

Aus der Klinik für Innere Medizin V

Pneumologie, Allergologie, Beatmungs- und Umweltmedizin

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. Dr. Robert Bals

Untersuchung der Wirkung von TLR-Liganden auf die Differenzierung von 3D-Bronchosphären

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

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2023

vorgelegt von: Richard Felix Sprott

geb. am: 08.12.1996 in Erfurt

Inhaltsverzeichnis

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
2	ZUSAMMENFASSUNG	3
2.1	Deutsche Zusammenfassung	3
2.2	Abstract	5
3	EINLEITUNG.....	7
3.1	Bronchialepithel	7
3.2	Organoide und Bronchosphären.....	8
3.3	Chronische Erkrankungen der Atemwege.....	10
3.4	Toll-like Rezeptoren und deren Liganden.....	11
3.5	Fragestellung	12
4	MATERIAL UND METHODEN.....	13
4.1	Geräte	13
4.2	Software	13
4.3	Kulturmedien und Lösungen	14
4.4	Gewinnung, Isolation und Kultivierung primärer Atemwegsepithelzellen.....	14
4.5	Kultivierung von Bronchosphären	15
4.6	Behandlung mit PAMPs.....	15
4.7	Phasenkontrastmikroskopie.....	16
4.8	Elektronenmikroskopie	16
4.9	Paraffineinbettung von Bronchosphären	17
4.9.1	Erarbeitung der Einbettungsmethode für die Erstellung histologischer Schnitte	17

4.9.2	Methode der Agaroseinbettung für die anschließende Paraffineinbettung.....	19
4.9.3	Paraffineinbettung und Erstellung histologischer Schnitte.....	20
4.10	Immunfluoreszenzfärbung.....	20
4.11	Immunhistochemie.....	21
4.12	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	21
4.13	Hellfeld- und Immunfluoreszenzmikroskopie.....	22
4.14	Statistische Auswertung.....	22
5	ERGEBNISSE.....	23
5.1	Die Kultivierung von primären Atemwegsepithelzellen in Matrigel führt zu einer Bildung von Bronchosphären.....	23
5.2	Die Behandlung mit PAMPs führt zu einer veränderten Differenzierung von Bronchosphären.....	24
5.2.1	Flagellin vermindert die Ausbildung von Bronchosphären mit sichtbaren Zilien...25	25
5.2.2	Flagellin vermindert die Ausbildung sichtbarer Lumina.....	26
5.2.3	Flagellin und Pam3CSK4 steigern die Mukusproduktion.....	29
5.2.4	PAMPs führen zu keiner Veränderung des Größenwachstums der Bronchosphären.....	32
6	DISKUSSION.....	34
6.1	Bronchosphären als Methode zur Untersuchung der Differenzierung des Bronchialepithels.....	34
6.2	Die Behandlung mit TLR-Liganden beeinflusst die Differenzierung der Bronchosphären.....	36
6.3	Die Behandlung mit Flagellin führt zu einer deutlich veränderten Differenzierung der Bronchosphären.....	37
6.4	PAMPs sind maßgeblich an der Pathophysiologie von CF und COPD beteiligt.....	38
6.5	Ausblick.....	40

7	LITERATURVERZEICHNIS	42
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	50
9	TABELLENVERZEICHNIS	51
10	VORTRÄGE UND PUBLIKATIONEN.....	52
11	DANKSAGUNG	53
12	ERKLÄRUNG GEMÄß § 7 ABSATZ 1 NR. 2 – EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	54
13	LEBENS LAUF.....	56

1 Abkürzungsverzeichnis

ALI	Air-liquid interface
AMP	Antimicrobial peptide
AJC	Apical junctional complex
ASL	Airway surface liquid
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BSA	Bovine serum albumin
CD	Cluster of differentiation
CF	Cystic fibrosis (Mukoviszidose)
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dsRNA	Double-stranded ribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>H. Influenzae</i>	<i>Haemophilus Influenzae</i>
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
IFN β	Interferon β
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IL-13	Interleukin 13
IL-17A	Interleukin 17A
IP-10	IFN-inducible protein 10
IRAK1	IL-1R-associated protein kinase 1
IRF3	Interferon regulatory factor 3
KRT5	Keratin 5

