereich der Lunge vorkommt, repräsentieren die hiPSC-abgeleiteten AT2 die In-vivo-Situation realistischer, als die für ACE2 und TMPRSS2 stabil transfizierte Zelllinie HEK293T, die für Neutralisationsassays im Zuge der Wirkstoff- und Impfstofftestung eingesetzt wird. Im Vergleich zu dieser Zelllinie, die bei den Versuchen als Gold-Standard-Kontrolle herangezogen wurde und zu fast 100% infiziert war, verblieb die Infektion von AT2 auf einem physiologisch niedrigen Niveau. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sowohl die 2D- als auch 3D-Differenzierungsstrategie AT2 hervorbrachten, die funktionelle SARS-CoV-2 Zielrezeptoren exprimieren und daher geeignet sind, sie in der Wirkstofftestung für COVID-19 einzusetzen.

### **5.5. Kryokonservierung von LP-Zellen**

Die Anwendung von AT2 als zukünftige Zellquelle für In-vitro-Lungenmodelle erfordert einen jederzeit möglichen Zugriff auf die benötigten Zellen, ohne Wochen- bis Monate andauernde Differenzierungszeiten im Vorfeld hinnehmen zu müssen. Daher wurde in dieser Arbeit die Fähigkeit von 2D-differenzierten LP-Zellen, nach dem Kryokonservierungs- und Auftauprozess in AT2-Zellen weiterdifferenziert zu werden, untersucht. So wäre es möglich, bestimmte Chargen aufzubewahren, um Batch-zu-Batch-Abweichungen zu vermeiden und eine konsistente Qualität bei verkürzter Differenzierungszeit zu gewährleisten [195]. Die Verkürzung der Differenzierungsdauer von vier auf zwei Wochen, würde für die Implementierung von alveolaren Epithelzellen aus hiPSCs in der präklinischen Forschung einen weiteren Vorteil bedeuten.

Die Kryokonservierung stellt bis heute die einzige Möglichkeit dar, lebendes biologisches Material zu lagern. Die Konservierung von Einzelzellsuspensionen kann beispielsweise durch langsames Einfrieren bei einer Abkühlgeschwindigkeit von 1 °C pro Minute erzielt werden. Durch die Bildung von Eiskristallen während des Einfriervorgangs würden Zellen ohne den Einsatz von Gefrierschutzmitteln wie DMSO zerstört werden, daher ist die Verwendung solcher Agenzien vorausgesetzt [232]. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses konventionelle Einfrierverfahren mit einer Abkühlgeschwindigkeit von 1 °C/min bei Einsatz von DMSO als Gefrierschutzmittel für die vierwöchige Kryokonservierung von LP-Zellen im Stickstofftank (-170 °C) mit anschließendem schnellem Auftauen angewendet. Differenzierte oder voll ausgereifte Zellen laufen Gefahr, funktionelle und strukturelle Veränderungen durch den Prozess der Kryokonservierung zu erfahren. Daher sollte für die zwischenzeitliche Konservierung von Zelltypen, kein vollständig ausgereiftes Stadium ausgewählt werden. Änderungen auf molekularer Ebene, die sich meist in der Genexpression zeigen, sind Parameter, die analysiert werden sollten, um Auswirkungen der Kryokonservierung auf den Differenzierungsgrad der Zellen identifizieren zu können [232].

Studien zu kryokonservierten Kardiomyozyten zeigten beispielsweise, dass sie in ihrer Form und Funktion der von nicht-kryokonservierten Kardiomyozyten entsprechen, Langzeit-Analysen jedoch offenbarten, dass Abweichungen in ihrer Schlagfrequenz auftraten. Transkriptom- und Proteomanalysen, metabolische und epigenetische Untersuchungen müssen dazu noch weiter ausgeführt werden [233]. Die aufgetauten LP-Zellen wurden in einen AT2-Phänotyp 2D-differenziert und anschließend hinsichtlich ihrer Gen- und Proteinexpression von AT2-Markern untersucht. Der Prozess der Kryokonservierung wurde in dieser Arbeit nur im 2D-System angewendet, da die Fähigkeit von LP-Zellen, ihren Differenzierungsstatus beizubehalten, zunächst an Einzelzellsuspensionen überprüft werden sollte. Während Einzelzellen im Allgemeinen durch das langsame Einfrieren zufriedenstellend konserviert werden können, bestehen zurzeit für das Einfrieren von 3D-Modellen wie Sphäroiden oder Organoiden Limitationen. So kann in 3D-Systemen mit konventionellen Einfrieremethoden bisher kein homogener Wärme- und Stofftransport gewährleistet werden, was zur Bildung von großen Temperaturgradienten von der Oberfläche zum Inneren des Zellsystems führt und schädigenden osmotischen Stress und unkontrollierte Eiskristallbildung hervorruft [195]. Daher müssen zunächst neue Strategien entwickelt werden, 3D-Systeme adäquat einzufrieren, worauf in dieser Arbeit jedoch nicht der Fokus lag. Da aus den kryokonservierten LP-Zellen aller drei Zelllinien AT2-Marker-exprimierende Zellen differenziert werden konnten, wurde diese Differenzierungsstufe als ein geeigneter Zeitpunkt zum Einfrieren der Zellen identifiziert. Überraschend war hierbei, dass sich bei allen drei untersuchten Zelllinien nach der Kryokonservierung die Proteinexpression von SP-C steigerte. Geringer exprimiert war hingegen TMPRSS2 in allen Zelllinien. Dass sich die Proteinsynthese in kryokonservierten Zellen verändern kann, wurde beispielsweise auch bei Spermien und anderen eukaryotischen Zellen beobachtet [234, 235]. Die Änderung der Surfactantproteinsynthese durch Kryokonservierung wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Verwunderlich ist hierbei, dass nur die Synthese von SP-C und nicht auch die von SP-B betroffen war, da beide Proteolipide von LBs hergestellt und via exozytischer Route sekretiert werden. Es muss also eine Beeinflussung auf molekularer Ebene gegeben haben, die nur die SP-C-Synthese betraf. Da es sich bei TMPRSS2 um ein Membranprotein handelt, liegt es nahe, dass die Abnahme der Proteinexpression auf eine mögliche Membranschädigung durch die Kryokonservierung zurückzuführen ist. ACE2 und CFTR, welche ebenfalls membranständig sind, blieben allerdings unbeeinflusst. Aufgrund dieser Beobachtungen ist es wichtig, die Anwendung der Zellen zu kennen und abzuwägen, welche zelluläre Funktionen für die Fragestellung vorhanden sein und adäquat abgebildet werden müssen. Im beispielhaften Fall von SARS-CoV-2-Infektionsstudien könnten die nicht-kryokonservierten Zellen aufgrund ihrer höheren TMPRSS2-Expression die bessere Wahl sein. Die zellulären Funktionen sollten dann vorab in kryokonservierten Zellen für die Anwendung überprüft werden. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Kryokonservierung von LP-Zellen in

einem ersten Schritt in dieser Arbeit demonstriert werden konnte, sodass in zukünftigen Arbeiten Anstrengungen unternommen werden sollten, 3D-Modelle einzufrieren, um sie für pharmazeutische Anwendungen mittels Biobanking jederzeit zugänglich zu machen.



## 6. Ausblick

Das in dieser Arbeit entwickelte, uniforme Differenzierungsprotokoll eignet sich zur Herstellung hiPSC-basierter alveolarer Epithelzellen für den Einsatz in der präklinischen Forschung. Die gewonnenen Erkenntnisse tragen dazu bei, die jetzt bestehende Differenzierungsstrategie noch weiter zu verbessern, damit alveolare Epithelzellen über ihren präklinischen Einsatz hinaus, zukünftig auch für regenerative Ansätze und Transplantationszwecke geeignet sind.

Da im Rahmen dieser Arbeit festgestellt wurde, dass sowohl 2D- als auch 3D-differenzierte alveolare Epithelzellen einem fetalen Entwicklungsstadium der Lunge gleichen, sollten zukünftig neue Strategien entwickelt werden, wie die Reifung von hiPSC-abgeleiteten Lungenzellen gesteigert werden könnte. Eine Überführung der Zellen an Luft, in einer ALI-Kultur, könnte zu einer erweiternden Ausreifung der Zellen, insbesondere hinsichtlich der Surfactantproteine, führen. Um Atmungsbewegungen zu simulieren, könnten die generierten Zellen beispielsweise auf einem Chipsystem kultiviert werden, das die Kontraktion des Diaphragmas, welches beim Menschen auf die Alveoli übertragen wird und eine Einatmung auslöst, simuliert [236, 237]. Generell bieten Organ-on-Chip-Systeme Möglichkeiten, Zellen im kontinuierlichen Mediumfluss zu kultivieren und biomechanische Kräfte, wie z.B. Scherkräfte, die vom Luft- und Blutfluss resultieren, zu kontrollieren und auf die Zellen auszuüben [238].

Hinsichtlich der differenzierten alveolaren Epithelzellen aus CF-Zelllinien, sollten weitere Untersuchungen bezüglich ihrer CFTR-Aktivität, z.B. mithilfe des Forskolin-induzierten Anschwellens, angestrebt werden. So kann ermöglicht werden, dass mithilfe des entwickelten Protokolls auch für die CF-Forschung relevante Zellen und Sphäroide generiert und in Biobanking-Ansätzen aufgenommen werden können. Die Funktionalität der SARS-CoV-2-Rezeptoren und die potentielle Einsetzbarkeit der generierten Zellen in der COVID-19-Forschung wurde in der Arbeit bereits demonstriert. Eine Validierung nach gesetzlichen Richtlinien mit bekannten Inhibitoren wie Camostat-Mesylat oder Nirmatrelvir sollte angestrebt werden, um als präklinisches Testsystem offiziell anerkannt zu werden.

Der Ansatz der Kryokonservierung ist für die erfolgreiche Implementierung von hiPSC-abgeleiteten Zelltypen in der präklinischen Forschung sehr vielversprechend. Eine Vergleichbarkeit könnte zu jeder Zeit gewährleistet werden, da mehrere Ampullen einer Charge oder eines Spenders eingelagert und bei Bedarf darauf zurückgegriffen werden könnte. Die Kryokonservierung von LP-Sphäroiden wäre von enormem Vorteil für die pharmazeutische Industrie, da so nicht nur der Aspekt der Qualität und Zeit adressiert, sondern auch die gewonnene Biomasse erhöht werden könnte. Zukünftig sollte an geeigneten Strategien gearbeitet werden, 3D-Modelle wie Sphäroide ohne zurückbleibende Kryoschäden zu lagern, um bei Bedarf darauf zugreifen zu können.

## 7. Anhang

### Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Häufigste Lungenerkrankungen beim Menschen .....	1
Abbildung 2: Atemwege des Menschen. ....	2
Abbildung 3: Zellulärer Aufbau der Alveole.....	4
Abbildung 4: Struktur und Lebenszyklus von SARS-CoV-2.....	6
Abbildung 5: CFTR-Mutationsklassen bei Cystischer Fibrose. ....	9
Abbildung 6: Herstellung und Anwendungsmöglichkeiten von hiPSCs.....	15
Abbildung 7: Herstellung isogener hiPS-Zelllinien mittels Genomeditierung.....	18
Abbildung 8: Übersicht der Endoderm-Entwicklung .....	21
Abbildung 9: Phasen der humanen Lungenentwicklung.....	22
Abbildung 10: Ventrale Spezifikation des Anterior Foregut Endoderm. ....	25
Abbildung 11: Mögliche 3D-Modelle aus pluripotenten Stammzellen (PSC). ....	29
Abbildung 12: Grafische Darstellung der relativen Genquantifizierung in DE-Zellen.....	51
Abbildung 13: Proteinexpression in DE-Zellen. ....	53
Abbildung 14: Grafische Darstellung der relativen Genquantifizierung in AFE-Zellen. ....	55
Abbildung 15: Proteinexpression in AFE-Zellen.....	57
Abbildung 16: Grafische Darstellung der relativen Genquantifizierung in LP-Zellen.....	59
Abbildung 17: Proteinexpression in LP-Zellen.....	61
Abbildung 18: Grafische Darstellung der relativen Genquantifizierung in AT2 an Tag 23 aus gesunden und F508-del-hiPS-Zelllinien.....	67
Abbildung 19: Grafische Darstellung der relativen Genquantifizierung in AT2 an Tag 30 aus gesunden und F508-del-hiPS-Zelllinien.....	71
Abbildung 20: Proteinexpression in AT2 an Tag 23 aus gesunden hiPS-Zelllinien.....	74
Abbildung 21: Proteinexpression in AT2 an Tag 23 aus F508-del-hiPS-Zelllinien. ....	75
Abbildung 22: Proteinexpression in AT2 an Tag 30 aus hiPS-Zelllinien gesunder Spender .....	76
Abbildung 23: Proteinexpression in AT2 an Tag 30 aus F508-del-hiPS-Zelllinien. ....	77
Abbildung 24: Immunzytochemische Färbung von 2D- und 3D-differenzierten AT2. ....	78
Abbildung 25: Mikroskopische Aufnahmen der SARS-CoV-2-Pseudoviren-Infektion von AT2....	80
Abbildung 26: SARS-CoV-2-Pseudoviren-Infektion von 2D- und 3D-differenzierten AT2.....	82
Abbildung 27: Grafische Darstellung der relativen Genquantifizierung in AT1 .....	85
Abbildung 28: Proteinexpression in AT1 aus gesunden hiPS-Zelllinien.....	87
Abbildung 29: Proteinexpression in AT1 aus F508-del-hiPS-Zelllinien. ....	88
Abbildung 30: Immunzytochemische Färbung von 2D- und 3D-differenzierten AT1 .....	89
Abbildung 31: Grafische Darstellung der relativen Genquantifizierung in AT2 nach Kryokonservierung. ....	92
Abbildung 32: Proteinexpression in AT2 nach Kryokonservierung.....	94