LPS	Lipopolysaccharide
MAP	Mitogen activated protein
MD2	myeloid differentiation 2
MDA5	Melanoma differentiation associated gene 5
Muc5AC	Mucin 5AC
MUC5B	Mucin 5B
MyD88	Myeloid differentiation factor 88
NF- κ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NLRC4	Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors family caspase-associated recruitment domain-containing protein 4
<i>P. Aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>
Pam3CSK4	Pam3CysSerLys4
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBS	Phosphate buffered saline
Poly(I:C)	Polyinosinic-polycytidylic acid
PRR	Pattern recognition receptor
RIG1	Retinoic acid-inducible gene I
TAK1	Transforming growth factor- β -activated kinase 1
TBS	Tris-buffered saline
TLR	Toll-like receptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRAF6	TNF receptor-associated factor 6
TRIF	Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adaptor protein inducing interferon- β

2 Zusammenfassung

2.1 Deutsche Zusammenfassung

Infektionen des Respirationstrakts tragen maßgeblich zur Verschlechterung von Lungenerkrankungen wie der Mukoviszidose (CF) und der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) bei. CF-Erkrankte leiden häufig unter chronischen Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa*, während *Haemophilus influenzae* bei Menschen mit COPD wiederholt akute und chronische Infektionen der Lunge verursacht. Darüber hinaus lösen virale Infektionen akute Verschlimmerungen (Exazerbationen) bei COPD-Patienten und -Patientinnen aus.

Bei Lungenorganoiden handelt es sich um selbstorganisierende Strukturen, die sich aus Vorläuferzellen des Lungenepithels bilden und dreidimensional kultiviert werden. Organoide bilden verschiedene Aspekte der Zellzusammensetzung, 3D-Architektur und Funktion von Organen ab. In den letzten Jahren haben sich Organoide zunehmend als geeignete Methode zur Untersuchung von Erkrankungen herausgestellt, vor allem als Alternative zu Tierversuchen. In den vergangenen Jahren wurden Protokolle publiziert, die es erlauben Bronchosphären aus Basalzellen zu differenzieren. Solche Bronchosphären sind aus Basalzellen, Zilienzellen sowie Becherzellen aufgebaut und verfügen über ein Lumen.

Ziel dieser Arbeit war es, die Kultivierung sowie eine Methodik zur Analyse von Bronchosphären zu etablieren. Folgend sollte untersucht werden, wie sich bestimmte *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), welche als Liganden für Toll-like Rezeptoren (TLRs) dienen, auf die Differenzierung von Basalzellen zu Bronchosphären auswirken. Hierfür wurden die Bronchosphären während der Differenzierungsphase mit dem synthetischen Lipopeptid Pam3CSK4, der synthetischen doppelsträngigen RNA Poly(I:C), bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS) und Flagellin aus *P. aeruginosa* behandelt. Im ersten Teil der Arbeit wurden Protokolle zur Kultivierung von Bronchosphären und ihrer histologischen Analyse etabliert. Mittels Übersichtsfärbungen sowie Fluoreszenz- und immunhistochemischen Färbungen konnten Zilienzellen, Basalzellen und sekretorische Zellen in einer Vielzahl an Organoiden je Kulturbedingung unterschieden werden.

Es wurde gezeigt, dass die Behandlung der Bronchosphären mit Flagellin, ein Virulenzfaktor begeißelter Bakterien wie *P. aeruginosa* und Ligand für TLR5, zu einer Hemmung der Bildung von Zilien, einer verminderten Lumenausbildung, sowie einer signifikant verstärkten Mukusbildung führt. Unter Behandlung mit Pam3CSK4, Ligand für TLR1/2, konnte ebenfalls eine signifikant gesteigerte Mukusproduktion festgestellt werden, während die Ziliogenese jedoch nicht signifikant beeinflusst wurde. Die Stimulation mit LPS und Poly(I:C) führte zu einer Spender-abhängigen gesteigerten Bildung von Muzinen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass eine fortdauernde Aktivierung des respiratorischen Epithels durch bakterielle Faktoren wie Flagellin über TLRs, maßgeblich zu einer übermäßigen

Mukusbildung und Becherzellhyperplasie bei Patienten und Patientinnen mit chronischen Lungenerkrankungen führt. Ständige Exposition mit mikrobiellen Faktoren begünstigt die Differenzierung von Basalzellen hin zu sekretorischen Zellen, was mit einer Hemmung der Ausbildung an Zilienzellen einhergeht. Dies trägt möglicherweise bei der COPD und CF zu einer eingeschränkten mukoziliären *Clearance* und einem Teufelskreis aus geschwächter Abwehr in der Lunge und Infektionen bei.

Zukünftige Studien könnten hierauf aufbauend das Organoid-System für die Testung potenzieller Wirkstoffe, welche die Zelldifferenzierung und die Mukusbildung adressieren, sowie die Aufklärung hiermit verbundener zellulärer Signalwege nutzen. Derartige Organoid-Modelle bieten darüber hinaus durch die Gewinnbarkeit humaner Zellen im Rahmen von Routineuntersuchungen, beispielsweise bei Lungenspülungen, neue Möglichkeiten im Hinblick auf die personalisierte Medizin.

2.2 Abstract

Respiratory tract infections essentially contribute to the worsening of lung disease like cystic fibrosis (CF) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). CF patients often suffer chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections, while *Haemophilus influenzae* repeatedly induces acute and chronic infections in COPD patients. Moreover, viral infections cause acute aggravation (exacerbations) in patients with COPD.

Lung organoids are self-organizing structures which develop from progenitor cells of the lung epithelium and are cultivated in 3D. Organoids represent various aspects of cellular composition, 3D architecture and function of organs. In the last years, organoids have become an increasingly suitable method for the study of disease, especially as an alternative to animal testing. In the past years, protocols showing the differentiation of bronchospheres from basal cells have been published. These bronchospheres consist of basal cells, ciliated cells, goblet cells and a lumen.

The aim of this doctoral thesis was to establish the cultivation and a methodology for the analysis of bronchospheres. It was examined how certain pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), which function als ligands for Toll-like receptors (TLRs), influence the differentiation of basal cells to bronchospheres. Therefore, bronchospheres were treated with the synthetic lipopeptide Pam3CSK4, the synthetic double stranded RNA Poly(I:C), bacterial lipopolysaccharides (LPS) and flagellin from *P. aeruginosa* within the differentiation phase. In the first part of the thesis protocols for the cultivation and histological analysis of bronchospheres were established. By overview staining, fluorescence and immunohistochemical staining it was possible to distinguish ciliated cells, basal cells and secretory cells in a variety of organoids per culture condition.

It was shown that the treatment of bronchospheres with flagellin, a virulence factor of flagellated bacteria like *P. aeruginosa* and ligand for TLR5, leads to an inhibition of cilia development, a decreased formation of lumina and an increased production of mucus. Under treatment with Pam3CSK4, a ligand for TLR1/2, the mucus production likewise was significantly increased, while the ciliogenesis was not significantly influenced. The stimulation with LPS and Poly(I:C) led to a donator dependent increased expression of mucins.

The results of this thesis indicate that a continuous activation of the respiratory epithelium by bacterial factors such as flagellin via TLRs leads to an excessive mucus production and goblet cell hyperplasia in patients with chronic lung disease. Persistent exposure to microbial factors favors the differentiation of basal cells to secretory cells and suppresses the development of ciliated cells. This possibly contributes to an impaired mucociliary clearance and a vicious circle of weakened defense and infections in patients with COPD and CF.

Based on this, future studies could use the organoid system to test potential drugs that address cell differentiation and mucus formation as well as to elucidate associated cellular signaling pathways. In

addition, these organoid models offer new possibilities in personalized medicine, as human cells can easily be obtained in routine diagnostics such as lung lavage.