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Bisher verwendete hiPSC-abgeleitete Zelltypen in der Arzneimittelentwicklung.....	16
Tabelle 2: Allgemeine Verbrauchsmaterialien .....	31
Tabelle 3: Geräte .....	31
Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien.....	32
Tabelle 5: Humane rekombinante Wachstumsfaktoren.....	33
Tabelle 6: Kits.....	34
Tabelle 7: Antikörper .....	34
Tabelle 8: TaqMan-Assays .....	35
Tabelle 9: Verwendete hiPS-Zelllinien.....	38
Tabelle 10: Zusammensetzung des Reaktionsmix für die reverse Transkription .....	44
Tabelle 11: Programm für die reverse Transkription im ThermoCycler .....	44
Tabelle 12: Übersicht der analysierten Differenzierungsstufen, Zeitpunkte und Marker.....	48
Tabelle 13: Relative Quantifizierung der Genexpression in DE-Zellen .....	50
Tabelle 14: Relative Quantifizierung der Genexpression in AFE-Zellen .....	55
Tabelle 15: Relative Quantifizierung der Genexpression in LP-Zellen.....	59
Tabelle 16: Relative Quantifizierung der Genexpression in AT2 an Tag 23 .....	64
Tabelle 17: Relative Quantifizierung der Genexpression in AT2 an Tag 30 .....	68
Tabelle 18: Relative Quantifizierung der Genexpression in AT1 .....	83
Tabelle 19: Relative Quantifizierung der Genexpression in AT2 nach Kryokonservierung.....	91

**Formelverzeichnis**

Formel 1: Berechnung von $CT_{\text{Durchschnitt}}$ .....	45
Formel 2: Berechnung von $\Delta CT$ .....	45
Formel 3: Berechnung von $\Delta\Delta CT$ .....	46
Formel 4: Berechnung der relativen Quantifizierung des Gens (RQ).....	46

## Literaturverzeichnis

1. Cao B., Stevens G.A., Ho J., Ma Fat D. (2020). WHO methods and data sources for global burden of disease estimates 2000-2019. Global Health Estimates Technical Paper WHO/DDI/DNA/GHE/2020.3.
2. Vogelmeier C.F., Román-Rodríguez M., Singh D., Han M.K., Rodríguez-Roisin R., Ferguson G.T. (2020). Goals of COPD treatment: Focus on symptoms and exacerbations. *Respiratory Medicine* 166: 105938. doi:10.1016/j.rmed.2020.105938.
3. Broaddus V.C. (2016). Murray and Nadel's Textbook of Respiratory Medicine. Elsevier.
4. Fritsch H. & Kühnel W. (2018). Taschenatlas der Anatomie Band 2: Innere Organe. Georg Thieme Verlag.
5. Hsia C.C.W., Hyde D.M., Weibel E.R. (2016). Lung Structure and the Intrinsic Challenges of Gas Exchange. *Comprehensive Physiology* 6: 827. doi:10.1002/CPHY.C150028.
6. Welsch U. (2014). Lehrbuch Histologie. Urban&Fischer Verlag.
7. Sidhaye V.K., Koval M. (2017). Lung Epithelial Biology in the Pathogenesis of Pulmonary Disease. Academic Press.
8. Guillot L., Nathan N., Tabary O., Thouvenin G., Rouzic P. le, Corvol H., Amselem S., Clement A. (2013). Alveolar epithelial cells: Master regulators of lung homeostasis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45: 2568. doi:10.1016/J.BIOCEL.2013.08.009.
9. Feher J. (2017). The Mechanics of Breathing. Quantitative Human Physiology. Elsevier.
10. McGowan S.E. (2014). The Formation of Pulmonary Alveoli. The Lung. Academic Press.
11. Casals C., Cañadas O. (2012). Role of lipid ordered/disordered phase coexistence in pulmonary surfactant function. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1818: 2550. doi:10.1016/j.bbamem.2012.05.024.
12. Maynard R.L., Downes N., Maynard R.L., Downes N. (1969). The lung. *Canadian Medical Association Journal* 100, 349. doi:10.1016/b978-0-12-811837-5.00012-5.
13. Barnes P.J. (2010). Genomics in the Evaluation and Management of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Essentials of Genomic and Personalized Medicine*. Academic Press.
14. Faber S.C., McCullough S.D. (2018). Through the Looking Glass: In Vitro Models for Inhalation Toxicology and Interindividual Variability in the Airway. *Applied In Vitro Toxicology* 4: 115. doi:10.1089/aivt.2018.0002.
15. V'kovski P., Kratzel A., Steiner S., Stalder H., Thiel V. (2021). Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nature Reviews Microbiology* 19: 155. doi:10.1038/s41579-020-00468-6.
16. Ren L.L., Wang Y.M., Wu Z.Q., Xiang Z.C., Guo L., Xu T., Jiang Y.Z., Xiong Y., Li Y.J., Li X.W., Li H., Fan G.H., Gu X.Y., Xiao Y., Gao H., Xu J.Y., Yang F., Wang X.M., Wu C., Chen L., Liu Y.W., Liu B., Yang J., Wang X.R., Dong J., Li L., Huang C.L., Zhao J.P., Hu Y., Cheng Z.S., Liu L.L., Qian Z.H., Qin C., Jin Q., Cao B., Wang J.W. (2020). Identification of a novel coronavirus causing severe pneumonia in human: a descriptive study. *Chinese Medical Journal* 133: 1015. doi:10.1097/CM9.0000000000000722.
17. Hu B., Guo H., Zhou P., Shi Z.L. (2021). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology* 19: 141. doi:10.1038/s41579-020-00459-7.
18. Zhou P., Yang X. lou, Wang X.G., Hu B., Zhang L., Zhang W., Si H.R., Zhu Y., Li B., Huang C.L., Chen H.D., Chen J., Luo Y., Guo H., Jiang R. di, Liu M.Q., Chen Y., Shen X.R., Wang X., Zheng X.S., Zhao K., Chen Q.J., Deng F., Liu L.L., Yan B., Zhan F.X., Wang Y.Y., Xiao G.F., Shi Z.L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579: 270. doi:10.1038/s41586-020-2012-7.

19. Awadasseid A., Wu Y., Tanaka Y., Zhang W. (2021). – Current advances in the development of SARS-CoV-2 vaccines. *International Journal of Biological Sciences* 17: 8. doi:10.7150/IJBS.52569.
20. Sanyal S. (2020). How SARS-CoV-2 (COVID-19) spreads within infected hosts — what we know so far. *Emerging Topics in Life Sciences* 4: 383. doi:10.1042/ETLS20200165.
21. Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S., Krüger N., Herrler T., Erichsen S., Schiergens T.S., Herrler G., Wu N.H., Nitsche A., Müller M.A., Drosten C., Pöhlmann S. (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* 181: 271. doi:10.1016/J.CELL.2020.02.052.
22. Scialo F., Daniele A., Amato F., Pastore L., Matera M.G., Cazzola M., Castaldo G., Bianco A. (2020). ACE2: The Major Cell Entry Receptor for SARS-CoV-2. *Lung* 198: 1. doi:10.1007/S00408-020-00408-4.
23. Jackson C.B., Farzan M., Chen B., Choe H. (2022). Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 23: 1. doi:10.1038/S41580-021-00418-X.
24. Sungnak W., Huang N., Bécavin C., Berg M., Queen R., Litvinukova M., Talavera-López C., Maatz H., Reichart D., Sampaziotis F., Worlock K.B., Yoshida M., Barnes J.L., Banovich N.E., Barbry P., Brazma A., Collin J., Desai T.J., Duong T.E., Eickelberg O., Falk C., Farzan M., Glass I., Gupta R.K., Haniffa M., Horvath P., Hubner N., Hung D., Kaminski N., Krasnow M., Kropski J.A., Kuhnemund M., Lako M., Lee H., Leroy S., Linnarson S., Lundeberg J., Meyer K.B., Miao Z., Misharin A. v., Nawijn M.C., Nikolic M.Z., Noseda M., Ordovas-Montanes J., Oudit G.Y., Pe'er D., Powell J., Quake S., Rajagopal J., Tata P.R., Rawlins E.L., Regev A., Reyfman P.A., Rozenblatt-Rosen O., Saeb-Parsy K., Samakovlis C., Schiller H.B., Schultze J.L., Seibold M.A., Seidman C.E., Seidman J.G., Shalek A.K., Shepherd D., Spence J., Spira A., Sun X., Teichmann S.A., Theis F.J., Tsankov A.M., Vallier L., Berge M. van den, Whitsett J., Xavier R., Xu Y., Zaragosi L.E., Zerti D., Zhang H., Zhang K., Rojas M., Figueiredo F. (2020). SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. *Nature Medicine* 26: 681. doi:10.1038/s41591-020-0868-6.
25. Lukassen S., Chua R.L., Trefzer T., Kahn N.C., Schneider M.A., Muley T., Winter H., Meister M., Veith C., Boots A.W., Hennig B.P., Kreuter M., Conrad C., Eils R. (2020). SARS-CoV-2 receptor ACE 2 and TMPRSS 2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells. *The EMBO Journal* 39: e105114. doi:10.15252/embj.20105114.
26. Drożdżal S., Rosik J., Lechowicz K., Machaj F., Szostak B., Przybyciński J., Lorzadeh S., Kotfis K., Ghavami S., Łos M.J. (2021). An update on drugs with therapeutic potential for SARS-CoV-2 (COVID-19) treatment. *Drug Resistance Updates* 59: 100794. doi:10.1016/J.DRUP.2021.100794.
27. Wang Z., Yang L. (2022). In the age of Omicron variant: Paxlovid raises new hopes of COVID-19 recovery. *Journal of Medical Virology* 94: 1766. doi:10.1002/JMV.27540.
28. Lee C.Y., Lowen A.C. (2021). Animal models for SARS-CoV-2. *Current Opinion in Virology* 48: 73. doi:10.1016/J.COVIRO.2021.03.009.
29. Ziegler C.G.K., Allon S.J., Nyquist S.K., Mbano I.M., Miao V.N., Tzouanas C.N., Cao Y., Yousif A.S., Bals J., Hauser B.M., Feldman J., Muus C., Wadsworth M.H., Kazer S.W., Hughes T.K., Doran B., Gatter G.J., Vukovic M., Taliaferro F., Mead B.E., Guo Z., Wang J.P., Gras D., Plaisant M., Ansari M., Angelidis I., Adler H., Sucre J.M.S., Taylor C.J., Lin B., Waghay A., Mitsialis V., Dwyer D.F., Buchheit K.M., Boyce J.A., Barrett N.A., Laidlaw T.M., Carroll S.L., Colonna L., Tkachev V., Peterson C.W., Yu A., Zheng H.B., Gideon H.P., Winchell C.G., Lin P.L., Bingle C.D., Snapper S.B., Kropski J.A., Theis F.J., Schiller H.B., Zaragosi L.E., Barbry P., Leslie A., Kiem H.P., Flynn J.A.L., Fortune S.M., Berger B., Finberg R.W., Kean L.S., Garber M., Schmidt A.G., Lingwood D., Shalek A.K., Ordovas-Montanes J., Banovich N., Brazma A., Desai T., Duong T.E., Eickelberg O., Falk C., Farzan M., Glass I., Haniffa M., Horvath P., Hung D., Kaminski N., Krasnow M., Kuhnemund M., Lafyatis R., Lee H., Leroy S., Linnarson S., Lundeberg J., Meyer K., Misharin A., Nawijn M., Nikolic M.Z., Pe'er D., Powell J., Quake S., Rajagopal J., Tata P.R., Rawlins E.L., Regev A., Reyfman P.A., Rojas M., Rosen O. (2020). SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in Specific Cell Subsets across Tissues. *Cell* 181: 1016. doi:10.1016/j.cell.2020.04.035.

30. Heinen N., Klöhn M., Steinmann E., Pfaender S. (2021). In Vitro Lung Models and Their Application to Study SARS-CoV-2 Pathogenesis and Disease. *Viruses* 13: 792. doi:10.3390/V13050792.
31. Liu J., Cao R., Xu M., Wang X., Zhang H., Hu H., Li Y., Hu Z., Zhong W., Wang M. (2020). Hydroxychloroquine, a less toxic derivative of chloroquine, is effective in inhibiting SARS-CoV-2 infection in vitro. *Cell Discovery* 6: 16. doi:10.1038/S41421-020-0156-0.
32. Rosenke K., Jarvis M.A., Feldmann F., Schwarz B., Okumura A., Lovaglio J., Saturday G., Hanley P.W., Meade-White K., Williamson B.N., Hansen F., Perez-Perez L., Leventhal S., Tang-Huau T.L., Callison J., Haddock E., Stromberg K.A., Scott D., Sewell G., Bosio C.M., Hawman D., de Wit E., Feldmann H. (2020). Hydroxychloroquine prophylaxis and treatment is ineffective in macaque and hamster SARS-CoV-2 disease models. *JCI Insight* 5:e143174. doi: 10.1172/jci.insight.143174.
33. Boulware D.R., Pullen M.F., Bangdiwala A.S., Pastick K.A., Lofgren S.M., Okafor E.C., Skipper C.P., Nascene A.A., Nicol M.R., Abassi M., Engen N.W., Cheng M.P., LaBar D., Lothar S.A., MacKenzie L.J., Drobot G., Marten N., Zarychanski R., Kelly L.E., Schwartz I.S., McDonald E.G., Rajasingham R., Lee T.C., Hullsiek K.H. (2020). A Randomized Trial of Hydroxychloroquine as Postexposure Prophylaxis for Covid-19. *New England Journal of Medicine* 383: 517. doi:10.1056/NEJMOA2016638.
34. Monteil V., Kwon H., Prado P., Hagelkrüys A., Wimmer R.A., Stahl M., Leopoldi A., Garreta E., Hurtado del Pozo C., Prosper F., Romero J.P., Wirnsberger G., Zhang H., Slutsky A.S., Conder R., Montserrat N., Mirazimi A., Penninger J.M. (2020). Inhibition of SARS-CoV-2 Infections in Engineered Human Tissues Using Clinical-Grade Soluble Human ACE2. *Cell* 181: 905. doi:10.1016/J.CELL.2020.04.004.
35. Duarte R.R.R., Copertino D.C., Iñiguez L.P., Marston J.L., Bram Y., Han Y., Schwartz R.E., Chen S., Nixon D.F., Powell T.R. (2021). Identifying FDA-approved drugs with multimodal properties against COVID-19 using a data-driven approach and a lung organoid model of SARS-CoV-2 entry. *Molecular Medicine* 27: 105. doi:10.1186/S10020-021-00356-6.
36. Tiwari S.K., Wang S., Smith D., Carlin A.F., Rana T.M. (2021). Revealing Tissue-Specific SARS-CoV-2 Infection and Host Responses using Human Stem Cell-Derived Lung and Cerebral Organoids. *Stem Cell Reports*, 16 (3), 437–445. doi:10.1016/J.STEMCR.2021.02.005.
37. Han Y., Duan X., Yang L., Nilsson-Payant B.E., Wang P., Duan F., Tang X., Yaron T.M., Zhang T., Uhl S., Bram Y., Richardson C., Zhu J., Zhao Z., Redmond D., Houghton S., Nguyen D.H.T., Xu D., Wang X., Jessurun J., Borczuk A., Huang Y., Johnson J.L., Liu Y., Xiang J., Wang H., Cantley L.C., tenOever B.R., Ho D.D., Pan F.C., Evans T., Chen H.J., Schwartz R.E., Chen S. (2021). Identification of SARS-CoV-2 inhibitors using lung and colonic organoids. *Nature* 589: 270. doi:10.1038/S41586-020-2901-9.
38. Yan Z., McCray Jr P.B., Engelhardt J.F. (2019). Advances in gene therapy for cystic fibrosis lung disease. *Human Molecular Genetics* 28: R88. doi:10.1093/hmg/ddz139.
39. De Boeck K. (2020). Cystic fibrosis in the year 2020: A disease with a new face. *Acta Paediatrica* 109: 893. doi:10.1111/APA.15155.
40. Connett G.J. (2019). Lumacaftor-ivacaftor in the treatment of cystic fibrosis: design, development and place in therapy. *Drug Design, Development and Therapy* 13: 2405. doi:10.2147/DDDT.S153719.
41. Rafeeq M.M., Murad H.A.S. (2017). Cystic fibrosis: current therapeutic targets and future approaches. *Journal of Translational Medicine* 15: 84. doi:10.1186/s12967-017-1193-9.
42. Meng X., Clews J., Kargas V., Wang X., Ford R.C. (2017). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and its stability. *Cellular and Molecular Life Sciences* 74: 23. doi:10.1007/s00018-016-2386-8.
43. De Rose V., Molloy K., Gohy S., Pilette C., Greene C.M. (2018). Airway Epithelium Dysfunction in Cystic Fibrosis and COPD. *Mediators of Inflammation* 2018: 1309746. doi:10.1155/2018/1309746.
44. Skov M., Hansen C.R., Pressler T. (2019). Cystic fibrosis - an example of personalized and precision medicine. *APMIS* 127: 352. doi:10.1111/apm.12915.

45. Bell S.C., Mall M.A., Gutierrez H., Macek M., Madge S., Davies J.C., Burgel P.R., Tullis E., Castaños C., Castellani C., Byrnes C.A., Cathcart F., Chotirmall S.H., Cosgriff R., Eichler I., Fajac I., Goss C.H., Drevinek P., Farrell P.M., Gravelle A.M., Havermans T., Mayer-Hamblett N., Kashirskaya N., Kerem E., Mathew J.L., McKone E.F., Naehrlich L., Nasr S.Z., Oates G.R., O'Neill C., Pypops U., Raraigh K.S., Rowe S.M., Southern K.W., Sivam S., Stephenson A.L., Zampoli M., Ratjen F. (2020). The future of cystic fibrosis care: a global perspective. *The Lancet Respiratory Medicine* 8: 65. doi:10.1016/S2213-2600(19)30337-6.
46. Anderson P. (2010). Emerging therapies in cystic fibrosis. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease* 4: 177. doi:10.1177/1753465810371107.
47. Chaudary N. (2018). Triplet CFTR modulators: Future prospects for treatment of cystic fibrosis. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 14: 2375. doi:10.2147/TCRM.S147164.
48. Rogan M.P., Stoltz D.A., Hornick D.B. (2011). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator intracellular processing, trafficking, and opportunities for mutation-specific treatment. *Chest* 139: 1480. doi:10.1378/chest.10-2077.
49. Ramsey B.W., Davies J., McElvaney N.G., Tullis E., Bell S.C., Dřevinek P., Griese M., McKone E.F., Wainwright C.E., Konstan M.W., Moss R., Ratjen F., Sermet-Gaudelus I., Rowe S.M., Dong Q., Rodriguez S., Yen K., Ordoñez C., Elborn J.S. (2011). – A CFTR Potentiator in Patients with Cystic Fibrosis and the G551D Mutation. *New England Journal of Medicine* 365: 1663. doi:10.1056/NEJMoa1105185.
50. Konstan M.W., McKone E.F., Moss R.B., Marigowda G., Tian S., Waltz D., Huang X., Lubarsky B., Rubin J., Millar S.J., Pasta D.J., Mayer-Hamblett N., Goss C.H., Morgan W., Sawicki G.S. (2017). Assessment of safety and efficacy of long-term treatment with combination lumacaftor and ivacaftor therapy in patients with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation (PROGRESS): a phase 3, extension study. *Lancet Respiratory Medicine* 5: 107. doi:10.1016/S2213-2600(16)30427-1.
51. Wainwright C.E., Elborn J.S., Ramsey B.W., Marigowda G., Huang X., Cipolli M., Colombo C., Davies J.C., De Boeck K., Flume P.A., Konstan M.W., McColley S.A., McCoy K., McKone E.F., Munck A., Ratjen F., Rowe S.M., Waltz D., Boyle M.P. (2015). Lumacaftor-ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. *New England Journal of Medicine* 373: 220. doi:10.1056/NEJMoa1409547.
52. Noordhoek J.J., Gulmans V.A.M., Heijerman H.G.M., Ent C.K. van der (2019). Aligning patients' needs and research priorities towards a comprehensive CF research program. *Journal of Cystic Fibrosis* 18: 382. doi:10.1016/J.JCF.2019.03.008.
53. Ahmadi S., Bozoky Z., Paola M. di, Xia S., Li C., Wong A.P., Wellhauser L., Molinski S. v, Ip W., Ouyang H., Avolio J., Forman-Kay J.D., Ratjen F., Hirota J.A., Rommens J., Rossant J., Gonska T., Moraes T.J., Bear C.E. (2017). Phenotypic profiling of CFTR modulators in patient-derived respiratory epithelia. *NPJ Genomic Medicine* 2: 12. doi:10.1038/s41525-017-0015-6.
54. Eckford P.D.W., McCormack J., Munsie L., He G., Stanojevic S., Pereira S.L., Ho K., Avolio J., Bartlett C., Yang J.Y., Wong A.P., Wellhauser L., Huan L.J., Jiang J.X., Ouyang H., Du K., Klingel M., Kyriakopoulou L., Gonska T., Moraes T.J., Strug L.J., Rossant J., Ratjen F., Bear C.E. (2019). The CF Canada-Sick Kids Program in individual CF therapy: A resource for the advancement of personalized medicine in CF. *Journal of Cystic Fibrosis* 18: 35. doi:10.1016/j.jcf.2018.03.013.
55. Jiang J.X., Wellhauser L., Laselva O., Utkina I., Bozoky Z., Gunawardena T., Ngan Z., Xia S., Paola M. di, Eckford P.D.W., Ratjen F., Moraes T.J., Parkinson J., Wong A.P., Bear C.E. (2021). A new platform for high-throughput therapy testing on iPSC-derived lung progenitor cells from cystic fibrosis patients. *Stem Cell Reports* 16: 2825. doi:10.1016/J.STEMCR.2021.09.020.
56. Mizgerd J.P., Skerrett S.J. (2008). Animal models of human pneumonia. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 294: L387. doi:10.1152/AJPLUNG.00330.2007.
57. Mak I.W.Y., Evaniew N., Ghert M. (2014). Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. *American Journal of Translational Research* 6: 114.
58. Russell W., Burch R. (1959). *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen & Co. Limited.