3 Einleitung

3.1 Bronchialepithel

Das Lungenepithel lässt sich grob in zwei Abschnitte unterteilen. Einerseits in das Atemwegsepithel und andererseits in das Alveolarepithel [79]. Das Atemwegsepithel erstreckt sich von den oberen Atemwegen bis in die Bronchiolen. Es besteht aus einem mehrreihigen Flimmerepithel, dessen Dicke in Richtung der distalen Atemwege abnimmt. Den großen Teil der Zellen bilden Basalzellen, Zilienzellen mit luminal ausgebildeten Kinozilien, mukusesezernierende Becherzellen und Keulenzellen. Einen weiteren Teil der Zellen nehmen Bürstenzellen und neuroendokrine Zellen ein [10]. Die Basalzellen besitzen Stammzeleigenschaften und sind in der Lage sich zu Zilien-, Becher-, oder Keulenzellen zu differenzieren [20,75]. Hierdurch wird auch die Regenerationsfähigkeit des Epithels bei Schaden oder Zellverlust gewährleistet [10]. Aus neueren Studien geht hervor, dass die Differenzierung von Zilien- und Becherzellen über Keulenzellen erfolgt (Abb. 1) [26,53,59].

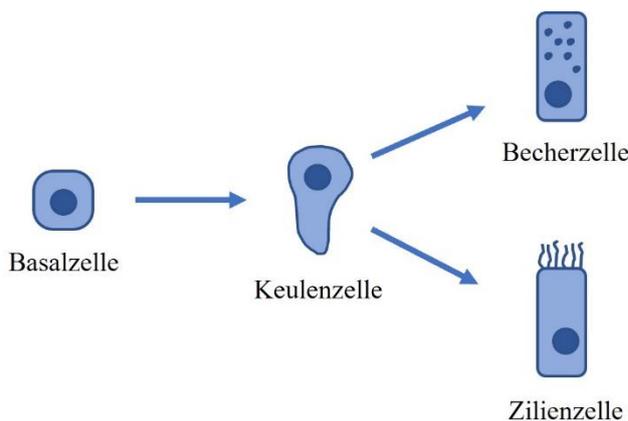


Abbildung 1. Differenzierung von Becherzellen und Zilienzellen über Keulenzellen (nach [53])

Die Differenzierung von Becherzellen und Zilienzellen aus Basalzellen erfolgt über Keulenzellen.

Durch die Atemwege wird die eingeatmete Luft in die Alveolen geleitet. Hierbei kommt das Atemwegsepithel ständig mit Partikeln, Noxen und Keimen in Kontakt. Die Zellen des Atemwegsepithels bilden verschiedene Proteine wie Muzine und antimikrobielle Peptide. Diese werden in den die Atemwege auskleidenden Flüssigkeitsfilm (*airway surface liquid* (ASL)) sezerniert und inhibieren das Wachstum von Bakterien [21,34,38]. Eingeatmete Partikel werden im Mukus abgefangen und durch die mukoziliäre *Clearance* hinaus transportiert. Die auswärts gerichtete Bewegung der Zilien befördert den ASL Richtung Mundhöhle, wo er unter anderem durch Schlucken oder Abhusten entfernt wird. Auf diese

Weise wird verhindert, dass Pathogene die Mukosa der Atemwege kolonisieren bzw. infizieren [21,75]. Die adäquate Hydratation des ASL muss gewährleistet sein. Eine unzureichende Hydratation und ein zäher Flüssigkeitsfilm tragen z.B. maßgeblich zur chronischen bakteriellen Infektion und zur Pathogenese der CF bei [21,53]. Die *apical junctional complexes* (AJCs) gewährleisten, dass weder Partikel und Bakterien noch Ionen unreguliert das Atemwegsepithel passieren können und jenes damit eine dichte Barriere zwischen Umwelt und dem Körperinneren bildet [21,74].