59. Europäische Kommission (2010). RICHTLINIE 2010/63/EU DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere. Amtsblatt Nr. L 276/33.
60. Bundesamt für Justiz (2013). Verordnung zum Schutz von zu Versuchszwecken oder zu anderen wissenschaftlichen Zwecken verwendeten Tieren. Tierschutz-Versuchstierverordnung vom 1. August 2013. BGBl. I S. 3125, 3126.
61. Moreira A., Müller M., Costa P.F., Kohl Y. (2021). Advanced In Vitro Lung Models for Drug and Toxicity Screening: The Promising Role of Induced Pluripotent Stem Cells. *Advanced Biology* 6: 2101139. doi:10.1002.adbi.202101139.
62. Primavessy D., Metz J., Schnur S., Schneider M., Lehr C.M., Hittinger M. (2021). Pulmonary in vitro instruments for the replacement of animal experiments. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 168: 62. doi:10.1016/j.ejpb.2021.08.005.
63. Miller A.J., Spence J.R. (2017). In Vitro Models to Study Human Lung Development, Disease and Homeostasis. *Physiology* 32: 246. doi:10.1152/PHYSIOL.00041.2016.
64. Orr J.C., Hynds R.E. (2021). Stem cell–derived respiratory epithelial cell cultures as human disease models. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 64: 657. doi:10.1165/rcmb.2020-0440TR.
65. Tesei A., Zoli W., Arienti C., Storci G., Granato A.M., Pasquinelli G., Valente S., Orrico C., Rosetti M., Vannini I., Dubini A., Dell'Amore D., Amadori D., Bonafè M. (2009). Isolation of stem/progenitor cells from normal lung tissue of adult humans. *Cell Proliferation* 42: 298. doi:10.1111/J.1365-2184.2009.00594.X.
66. Sprott R.F., Ritzmann F., Langer F., Yao Y., Herr C., Kohl Y., Tschernig T., Bals R., Beisswenger C. (2020). Flagellin shifts 3D bronchospheres towards mucus hyperproduction. *Respiratory Research* 21: 222. doi:10.1186/S12931-020-01486-X.
67. Lachmann N., Happel C., Ackermann M., Lüttge D., Wetzke M., Merkert S., Hetzel M., Kensah G., Jara-Avaca M., Mucci A., Skuljec J., Dittrich A. M., Pfaff N., Brenning S., Schambach A., Steinemann D., Göhring G., Cantz T., Martin U., Schwerk N., Hansen G., Moritz T. (2014). Gene correction of human induced pluripotent stem cells repairs the cellular phenotype in pulmonary alveolar proteinosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 189:167. doi:10.1164/RCCM.201306-1012OC.
68. Suh W. (2017). A new era of disease modeling and drug discovery using induced pluripotent stem cells. *Archives of Pharmacal Research* 40: 1. doi:10.1007/s12272-016-0871-0.
69. Gurdon J.B. (1962). The Developmental Capacity of Nuclei taken from Intestinal Epithelium Cells of Feeding Tadpoles. *Journal of embryology and experimental morphology* 10: 622. PMID: 13951335.
70. Martin G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 78: 7634. doi:10.1073/pnas.78.12.7634.
71. Karagiannis P., Takahashi K., Saito M., Yoshida Y., Okita K., Watanabe A., Inoue H., Yamashita J.K., Todani M., Nakagawa M., Osawa M., Yashiro Y., Yamanaka S., Osafune K. (2019). Induced pluripotent stem cells and their use in human models of disease and development. *Physiological Reviews* 99: 79. doi:10.1152/physrev.00039.2017.
72. Takahashi K., Yamanaka S. (2006). – Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024.
73. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019.



74. Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J.L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G.A., Ruotti V., Stewart R., Slukvin I.I., Thomson J.A. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318: 1917. doi:10.1126/SCIENCE.1151526.
75. Johnson M.H., Cohen J. (2012). Reprogramming rewarded: the 2012 Nobel prize for Physiology or Medicine awarded to John Gurdon and Shinya Yamanaka. *Reproductive BioMedicine Online* 25: 549. doi:10.1016/J.RBMO.2012.10.009.
76. King N.M., Perrin J. (2014). Ethical issues in stem cell research and therapy. *Stem Cell Research & Therapy* 5: 85. doi:10.1186/scrt474.
77. Grskovic M., Javaherian A., Strulovici B. & Daley G.Q. (2011). – Induced pluripotent stem cells - opportunities for disease modelling and drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10 (12), 915–929. doi:10.1038/nrd3577.
78. Danz K., Höcherl T., Wien S.L., Wien L., von Briesen H., Wagner S. (2022). Experimental Comparison of Primary and hiPS-Based In Vitro Blood-Brain Barrier Models for Pharmacological Research. *Pharmaceutics* 14: 737. doi:10.3390/PHARMACEUTICS14040737.
79. Hung S.S.C., Khan S., Lo C.Y., Hewitt A.W., Wong R.C.B. (2017). Drug discovery using induced pluripotent stem cell models of neurodegenerative and ocular diseases. *Pharmacology and Therapeutics* 177: 32. doi:10.1016/j.pharmthera.2017.02.026.
80. De Leeuw S., Tackenberg C. (2019). Alzheimer's in a dish – induced pluripotent stem cell-based disease modeling. *Translational Neurodegeneration* 8:21. doi:10.1186/S40035-019-0161-0.
81. Burkhardt M.F., Martinez F.J., Wright S., Ramos C., Volfson D., Mason M., Garnes J., Dang V., Lievers J., Shoukat-Mumtaz U., Martinez R., Gai H., Blake R., Vaisberg E., Grskovic M., Johnson C., Irion S., Bright J., Cooper B., Nguyen L., Griswold-Prenner I., Javaherian A. (2013). A cellular model for sporadic ALS using patient-derived induced pluripotent stem cells. *Molecular and Cellular Neuroscience* 56: 355. doi:10.1016/j.mcn.2013.07.007.
82. Choi S.M., Kim Y., Shim J.S., Park J.T., Wang R.H., Leach S.D., Liu J.O., Deng C., Ye Z., Jang Y.Y. (2013). Efficient drug screening and gene correction for treating liver disease using patient-specific stem cells. *Hepatology* 57: 2458. doi:10.1002/hep.26237.
83. Lee G., Ramirez C.N., Kim H., Zeltner N., Liu B., Radu C., Bhinder B., Kim Y.J., Choi I.Y., Mukherjee-Clavin B., Djaballah H., Studer L. (2012). Large-scale screening using familial dysautonomia induced pluripotent stem cells identifies compounds that rescue IKBKAP expression. *Nature Biotechnology* 30: 1244. doi:10.1038/nbt.2435.
84. Giri S., Bader A. (2015). A low-cost, high-quality new drug discovery process using patient-derived induced pluripotent stem cells. *Drug Discovery Today* 20: 37. doi:10.1016/j.drudis.2014.10.011.
85. Craveiro N.S., Lopes B.S., Tomás L., Almeida S.F. (2019). Drug Withdrawal Due to Safety: A Review of the Data Supporting Withdrawal Decision. *Current Drug Safety* 15: 4. doi:10.2174/1574886314666191004092520.
86. Liang P., Lan F., Lee A.S., Gong T., Sanchez-Freire V., Wang Y., Diecke S., Sallam K., Knowles J.W., Wang P.J., Nguyen P.K., Bers D.M., Robbins R.C., Wu J.C. (2013). Drug screening using a library of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes reveals disease-specific patterns of cardiotoxicity. *Circulation* 127: 1677. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001883.
87. Takayama K., Morisaki Y., Kuno S., Nagamoto Y., Harada K., Furukawa N., Ohtaka M., Nishimura K., Imagawa K., Sakurai F., Tachibana M., Sumazaki R., Noguchi E., Nakanishi M., Hirata K., Kawabata K., Mizuguchi H. (2014). Prediction of interindividual differences in hepatic functions and drug sensitivity by using human iPSC-derived hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111: 16772. doi:10.1073/pnas.1413481111.

88. De Masi C., Spitalieri P., Murdocca M., Novelli G., Sangiuolo F. (2020). Application of CRISPR/Cas9 to human-induced pluripotent stem cells: from gene editing to drug discovery. *Human Genomics* 14: 25. doi:10.1186/S40246-020-00276-2.
89. Yaffe K. (2010). Treatment of Alzheimer disease and prognosis of dementia: time to translate research to results. *Journal of the American Medical Association* 304: 1952. doi:10.1001/jama.2010.1625.
90. Schork N.J. (2015). Personalized medicine: Time for one-person trials. *Nature* 520: 609. doi:10.1038/520609a.
91. Bassett A.R. (2017). Editing the genome of hiPSC with CRISPR/Cas9: disease models. *Mammalian Genome* 28: 348. doi:10.1007/s00335-017-9684-9.
92. Steeg R., Neubauer J.C., Müller S.C., Ebneith A., Zimmermann H. (2020). The EBiSC iPSC bank for disease studies. *Stem Cell Research* 49: 102034. doi:10.1016/J.SCR.2020.102034.
93. EBiSC - European Bank for Induced pluripotent Stem Cells · EBiSC (2022). <https://ebisc.org/>.
94. Soldner F., Jaenisch R. (2018). Stem cells, genome editing and the path to translational medicine. *Cell* 175: 615. doi:10.1016/J.CELL.2018.09.010.
95. Beekhuis-Hoekstra S.D., Watanabe K., Werme J., De Leeuw C.A., Paliukhovich I., Li K.W., Koopmans F., Smit A.B., Posthuma D., Heine V.M. (2021). Systematic assessment of variability in the proteome of iPSC derivatives. *Stem Cell Research* 56: 102512. doi:10.1016/J.SCR.2021.102512.
96. Wang Y., Liang P., Lan F., Wu H., Lisowski L., Gu M., Hu S., Kay M.A., Urnov F.D., Shinnawi R., Gold J.D., Gepstein L., Wu J.C. (2014). Genome editing of isogenic human induced pluripotent stem cells recapitulates long QT phenotype for drug testing. *Journal of the American College of Cardiology* 64: 451. doi:10.1016/j.jacc.2014.04.057.
97. Hendriks W.T., Warren C.R., Cowan C.A. (2016). Genome Editing in Human Pluripotent Stem Cells: Approaches, Pitfalls, and Solutions. *Cell Stem Cell* 18: 53. doi:10.1016/J.STEM.2015.12.002.
98. Urnov F.D., Rebar E.J., Holmes M.C., Zhang H.S., Gregory P.D. (2010). Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature Reviews Genetics* 11: 636. doi:10.1038/nrg2842.
99. Merkert S., Schubert M., Olmer R., Engels L., Radetzki S., Veltman M., Scholte B.J., Zöllner J., Pedemonte N., Galletta L.J.V., Kries J.P. von & Martin U. (2019). High-Throughput Screening for Modulators of CFTR Activity Based on Genetically Engineered Cystic Fibrosis Disease-Specific iPSCs. *Stem Cell Reports* 12: 1389. doi:10.1016/j.stemcr.2019.04.014.
100. Engels L., Olmer R., la Roche J. de, Göhring G., Ulrich S., Haller R., Martin U., Merkert S. (2019). Generation of a CFTR knock-in reporter cell line (MHHi006-A-1) from a human induced pluripotent stem cell line. *Stem Cell Research* 40: 101542. doi:10.1016/j.scr.2019.101542.
101. Cai L., Fisher A.L., Huang H., Xie Z. (2016). CRISPR-mediated genome editing and human diseases. *Genes and Diseases* 3: 244. doi:10.1016/j.gendis.2016.07.003.
102. Al-Attar S., Westra E.R., van der Oost J., Brouns S.J.J. (2011). Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs): the hallmark of an ingenious antiviral defense mechanism in prokaryotes. *Biological Chemistry* 392: 277. doi:10.1515/bc.2011.042.
103. Hille F., Richter H., Wong S.P., Bratovič M., Ressel S., Charpentier E. (2018). The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. *Cell* 172: 1239. doi:10.1016/J.CELL.2017.11.032.
104. Rath D., Amlinger L., Rath A. & Lundgren M. (2015). – The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. *Biochimie*, 117, 119–128. doi:10.1016/J.BIOCHI.2015.03.025.
105. Doudna J.A., Charpentier E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346: 1258096. doi: 10.1126/science.1258096.

106. Manghwar H., Lindsey K., Zhang X., Jin S. (2019). CRISPR/Cas System: Recent Advances and Future Prospects for Genome Editing. *Trends in Plant Science* 24: 1102. doi:10.1016/J.TPLANTS.2019.09.006.
107. Ran F.A., Hsu P.D., Wright J., Agarwala V., Scott D.A., Zhang F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols* 8: 2281. doi:10.1038/nprot.2013.143.
108. Hryhorowicz M., Lipiński D., Zeyland J., Słomski R. (2017). CRISPR/Cas9 Immune System as a Tool for Genome Engineering. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 65: 233. doi:10.1007/S00005-016-0427-5.
109. Barkauskas C.E., Chung M.I., Fioret B., Gao X., Katsura H., Hogan B.L.M. (2017). Lung organoids: Current uses and future promise. *Development* 144: 986. doi:10.1242/dev.140103.
110. Dye B.R., Miller A.J., Spence J.R. (2016). How to Grow a Lung: Applying Principles of Developmental Biology to Generate Lung Lineages from Human Pluripotent Stem Cells. *Current Pathobiology Reports* 4: 47. doi:10.1007/s40139-016-0102-x.
111. Morrisey E.E., Hogan B.L.M. (2010). Preparing for the First Breath: Genetic and Cellular Mechanisms in Lung Development. *Developmental Cell* 18: 8. doi:10.1016/j.devcel.2009.12.010.
112. Rawlins E.L. (2011). The building blocks of mammalian lung development. *Developmental Dynamics* 240: 463. doi:10.1002/dvdy.22482.
113. Zorn A.M., Wells J.M. (2009). Vertebrate Endoderm Development and Organ Formation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 25: 221. doi:10.1146/annurev.cellbio.042308.113344.
114. Nikolić M.Z., Sun D., Rawlins E.L. (2018). Human lung development: Recent progress and new challenges. *Development* 145: dev163485 doi:10.1242/dev.163485.
115. Beers M.F., Moodley Y. (2017). When Is an Alveolar Type 2 Cell an Alveolar Type 2 Cell? A Conundrum for Lung Stem Cell Biology and Regenerative Medicine. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 57: 18. doi:10.1165/rcmb.2016-0426PS.
116. Ghaedi M., Calle E.A., Mendez J.J., Gard A.L., Balestrini J., Booth A., Bove P.F., Gui L., White E.S., Niklason L.E. (2013). Human iPS cell-derived alveolar epithelium repopulates lung extracellular matrix. *Journal of Clinical Investigation* 123: 4950. doi:10.1172/JCI68793.
117. Huang S.X.L., Islam M.N., O'Neill J., Hu Z., Yang Y.G., Chen Y.W., Mumau M., Green M.D., Vunjak-Novakovic G., Bhattacharya J., Snoeck H.W. (2014). Efficient generation of lung and airway epithelial cells from human pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology* 32: 84. doi:10.1038/nbt.2754.
118. Yamamoto Y., Gotoh S., Korogi Y., Seki M., Konishi S., Ikeo S., Sone N., Nagasaki T., Matsumoto H., Muro S., Ito I., Hirai T., Kohno T., Suzuki Y., Mishima M. (2017). Long-term expansion of alveolar stem cells derived from human iPS cells in organoids. *Nature Methods* 14: 1097. doi:10.1038/nmeth.4448.
119. Jacob A., Morley M., Hawkins F., McCauley K.B., Jean J.C., Heins H., Na C.L., Weaver T.E., Vedaie M., Hurley K., Hinds A., Russo S.J., Kook S., Zacharias W., Ochs M., Traber K., Quinton L.J., Crane A., Davis B.R., White F. v., Wambach J., Whitsett J.A., Cole F.S., Morrisey E.E., Guttentag S.H., Beers M.F., Kotton D.N. (2017). Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells into Functional Lung Alveolar Epithelial Cells. *Cell Stem Cell* 21: 472. doi:10.1016/j.stem.2017.08.014.
120. Jacob A., Vedaie M., Roberts D.A., Thomas D.C., Villacorta-Martin C., Alysandratos K.D., Hawkins F., Kotton D.N. (2019). Derivation of self-renewing lung alveolar epithelial type II cells from human pluripotent stem cells. *Nature Protocols* 14: 3303. doi:10.1038/s41596-019-0220-0.
121. D'Amour K.A., Agulnick A.D., Eliazar S., Kelly O.G., Kroon E., Baetge E.E. (2005). Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nature Biotechnology* 23: 1534. doi:10.1038/nbt1163.

122. Korostylev A., Mahaddalkar P.U., Keminer O., Hadian K., Schorpp K., Gribbon P. & Lickert H. (2017). A high-content small molecule screen identifies novel inducers of definitive endoderm. *Molecular Metabolism* 6: 640–650. doi:10.1016/j.molmet.2017.04.009.
123. Kadzik R.S., Morrisey E.E. (2012). Directing lung endoderm differentiation in pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 10: 355–361. doi:10.1016/j.stem.2012.03.013.
124. Mou H., Zhao R., Sherwood R., Ahfeldt T., Lapey A., Wain J., Sicilian L., Izvolsky K., Lau F.H., Musunuru K., Cowan C., Rajagopal J. (2012). Generation of Multipotent Lung and Airway Progenitors from Mouse ESCs and Patient-Specific Cystic Fibrosis iPSCs. *Cell Stem Cell* 10: 385. doi:10.1016/J.STEM.2012.01.018.
125. Longmire T.A., Ikonomou L., Hawkins F., Christodoulou C., Cao Y., Jean J.C., Kwok L.W., Mou H., Rajagopal J., Shen S.S., Downton A.A., Serra M., Weiss D.J., Green M.D., Snoeck H.W., Ramirez M.I., Kotton D.N. (2012). Efficient derivation of purified lung and thyroid progenitors from embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 10: 398. doi:10.1016/j.stem.2012.01.019.
126. Firth A.L., Dargitz C.T., Qualls S.J., Menon T., Wright R., Singer O., Gage F.H., Khanna A., Verma I.M. (2014). Generation of multiciliated cells in functional airway epithelia from human induced pluripotent stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111: E1723. doi:10.1073/pnas.1403470111.
127. Green M.D., Chen A., Nostro M.C., d'Souza S.L., Schaniel C., Lemischka I.R., Gouon-Evans V., Keller G., Snoeck H.W. (2011). Generation of anterior foregut endoderm from human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology* 29: 267. doi:10.1038/nbt.1788.
128. Stabler C.T., Morrisey E.E. (2017). Developmental pathways in lung regeneration. *Cell and Tissue Research* 367: 677. doi:10.1007/s00441-016-2537-0.
129. Rankin S.A., Zorn A.M. (2014). Gene Regulatory Networks Governing Lung Specification. *Journal of Cellular Biochemistry* 115: 1343. doi:10.1002/jcb.24810.
130. Domyan E.T., Ferretti E., Throckmorton K., Mishina Y., Nicolis S.K., Sun X. (2011). Signaling through BMP receptors promotes respiratory identity in the foregut via repression of Sox2. *Development* 138: 971. doi:10.1242/dev.053694.
131. Ghaedi M., Niklason L.E., Williams J. (2015). Development of Lung Epithelium from Induced Pluripotent Stem Cells. *Current Transplantation Reports* 2: 81. doi:10.1007/S40472-014-0039-0.
132. Ninomiya N., Michiue T., Asashima M., Kurisaki A. (2013). BMP signaling regulates the differentiation of mouse embryonic stem cells into lung epithelial cell lineages. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* 49: 230. doi:10.1007/s11626-013-9589-1.
133. Rankin S.A., McCracken K.W., Luedeke D.M., Han L., Wells J.M., Shannon J.M., Zorn A.M. (2018). Timing is everything: Reiterative Wnt, BMP and RA signaling regulate developmental competence during endoderm organogenesis. *Developmental Biology* 434: 121. doi:10.1016/J.YDBIO.2017.11.018.
134. Herriges M., Morrisey E.E. (2014). Lung development: Orchestrating the generation and regeneration of a complex organ. *Development* 141: 502. doi:10.1242/dev.098186.
135. Perin S., McCann C.J., Borrelli O., De Coppi P., Thapar N. (2017). Update on Foregut Molecular Embryology and Role of Regenerative Medicine Therapies. *Frontiers in Pediatrics* 5: 91. doi:10.3389/fped.2017.00091.
136. Domyan E.T., Sun X. (2011). – Patterning and plasticity in development of the respiratory lineage. *Developmental Dynamics* 240: 477. doi:10.1002/dvdy.22504.
137. Ghaedi M., Mendez J.J., Bove P.F., Sivarapatna A., Raredon M.S.B., Niklason L.E. (2014). Alveolar epithelial differentiation of human induced pluripotent stem cells in a rotating bioreactor. *Biomaterials* 35: 699. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.10.018.
138. Duval K., Grover H., Han L.H., Mou Y., Pegoraro A.F., Fredberg J., Chen Z. (2017). Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology* 32: 266. doi:10.1152/PHYSIOL.00036.2016.

139. Dye B.R., Hill D.R., Ferguson M.A., Tsai Y.H., Nagy M.S., Dyal R., Wells J.M., Mayhew C.N., Nattiv R., Klein O.D., White E.S., Deutsch G.H., Spence J.R. (2015). In vitro generation of human pluripotent stem cell derived lung organoids. *Elife* 4: 1. doi:10.7554/ELIFE.05098.
140. Yin X., Mead B.E., Safaee H., Langer R., Karp J.M., Levy O. (2016). Engineering Stem Cell Organoids. *Cell Stem Cell* 18: 25. doi:10.1016/j.stem.2015.12.005.
141. Simian M., Bissell M.J. (2017). Organoids: A historical perspective of thinking in three dimensions. *The Journal of Cell Biology* 216: 31. doi:10.1083/JCB.201610056.
142. Brickman J.M., Serup P. (2017). – Properties of embryoid bodies. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 6: e259. doi:10.1002/WDEV.259.
143. Weatherbee B.A.T., Cui T., Zernicka-Goetz M. (2021). Modeling human embryo development with embryonic and extra-embryonic stem cells. *Developmental Biology* 474: 91. doi:10.1016/J.YDBIO.2020.12.010.
144. Centeno E.G.Z., Cimarosti H., Bithell A. (2018). 2D versus 3D human induced pluripotent stem cell-derived cultures for neurodegenerative disease modelling. *Molecular Neurodegeneration* 13: 27. doi:10.1186/S13024-018-0258-4.
145. Clevers H. (2016). Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell* 165: 1586. doi:10.1016/j.cell.2016.05.082.
146. Kaushik G., Ponnusamy M.P., Batra S.K. (2018). Concise Review: Current Status of Three-Dimensional Organoids as Preclinical Models. *Stem Cells* 36: 1329. doi:10.1002/stem.2852.
147. Dutta D., Heo I., Clevers H. (2017). Disease Modeling in Stem Cell-Derived 3D Organoid Systems. *Trends in Molecular Medicine* 23: 393. doi:10.1016/J.MOLMED.2017.02.007.
148. Lancaster M.A., Huch M. (2019). Disease modelling in human organoids. *Disease Models & Mechanisms* 12: dmm039347. doi:10.1242/DMM.039347.
149. Ho B.X., Pek N.M.Q., Soh B.S. (2018). Disease Modeling Using 3D Organoids Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 19: 936. doi:10.3390/IJMS19040936.
150. Wong A.P., Bear C.E., Chin S., Pasceri P., Thompson T.O., Huan L.J., Ratjen F., Ellis J., Rossant J. (2012). Directed differentiation of human pluripotent stem cells into mature airway epithelia expressing functional CFTR protein. *Nature Biotechnology* 30: 876. doi:10.1038/nbt.2328.
151. McCauley K.B., Hawkins F., Serra M., Thomas D.C., Jacob A., Kotton D.N. (2017). Efficient Derivation of Functional Human Airway Epithelium from Pluripotent Stem Cells via Temporal Regulation of Wnt Signaling. *Cell Stem Cell* 20: 844. doi:10.1016/J.STEM.2017.03.001.
152. Miller A.J., Dye B.R., Ferrer-Torres D., Hill D.R., Overeem A.W., Shea L.D., Spence J.R. (2019). Generation of lung organoids from human pluripotent stem cells in vitro. *Nature Protocols* 14: 518. doi:10.1038/S41596-018-0104-8.
153. Kanagaki S., Ikeo S., Suezawa T., Yamamoto Y., Seki M., Hirai T., Hagiwara M., Suzuki Y., Gotoh S. (2021). Directed induction of alveolar type I cells derived from pluripotent stem cells via Wnt signaling inhibition. *Stem Cells* 39:156. doi:10.1002/STEM.3302.
154. Lindner M., Laporte A., Block S., Elomaa L., Weinhart M. (2021). Physiological Shear Stress Enhances Differentiation, Mucus-Formation and Structural 3D Organization of Intestinal Epithelial Cells In Vitro. *Cells* 10: 2062. doi:10.3390/CELLS10082062.
155. Tannenbaum S.E., Reubinoff B.E. (2022). Advances in hPSC expansion towards therapeutic entities: A review. *Cell Proliferation* 55: e13247. doi: 10.1111/cpr.13247.

156. Elanzew A., Sommer A., Pusch-Klein A., Brüstle O., Haupt S. (2015). A reproducible and versatile system for the dynamic expansion of human pluripotent stem cells in suspension. *Biotechnology Journal* 10: 1589. doi:10.1002/BIOT.201400757.
157. Ngo T.T.T., Rossbach B., Sébastien I., Neubauer J.C., Kurtz A., Hariharan K. (2022). Functional differentiation and scalable production of renal proximal tubular epithelial cells from human pluripotent stem cells in a dynamic culture system. *Cell Proliferation* 55: e13190. doi:10.1111/CPR.13190.
158. Jenkins M.J., Farid S.S. (2015). Human pluripotent stem cell-derived products: Advances towards robust, scalable and cost-effective manufacturing strategies. *Biotechnology Journal* 10: 83. doi:10.1002/BIOT.201400348.
159. Hughes C.S., Postovit L.M., Lajoie G.A. (2010). Matrigel: A complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics* 10: 1886. doi:10.1002/pmic.200900758.
160. Singh C., Roy-Chowdhuri S. (2016). Quantitative Real-Time PCR: Recent Advances. *Methods of Molecular Biology* 1392: 161. doi:10.1007/978-1-4939-3360-0\_15.
161. Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402. doi:10.1006/METH.2001.1262.
162. Ohnuki M., Takahashi K. (2015). Present and future challenges of induced pluripotent stem cells. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 370: 20140367. doi:10.1098/RSTB.2014.0367.
163. Volpato V., Webber C. (2020). Addressing variability in iPSC-derived models of human disease: guidelines to promote reproducibility. *Disease Models & Mechanisms* 13: dmm042317. doi:10.1242/DMM.042317.
164. Kytälä A., Moraghebi R., Valensisi C., Kettunen J., Andrus C., Pasumarthy K.K., Nakanishi M., Nishimura K., Ohtaka M., Weltner J., Handel B. van, Parkkonen O., Sinisalo J., Jalanko A., Hawkins R.D., Woods N.B., Otonkoski T., Trokovic R. (2016). Genetic Variability Overrides the Impact of Parental Cell Type and Determines iPSC Differentiation Potential. *Stem Cell Reports* 6: 200. doi:10.1016/J.STEMCR.2015.12.009.
165. Ortmann D., Vallier L. (2017). Variability of human pluripotent stem cell lines. *Current Opinion in Genetics & Development* 46: 179. doi:10.1016/J.GDE.2017.07.004.
166. Fleischer A., Lorenzo I.M., Palomino E., Aasen T., Gómez F., Servera M., Asensio V.J., Gálvez V., Izpisua-Belmonte J.C., Bachiller D. (2018). Generation of two induced pluripotent stem cell (iPSC) lines from p.F508del Cystic Fibrosis patients. *Stem Cell Research* 29: 1. doi:10.1016/J.SCR.2018.03.004.
167. Kondrateva E., Adilgereeva E., Amelina E., Tabakov V., Demchenko A., Ustinov K., Yasinovsky M., Voronina E., Lavrov A., Smirnikhina S. (2020). Generation of induced pluripotent stem cell line (RCMGI001-A) from human skin fibroblasts of a cystic fibrosis patient with p.F508del mutation. *Stem Cell Research* 48: 101933. doi:10.1016/J.SCR.2020.101933.
168. Merkert S., Schubert M., Haase A., Janssens H.M., Scholte B., Lachmann N., Göhring G., Martin U. (2020). Generation of an induced pluripotent stem cell line (MHHI018-A) from a patient with Cystic Fibrosis carrying p.Asn1303Lys (N1303K) mutation. *Stem Cell Research* 44: 101744. doi:10.1016/J.SCR.2020.101744.
169. Khor W., Hwang T.C., Wang C.C., Yarmishyn A.A., Yeh J.T., Chiou S.H. & Chou S.J. (2022). – Generation of human induced pluripotent stem cells from cystic fibrosis patient carrying nonsense mutation (p.S308X) in CFTR gene. *Stem Cell Research* 60: 102683. doi:10.1016/J.SCR.2022.102683.

170. Fleischer A., Vallejo-Díez S., Martín-Fernández J.M., Sánchez-Gilabert A., Castresana M., Pozo A. del, Esquisabel A., Ávila S., Castrillo J.L., Gaínza E., Pedraz J.L., Viñas M. & Bachiller D. (2020). – iPSC-Derived Intestinal Organoids from Cystic Fibrosis Patients Acquire CFTR Activity upon TALEN-Mediated Repair of the p.F508del Mutation. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development* 17: 858. doi:10.1016/J.OMTM.2020.04.005.
171. Boj S.F., Vonk A.M., Statia M., Su J., Vries R.R.G., Beekman J.M., Clevers H. (2017). Forskolin-induced Swelling in Intestinal Organoids: An In Vitro Assay for Assessing Drug Response in Cystic Fibrosis Patients. *Journal of Visualized Experiments* 2017: e55159. doi:10.3791/55159.
172. Valley H.C., Bukis K.M., Bell A., Cheng Y., Wong E., Jordan N.J., Allaire N.E., Sivachenko A., Liang F., Bihler H., Thomas P.J., Mahiou J., Mense M. (2019). Isogenic cell models of cystic fibrosis-causing variants in natively expressing pulmonary epithelial cells. *Journal of Cystic Fibrosis* 18: 476. doi:10.1016/J.JCF.2018.12.001.
173. Kim E.J., Kang K.H., Ju J.H. (2017). CRISPR-Cas9: a promising tool for gene editing on induced pluripotent stem cells. *The Korean Journal of Internal Medicine* 32: 42. doi:10.3904/KJIM.2016.198.
174. Schwank G., Koo B.K., Sasselli V., Dekkers J.F., Heo I., Demircan T., Sasaki N., Boymans S., Cuppen E., Ent C.K. van der, Nieuwenhuis E.E.S., Beekman J.M., Clevers H. (2013). Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell* 13: 653. doi:10.1016/J.STEM.2013.11.002.
175. Smirnikhina S.A., Kondrateva E. v., Adilgereeva E.P., Anuchina A.A., Zaynitdinova M.I., Slesarenko Y.S., Ershova A.S., Ustinov K.D., Yasinovsky M.I., Amelina E.L., Voronina E.S., Yakushina V.D., Tabakov V.Y., Lavrov A. v. (2020). P.F508del editing in cells from cystic fibrosis patients. *PLoS ONE* 15: e0242094. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0242094.
176. Vaidyanathan S., Salahudeen A.A., Sellers Z.M., Bravo D.T., Choi S.S., Batish A., Le W., Baik R., la O S. de, Kaushik M.P., Galper N., Lee C.M., Teran C.A., Yoo J.H., Bao G., Chang E.H., Patel Z.M., Hwang P.H., Wine J.J., Milla C.E., Desai T.J., Nayak J. v., Kuo C.J., Porteus M.H. (2020). High-Efficiency, Selection-free Gene Repair in Airway Stem Cells from Cystic Fibrosis Patients Rescues CFTR Function in Differentiated Epithelia. *Cell Stem Cell* 26: 161. doi:10.1016/J.STEM.2019.11.002.
177. Mercier J., Ruffin M., Corvol H., Guillot L. (2021). Gene Therapy: A Possible Alternative to CFTR Modulators? *Frontiers in Pharmacology* 12: 648203. doi:10.3389/FPHAR.2021.648203.
178. Zhou Z.P., Yang L.L., Cao H., Chen Z.R., Zhang Y., Wen X.Y., Hu J. (2019). In Vitro Validation of a CRISPR-Mediated CFTR Correction Strategy for Preclinical Translation in Pigs. *Human Gene Therapy* 30: 1101. doi:10.1089/HUM.2019.074.
179. Jensen C., Teng Y. (2020). Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Frontiers in Molecular Biosciences* 7: 33. doi:10.3389/FMOLB.2020.00033.
180. Chitcholtan K., Asselin E., Parent S., Sykes P.H., Evans J.J. (2013). Differences in growth properties of endometrial cancer in three dimensional (3D) culture and 2D cell monolayer. *Experimental Cell Research* 319: 75. doi:10.1016/J.YEXCR.2012.09.012.
181. Costa E.C., Moreira A.F., Melo-Diogo D. de, Gaspar V.M., Carvalho M.P., Correia I.J. (2016). 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnology Advances* 34: 1427. doi:10.1016/J.BIOTECHADV.2016.11.002.
182. Kleinman H.K., Martin G.R. (2005). Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity. *Seminars in Cancer Biology* 15 (5): 378. doi:10.1016/J.SEMCANCER.2005.05.004.
183. Corbett J.L., Duncan S.A. (2019). iPSC-Derived Hepatocytes as a Platform for Disease Modeling and Drug Discovery. *Frontiers in Medicine* 6: 265. doi:10.3389/FMED.2019.00265.

184. Absalan F., Pasandi M.S., Ghasemi Hamidabadi H., Saeednia S., Bojnordi M.N., Zahiri M., Alizadeh R., Bagher Z. (2021). Matrigel enhances differentiation of human adipose tissue-derived stem cells into dopaminergic neuron. *Neuroscience Letters* 760: 136070. doi:10.1016/J.NEULET.2021.136070.
185. Sato T., Vries R.G., Snippert H.J., Wetering M. van de, Barker N., Stange D.E., Es J.H. van, Abo A., Kujala P., Peters P.J., Clevers H. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459: 262. doi:10.1038/nature07935.
186. Sato T., Stange D.E., Ferrante M., Vries R.G.J., Es J.H. van, Brink S. van den, Houdt W.J. van, Pronk A., Gorp J. van, Siersema P.D., Clevers H. (2011). Long-term Expansion of Epithelial Organoids From Human Colon, Adenoma, Adenocarcinoma, and Barrett's Epithelium. *Gastroenterology* 141: 1762. doi:10.1053/J.GASTRO.2011.07.050.
187. Lancaster M.A., Knoblich J.A. (2014). Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nature Protocols* 9: 2329. doi:10.1038/nprot.2014.158.
188. Kozłowski M.T., Crook C.J., Ku H.T. (2021). Towards organoid culture without Matrigel. *Communications Biology* 4: 1387. doi:10.1038/S42003-021-02910-8.
189. Egger D., Tripisciano C., Weber V., Dominici M., Kasper C. (2018). Dynamic Cultivation of Mesenchymal Stem Cell Aggregates. *Bioengineering* 5: 48. doi:10.3390/BIOENGINEERING5020048.
190. Giandomenico S.L., Sutcliffe M., Lancaster M.A. (2021). Generation and long-term culture of advanced cerebral organoids for studying later stages of neural development. *Nature Protocols* 16: 579. doi:10.1038/S41596-020-00433-W.
191. Shparberg R.A., Glover H.J., Morris M.B. (2019). Embryoid Body Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells into Neurectoderm and Neural Progenitors. *Methods in Molecular Biology* 2029: 273. doi:10.1007/978-1-4939-9631-5\_21.
192. Garcia-Alegria E., Potts B., Menegatti S., Kouskoff V. (2021). In vitro differentiation of human embryonic stem cells to hemogenic endothelium and blood progenitors via embryoid body formation. *STAR Protocols* 2: 100367. doi:10.1016/J.XPRO.2021.100367.
193. Przepiorski A., Sander V., Tran T., Hollywood J.A., Sorrenson B., Shih J.H., Wolvetang E.J., McMahon A.P., Holm T.M., Davidson A.J. (2018). A Simple Bioreactor-Based Method to Generate Kidney Organoids from Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports* 11: 470. doi:10.1016/J.STEMCR.2018.06.018.
194. Zhang J., Wilson G.F., Soerens A.G., Koonce C.H., Yu J., Palecek S.P., Thomson J.A., Kamp T.J. (2009). – Functional Cardiomyocytes Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Circulation Research* 104: e30. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.192237.
195. Altmaier S., Meiser I., Lemesre E., Chanrion B., Steeg R., Leonte L.E., Holst B., Nielsen B.S., Clausen C., Schmidt K., Vinggaard A.M., Zimmermann H., Neubauer J.C., Rasmussen M.A. (2022). Human iPSC-derived hepatocytes in 2D and 3D suspension culture for cryopreservation and in vitro toxicity studies. *Reproductive Toxicology* 111: 68. doi:10.1016/j.reprotox.2022.05.005.
196. Fischer B., Meier A., Dehne A., Salhotra A., Tran T.A., Neumann S., Schmidt K., Meiser I., Neubauer J.C., Zimmermann H., Gentile L. (2018). A complete workflow for the differentiation and the dissociation of hiPSC-derived cardiospheres. *Stem Cell Research* 32: 65. doi:10.1016/J.SCR.2018.08.015.
197. Keong Kwok C., Sébastien I., Hariharan K., Meiser I., Wihan J., Altmaier S., Karnatz I., Feile A., Cabrera-Socorro A., Rasmussen M., Holst B., Neubauer J.C., Clausen C., Verfaillie C., Ebnet A., Hansson M., Steeg R., Zimmermann H. (2022). Scalable expansion of iPSC and their derivatives across multiple lineages. *Reproductive Toxicology* 112: 23. doi.org/10.1016/j.reprotox.2022.05.007.
198. Lin C.Y., Huang C.H., Wu Y.K., Cheng N.C., Yu J. (2014). – Maintenance of human adipose derived stem cell (hASC) differentiation capabilities using a 3D culture. *Biotechnology Letters* 36: 1529. doi:10.1007/S10529-014-1500-Y.



199. Rashidi H., Alhaque S., Szkolnicka D., Flint O., Hay D.C. (2016). Fluid shear stress modulation of hepatocyte-like cell function. *Archives of Toxicology* 90: 1757. doi:10.1007/S00204-016-1689-8.
200. Wolfe R.P., Ahsan T. (2013). Shear stress during early embryonic stem cell differentiation promotes hematopoietic and endothelial phenotypes. *Biotechnology and Bioengineering* 110: 1231. doi:10.1002/BIT.24782.
201. Huang Y., Chen X., Che J., Zhan Q., Ji J., Fan Y. (2019). Shear Stress Promotes Arterial Endothelium-Oriented Differentiation of Mouse-Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells International* 2019: 1847098. doi:10.1155/2019/1847098.
202. Nsiah B.A., Ahsan T., Griffiths S., Cooke M., Nerem R.M., Mcdevitt T.C. (2014). Fluid Shear Stress Pre-Conditioning Promotes Endothelial Morphogenesis of Embryonic Stem Cells Within Embryoid Bodies. *Tissue Engineering, Part A*, 20: 954. doi: 10.1089/ten.TEA.2013.0243.
203. Zeevaert K., Elsafi Mabrouk M.H., Wagner W., Goetzke R. (2020). Cell Mechanics in Embryoid Bodies. *Cells* 9: 2270. doi:10.3390/CELLS9102270.
204. Diekmann U., Wolling H., Dettmer R., Niwolik I., Naujok O., Buettner F.F.R. (2019). Chemically defined and xenogeneic-free differentiation of human pluripotent stem cells into definitive endoderm in 3D culture. *Scientific Reports* 9: 1–14. doi:10.1038/s41598-018-37650-z.
205. Bluhmki T., Traub S., Müller A.K., Bitzer S., Schruf E., Bammert M.T., Leist M., Gantner F., Garnett J.P., Heilker R. (2021). Functional human iPSC-derived alveolar-like cells cultured in a miniaturized 96 Transwell air-liquid interface model. *Scientific Reports* 11: 17028. doi:10.1038/S41598-021-96565-4.
206. Rodríguez-Hernández M.A., Chapresto-Garzón R., Cadenas M., Navarro-Villarán E., Negrete M., Gómez-Bravo M.A., Víctor V.M., Padillo F.J., Muntané J. (2020). Differential effectiveness of tyrosine kinase inhibitors in 2D/3D culture according to cell differentiation, p53 status and mitochondrial respiration in liver cancer cells. *Cell Death and Disease* 11: 339. doi:10.1038/S41419-020-2558-1.
207. Mora-Roldan G.A., Ramirez-Ramirez D., Pelayo R., Gazarian K. (2021). Assessment of the Hematopoietic Differentiation Potential of Human Pluripotent Stem Cells in 2D and 3D Culture Systems. *Cells* 10: 2858. doi:10.3390/CELLS10112858.
208. Liu Y., Beyer A., Aebersold R. (2016). On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell* 165: 535. doi:10.1016/J.CELL.2016.03.014.
209. Ng-Blichfeldt J.P., Schrik A., Kortekaas R.K., Noordhoek J.A., Heijink I.H., Hiemstra P.S., Stolk J., Königshoff M., Gosens R. (2018). Retinoic acid signaling balances adult distal lung epithelial progenitor cell growth and differentiation. *EBioMedicine* 36: 461. doi:10.1016/J.EBIOM.2018.09.002.
210. Rockich B.E., Hrycaj S.M., Shih H.P., Nagy M.S., Ferguson M.A.H., Kopp J.L., Sander M., Wellik D.M., Spence J.R. (2013). Sox9 plays multiple roles in the lung epithelium during branching morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: E4456. doi:10.1073/PNAS.1311847110/-/DCSUPPLEMENTAL.
211. Dame K., Ribeiro A.J.S. (2021). Microengineered systems with iPSC-derived cardiac and hepatic cells to evaluate drug adverse effects. *Experimental Biology and Medicine* 246: 317. doi:10.1177/1535370220959598.
212. Handel A.E., Chintawar S., Lalic T., Whiteley E., Vowles J., Giustacchini A., Argoud K., Sopp P., Nakanishi M., Bowden R., Cowley S., Newey S., Akerman C., Ponting C.P., Cader M.Z. (2016). Assessing similarity to primary tissue and cortical layer identity in induced pluripotent stem cell-derived cortical neurons through single-cell transcriptomics. *Human Molecular Genetics* 25: 989. doi:10.1093/HMG/DDV637.
213. Gotoh S., Ito I., Nagasaki T., Yamamoto Y., Konishi S., Korogi Y., Matsumoto H., Muro S., Hirai T., Funato M., Mae S.I., Toyoda T., Sato-Otsubo A., Ogawa S., Osafune K., Mishima M. (2014). Generation of alveolar epithelial spheroids via isolated progenitor cells from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* 3: 394–403. doi:10.1016/J.STEMCR.2014.07.005.

214. Lewin G., Hurtt M.E. (2017). Pre- and Postnatal Lung Development: An Updated Species Comparison. *Birth Defects Research*, 109 (19), 1519–1539. doi:10.1002/BDR2.1089.
215. Abo K.M., Aja J.S. de, Lindstrom-Vautrin J., Alysandratos K.D., Richards A., Garcia-De-Alba C., Huang J., Hix O.T., Werder R.B., Bullitt E., Hinds A., Falconer I., Villacorta-Martin C., Jaenisch R., Kim C.F., Kotton D.N. & Wilson A.A. (2022). Air-liquid interface culture promotes maturation and allows environmental exposure of pluripotent stem cell-derived alveolar epithelium. *Journal of clinical investigation insight* 7: e155589. doi: 10.1172/jci.insight.155589.
216. Schruf E., Schroeder V., Le H.Q., Schönberger T., Raedel D., Stewart E.L., Fundel-Clemens K., Bluhmki T., Weigle S., Schuler M., Thomas M.J., Heilker R., Webster M.J., Dass M., Frick M., Stierstorfer B., Quast K., Garnett J.P. (2020). Recapitulating idiopathic pulmonary fibrosis related alveolar epithelial dysfunction in a human iPSC-derived air-liquid interface model. *FASEB Journal* 34: 7825. doi:10.1096/FJ.201902926R.
217. Van Riet S., Ninaber D.K., Mikkers H.M.M., Tetley T.D., Jost C.R., Mulder A.A., Pasma T., Baptista D., Poot A.A., Truckenmüller R., Mummery C.L., Freund C., Rottier R.J, Hiemstra P.S. (2020). In vitro modelling of alveolar repair at the air-liquid interface using alveolar epithelial cells derived from human induced pluripotent stem cells. *Scientific Reports* 10: 5499. doi:10.1038/S41598-020-62226-1.
218. Mustafa S.B., Isaac J., Seidner S.R., Dixon P.S., Henson B.M., Digeronimo R.J. (2014). Mechanical stretch induces lung  $\alpha$ -epithelial Na(+) channel expression. *Experimental Lung Research* 40: 380. doi:10.3109/01902148.2014.934410.
219. Wang Y., Maciejewski B.S., Soto-Reyes D., Lee H.S., Warburton D. & Sanchez-Esteban J. (2009). Mechanical stretch promotes fetal type II epithelial cell differentiation via shedding of HB-EGF and TGF- $\alpha$ . *Journal of Physiology* 587: 1739. doi:10.1113/JPHYSIOL.2008.163899.
220. Amaral M.D., Hutt D.M., Tomati V., Botelho H.M., Pedemonte N. (2020). CFTR processing, trafficking and interactions. *Journal of Cystic Fibrosis* 19: S33. doi:10.1016/J.JCF.2019.10.017.
221. Trezise A.E.O., Farinha C.M., Heda G.D., Harris A., Amaral M.D., Mouchel N. (2004). Non-PCR methods for the analysis of CFTR transcripts. *Journal of Cystic Fibrosis* 3: 25. doi:10.1016/J.JCF.2004.05.005.
222. Billet A., Froux L., Hanrahan J.W., Becq F. (2017). Development of Automated Patch Clamp Technique to Investigate CFTR Chloride Channel Function. *Frontiers in Pharmacology* 8: 195. doi:10.3389/FPHAR.2017.00195.
223. Calucho M., Gartner S., Barranco P., Fernández-Álvarez P., Pérez R.G., Tizzano E.F. (2021). Validation of nasospheroids to assay CFTR functionality and modulator responses in cystic fibrosis. *Scientific Reports* 11: 15511. doi:10.1038/S41598-021-94798-X.
224. Dekkers J.F., Wiegerinck C.L., Jonge H.R. de, Bronsveld I., Janssens H.M., Winter-De Groot K.M. de, Brandsma A.M., Jong N.W.M. de, Bijvelds M.J.C., Scholte B.J., Nieuwenhuis E.E.S., Brink S. van den, Clevers H., Ent C.K. van der, Middendorp S., Beekman J.M. (2013). A functional CFTR assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids. *Nature Medicine* 19: 939. doi:10.1038/NM.3201.
225. Dong M., Zhang J., Ma X., Tan J., Chen L., Liu S., Xin Y., Zhuang L. (2020). – ACE2, TMPRSS2 distribution and extrapulmonary organ injury in patients with COVID-19. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 131: 110678. doi:10.1016/J.BIOPHA.2020.110678.
226. Sucre J.M.S., Jetter C.S., Loomans H., Williams J., Plosa E.J., Benjamin J.T., Young L.R., Kropski J.A., Calvi C.L., Kook S., Wang P., Gleaves L., Eskaros A., Goetzl L., Blackwell T.S., Guttentag S.H. & Zijlstra A. (2018). Successful establishment of primary type II alveolar epithelium with 3D organotypic coculture. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 59: 158. doi:10.1165/RCMB.2017-0442MA.
227. Barkauskas C.E., Crouse M.J., Rackley C.R., Bowie E.J., Keene D.R., Stripp B.R., Randell S.H., Noble P.W., Hogan B.L.M. (2013). Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *Journal of Clinical Investigation* 123: 3025. doi:10.1172/JCI68782.

228. Ugorski M., Dziegiel P., Suchanski J. (2016). Podoplanin - a small glycoprotein with many faces. *American Journal of Cancer Research* 6: 370. PMID: 27186410.
229. Huang J., Hume A.J., Abo K.M., Werder R.B., Villacorta-Martin C., Alysandratos K.D., Beermann M., Simone-Roach C., Lindstrom-Vautrin J., Olejnik J., Suder E.L., Bullitt E., Hinds A., Sharma A., Bosmann M., Wang R., Hawkins F., Burks E.J., Saeed M., Wilson A.A., Mühlberger E., Kotton D.N. (2020). SARS-CoV-2 Infection of Pluripotent Stem Cell-Derived Human Lung Alveolar Type 2 Cells Elicits a Rapid Epithelial-Intrinsic Inflammatory Response. *Cell Stem Cell* 27: 962. doi:10.1016/J.STEM.2020.09.013.
230. Stanton B.A., Hampton T.H., Ashare A. (2020). The Pathophysiology of COVID-19 and SARS-CoV-2 Infection: SARS-CoV-2 (COVID-19) and cystic fibrosis. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 319: L408. doi:10.1152/AJPLUNG.00225.2020.
231. Zhao Y., Zhao Z., Wang Y., Zhou Y., Ma Y., Zuo W. (2020). – Single-Cell RNA Expression Profiling of ACE2, the Receptor of SARS-CoV-2. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 202: 756. doi:10.1164/RCCM.202001-0179LE.
232. Whaley D., Damyar K., Witek R.P., Mendoza A., Alexander M., Lakey J.R.T. (2021). Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations. *Cell Transplantation* 30: 963689721999617. doi:10.1177/0963689721999617.
233. Preininger M.K., Singh M., Xu C. (2016). Cryopreservation of Human Pluripotent Stem Cell-derived Cardiomyocytes: Strategies, Challenges, and Future Directions. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 951: 123. doi:10.1007/978-3-319-45457-3\_10.
234. Li C. jin, Wang D., Zhou X. (2016). Sperm proteome and reproductive technologies in mammals. *Animal Reproduction Science* 173: 1. doi:10.1016/J.ANIREPROSCI.2016.08.008.
235. Adjirackor N.A., Harvey K.E., Harvey S.C. (2020). Eukaryotic response to hypothermia in relation to integrated stress responses. *Cell Stress Chaperones* 25: 833. doi:10.1007/S12192-020-01135-8.
236. Stucki J.D., Hobi N., Galimov A., Stucki A.O., Schneider-Daum N., Lehr C.M., Huwer H., Frick M., Funke-Chambour M., Geiser T., Guenat O.T. (2018). Medium throughput breathing human primary cell alveolus-on-chip model. *Scientific Reports* 8: 14359. doi:10.1038/s41598-018-32523-x.
237. Zamprogno P., Wüthrich S., Achenbach S., Thoma G., Stucki J.D., Hobi N., Schneider-Daum N., Lehr C.M., Huwer H., Geiser T., Schmid R.A., Guenat O.T. (2021). Second-generation lung-on-a-chip with an array of stretchable alveoli made with a biological membrane. *Communications Biology* 4: 168. doi:10.1038/S42003-021-01695-0.
238. Nawroth J.C., Barrile R., Conegliano D., Riet S. van, Hiemstra P.S., Villenave R. (2019). Stem cell-based Lung-on-Chips: The best of both worlds? *Advanced Drug Delivery Reviews* 140: 12. doi:10.1016/J.ADDR.2018.07.005.

## Publikationen

### Artikel in Fachzeitschriften

\*gleichberechtigte Erstautorenschaft

**Müller M**, Kohl Y, Germann A, Wagner S, Zimmermann H, von Briesen H: A Comparative Gene and Protein Expression Analysis of 2D- and 3D-differentiated hiPSC-derived Alveolar Epithelial Cells for Preclinical Drug and Toxicity Testing. *Stem Cell Research*, **2022** under review

Moreira A, **Müller M**, Costa PF, Kohl Y: Advanced In Vitro Lung Models for Drug and Toxicity Screening: The Promising Role of Induced Pluripotent Stem Cells. *Adv Biol (Weinh)*. **2022** Feb;6(2):e2101139. doi: 10.1002/adbi.202101139. Epub 2021 Dec 27. PMID: 34962104.

Jimeno-Romero A, Gwinner F, **Müller M**, Mariussen E, Soto M, Kohl Y: Sea Bass Primary Cultures versus RTgill-W1 Cell Line: Influence of Cell Model on the Sensitivity to Nanoparticles. *Nanomaterials (Basel)*. **2021** Nov 20;11(11):3136. doi: 10.3390/nano11113136. PMID: 34835900; PMCID: PMC8620814.

Kohl Y, **Hesler M**, Drexel R, Kovar L, Dähnhardt-Pfeiffer S, Selzer D, Wagner S, Lehr T, von Briesen H, Meier F: Influence of Physicochemical Characteristics and Stability of Gold and Silver Nanoparticles on Biological Effects and Translocation across an Intestinal Barrier-A Case Study from In Vitro to In Silico. *Nanomaterials (Basel)*. **2021** May 21;11(6):1358. doi: 10.3390/nano11061358. PMID: 34063963; PMCID: PMC8224057.

Kohl Y, Biehl M, Spring S, **Hesler M**, Ogourtsov V, Todorovic M, Owen J, Elje E, Kopecka K, Moriones OH, Bastús NG, Simon P, Dubaj T, Rundén-Pran E, Puentes V, William N, von Briesen H, Wagner S, Kapur N, Mariussen E, Nelson A, Gabelova A, Dusinska M, Velten T, Knoll T: Microfluidic In Vitro Platform for (Nano)Safety and (Nano)Drug Efficiency Screening. *Small*. **2021** Apr;17(15):e2006012. doi: 10.1002/sml.202006012. Epub 2021 Jan 18. PMID: 33458959.

**Hesler M\***, Schwarz DH\*, Dähnhardt-Pfeiffer S, Wagner S, von Briesen H, Wenz G, Kohl Y: Synthesis and in vitro evaluation of cyclodextrin hyaluronic acid conjugates as a new candidate for intestinal drug carrier for steroid hormones. *Eur J Pharm Sci*. **2020** Feb 15;143:105181. doi: 10.1016/j.ejps.2019.105181. Epub 2019 Dec 15. PMID: 31852628.

Kohl Y, Rundén-Pran E, Mariussen E, **Hesler M**, El Yamani N, Longhin EM, Dusinska M: Genotoxicity of Nanomaterials: Advanced In Vitro Models and High Throughput Methods for Human Hazard Assessment-A Review. *Nanomaterials (Basel)*. **2020** Sep 25;10(10):1911. doi: 10.3390/nano10101911. PMID: 32992722; PMCID: PMC7601632.

Owen J, Kuznecovs M, Bhamji R, William N, Domenech-Garcia N, **Hesler M**, Knoll T, Kohl Y, Nelson A, Kapur N: High-throughput electrochemical sensing platform for screening nanomaterial-biomembrane interactions. *Rev Sci Instrum*. **2020** Feb 1;91(2):025002. doi: 10.1063/1.5131562. PMID: 32113378.

**Hesler M\***, Aengenheister L\*, Ellinger B, Drexel R, Straskraba S, Jost C, Wagner S, Meier F, von Briesen H, Büchel C, Wick P, Buerki-Thurnherr T, Kohl Y: Multi-endpoint toxicological assessment of polystyrene nano- and microparticles in different biological models in vitro. *Toxicol In Vitro*. **2019** Dec;61:104610. doi: 10.1016/j.tiv.2019.104610. Epub 2019 Jul 27. PMID: 31362040.

**Hesler M**, Kohl Y, Wagner S, von Briesen H: Non-pooled Human Platelet Lysate: A Potential Serum Alternative for *In Vitro* Cell Culture. *Altern Lab Anim.* **2019** Jul-Sep;47(3-4):116-127. doi: 10.1177/0261192919882516. Epub 2019 Nov 8. PMID: 31698922.

Tran TA\*, **Hesler M\***, Moriones OH, Jimeno-Romero A, Fischer B, Bastús NG, Puentes V, Wagner S, Kohl Y, Gentile L: Assessment of iron oxide nanoparticle ecotoxicity on regeneration and homeostasis in the replacement model system *Schmidtea mediterranea*. *ALTEX.* **2019**;36(4):583-596. doi: 10.14573/altex.1902061. Epub 2019 Apr 26. PMID: 31026038.

Aengenheister L, Dugershaw BB, Manser P, Wichser A, Schoenenberger R, Wick P, **Hesler M**, Kohl Y, Straskraba S, Suter MJ, Buerki-Thurnherr T: Investigating the accumulation and translocation of titanium dioxide nanoparticles with different surface modifications in static and dynamic human placental transfer models. *Eur J Pharm Biopharm.* **2019** Sep;142:488-497. doi: 10.1016/j.ejpb.2019.07.018. Epub 2019 Jul 19. PMID: 31330257.

Elje E, **Hesler M**, Rundén-Pran E, Mann P, Mariussen E, Wagner S, Dusinska M, Kohl Y: The comet assay applied to HepG2 liver spheroids. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* **2019** Sep;845:403033. doi: 10.1016/j.mrgentox.2019.03.006. Epub 2019 Mar 29. PMID: 31561895.

## Vorträge

**Müller M**, Kohl Y, Wagner S, Zimmermann H, von Briesen H: Human induced pluripotent stem cell derived-alveolar epithelial cells: A Comparative Gene and Protein Expression Analysis of 2D- and 3D-differentiation. EUSAAT Congress 2018, 26.-29. September 2018, Linz, Österreich

**Hesler M**, Kittel A, Dähnhardt-Pfeiffer S, Metzger C, Herrmann C, Briesen H, von Briesen H, Wagner S, Kohl Y: Development of an *in vitro* alveolar lung model for the toxicological assessment of inhaled cellulose nanocrystals. Nanosafety 2020, 5.-7. Oktober 2020, Virtuelle Konferenz.

**Hesler M**, Kohl Y, Wagner S, von Briesen H: Human buffy-coat derived platelet lysate: comparison of single-patient and pooled units for the cultivation of different human cell lines. EUSAAT Congress 2018, 23.-26. September 2018, Linz, Österreich

Kohl Y, **Hesler M**, Spring S, Velten T, Wagner S, Knoll T: Chip-based platform: An *In vitro* approach for toxicity screening. OpenTox Europe, 9.-11. Oktober 2018, Athen, Griechenland

## Poster

**Hesler M**, Kittel A, Dähnhardt-Pfeiffer S, Metzger C, Herrmann C, Fink M, Briesen H, Krebs T, von Briesen H, Wagner S, Kohl Y: Exposure of cellulose nanocrystals on human lung cells at the air-liquid-interface. OpenTox 2020, 21.-25. September 2020, Virtuelle Konferenz.

**Hesler M**, Knoll T, Ritzmann F, Honecker A, Wagner S, Kohl Y, von Briesen H, Zimmermann H, Bals R, Beisswenger C: Microfluidic *in vitro* lung model to replace murine infection and ARDS models. EUSAAT 2019, 10.-13. Oktober 2019, Linz, Österreich.

**Hesler M**, Kohl Y, Knoll T, Spring S, Wagner S, Velten T: Advanced *in vitro* cell culture module for long-term cultivation and toxicity screening of nanomaterials. 3<sup>rd</sup> nanosafety forum for young scientists, 10.-11. September 2018, Valletta, Malta

**Hesler M**, Kohl Y, Wagner S, von Briesen H: Human buffy-coat derived platelet lysate: examination of specific characteristics of the barrier forming cell lines Caco-2, HepG2 and A549. Biobarriers 2018, 27.-29. August 2018, Saarbrücken, Deutschland

**Hesler M**, Straskraba S, Meier F, Kohl Y: Are nanoparticles harmful to the intestinal barrier? Dose-size- and modification dependent effects *in vitro* and *ex vivo*. Nanosafety 2017, 11.-13. Oktober 2017, Saarbrücken, Deutschland

**Hesler M**, Meier F, Straskraba S, Kohl Y: Do nanoparticles pass the intestinal barrier? Transport studies *in vitro* and *ex vivo*. Eurotox 2017, 10.-13. September 2017, Bratislava, Slowakei

**Hesler M**, Meier F, Straskraba S, Kohl Y: Transport studies of polystyrene nanoparticles across the intestinal barrier. Nanocare Cluster Meeting, 4.-5. Mai 2017, Eggenstein-Leopoldshafen, Deutschland

### **Auszeichnungen**

Best Poster Award, OpenTox 2020, 21.-25. September 2020, Virtuelle Konferenz

Best Poster Award, 3<sup>rd</sup> Nanosafety Forum for Young Scientists, 10.-11. September 2018, Valletta, Malta

Best Oral Presentation Award, EUSAAT Congress 2018, 23.-26. September 2018, Linz, Österreich

Young Scientists Travel Award, EUSAAT Congress 2018, 23.-26. September 2018, Linz, Österreich

GradUS global financial support for international activities, 2018, Universität des Saarlandes, Deutschland

## Danksagung

An dieser Stelle geht mein Dank an alle Begleiter und Unterstützer auf dem Weg zur Promotion. Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Heiko Zimmermann für die Möglichkeit, die Arbeit am Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik IBMT anfertigen zu dürfen und für die wertvollen Ideen, die den Inhalt dieser Arbeit maßgeblich geprägt haben.

Herrn Prof. Dr. Hagen von Briesen für die Betreuung der Promotion, seinem steten Interesse zum Fortgang der Arbeit und seiner beständigen Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Dr. Robert Bals, für die Übernahme des Koreferats und der wissenschaftlichen Begleitung meiner Arbeit.

Frau Dr. Sylvia Wagner für Ihre Betreuung und Unterstützung in allen wichtigen Belangen seit Beginn meiner Zeit am Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik IBMT.

Frau Dr. Yvonne Kohl, die mich seit Beginn meiner Zeit am Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik IBMT betreut und in allen wissenschaftlichen Belangen auf meinem Weg begleitet und unterstützt hat.

Frau Dr. Anja Germann für die Möglichkeit, in Ihrer Arbeitsgruppe virologische Experimente durchzuführen und für die ständige Diskussionsbereitschaft und Interesse am Fortgang der Arbeit.

Frau Martina Fuß und Frau Nicole Jost für die Hilfestellungen bei den virologischen Experimenten.

Frau Andrea Riedmayer für die wertvollen und kritischen Ratschläge zur Auswertung der Protein- und Genexpressionsanalysen.

Ich danke allen Kolleginnen und Kollegen des Fraunhofer-Instituts für Biomedizinische Technik IBMT, die durch Freundlichkeit, Hilfsbereitschaft und Teamgeist zu einem tollen Arbeitsumfeld beigetragen haben. Besonders hervorheben möchte ich Lena und Sascha Wien, Karin Danz, Thorsten Knoll und Linda Elberskirch.

Zuletzt danke ich von Herzen meiner Familie: meinem Mann Dany, meinen Eltern und Schwestern, die mich immer liebevoll unterstützt und stets an mich geglaubt haben.