Über *pattern recognition receptors* (PRRs) können Atemwegsepithelzellen zudem aktiviert werden. PRRs wie TLRs sind in der Lage mikrobielle Bestandteile wie PAMPs zu erkennen [4]. Zudem besitzen Atemwegsepithelzellen Rezeptoren, die von Immunzellen gebildete Zytokine, wie Interleukin-1 β (IL-1 β) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) erkennen. Werden Atemwegsepithelzellen über PRRs und Zytokine aktiviert, kann dies zu einer verstärkten Bildung von Muzinen und antimikrobiellen Peptiden sowie weiterer Zytokine und Chemokinen führen [36,58]. Atemwegsepithelzellen sind daher aktiv an der angeborenen Immunantwort beteiligt und tragen zur Rekrutierung von Entzündungszellen in die Atemwege bei. Sowohl die mukoziliäre *Clearance* als auch die Identifikation von Pathogenen durch PRRs stellen einen wichtigen Teil der angeborenen Immunabwehr dar [33,34].

Am distalen Ende der Bronchiolen geht das respiratorische Epithel in das Alveolarepithel über. Die Epithelschicht in den Alveolen, die sich aus alveolaren Typ I- und Typ II-Pneumozyten zusammensetzt, weist nur eine Dicke von weniger als 1 μm auf, was einen effektiven Gasaustausch ermöglicht. Die Pneumozyten Typ II sezernieren Surfactant und andere Proteine, während an der großen Oberfläche der sehr dünnen Typ I Zellen der Gasaustausch zu den umgebenden Kapillaren stattfindet [10].

In der vorliegenden Arbeit wird im Besonderen das proximale Atemwegsepithel aus dem Bereich der Bronchien betrachtet.

3.2 Organoide und Bronchosphären

Organoid-Modelle gewinnen in den letzten Jahren zunehmend an Relevanz in den Feldern der Grundlagenforschung, der personalisierten Medizin und der Therapieentwicklung [67]. Organoide sind Zellkulturen, die einen dreidimensionalen Zellverband bilden. Die Struktur und die Eigenschaften des Ursprungsgewebes der Zellen werden hierbei *in vitro* imitiert [79]. Zu erwartende Charakteristika sind das Vorkommen mehrerer, verschiedener organspezifischer Zelltypen, die Erfüllung organspezifischer Funktionen und eine räumliche Organisation der Zellen, ähnlich den Gegebenheiten *in vivo* [46]. Im Vergleich zu den Gegebenheiten *in vivo* sind Organoide leicht zugängliche und vereinfachte Zellkulturmodelle [67].

Für die Entwicklung und Funktionalität des Gewebes sind mitunter die dreidimensionalen Gegebenheiten entscheidend. Alcaraz et al. zeigten bei der Kultivierung von Brustdrüsenepithel den Einfluss der

Elastizität des umgebenden Gewebes auf die Differenzierung des Epithels [5]. Gjorevski et al. beschreiben darüber hinaus einen relevanten Einfluss der mechanischen Belastung auf die Zellen im dreidimensionalen Wachstum im Hinblick auf die Entwicklung des Gewebes [27]. Sowohl aus pluripotenten Stammzellen, darunter induziert pluripotente Stammzellen und embryonale Stammzellen, als auch aus adulten Stamm- bzw. Vorläuferzellen konnten bereits Organoiden kultiviert werden [79].

Im Bereich der Lunge beziehen sich Organoiden meist auf selbstorganisierende Strukturen, die sich aus Vorläuferzellen des Lungenepithels bilden und dreidimensional mit oder ohne mesenchymale Zellen kultiviert werden. Lungenorganoiden konnten bereits aus verschiedenen Abschnitten der Atemwege gewonnen werden. Organoiden werden nach der Herkunft ihrer Zellen bezeichnet [10]. So ist es beispielsweise möglich aus Alveolarzellen Alveolosphären zu kultivieren [9]. Aus humanen Typ II Lungen-Vorläuferzellen können Organoiden bestehend aus Typ I und Typ II Zellen differenziert werden [85]. Organoiden können beispielsweise auch aus nasalem oder trachealem Epithel kultiviert werden [10,17,63]. In der vorliegenden Arbeit werden speziell sphäroidale Organoiden aus adulten Basalzellen des Bronchialepithels betrachtet, sogenannte Bronchosphären [63].

In geeigneter Gelmatrix, die aus Matrigel gewonnen wird, können Basalzellen des Bronchialepithels innerhalb von 30 Tagen zu 3D-Bronchosphären mit unterscheidbaren Basalzellen, sezernierenden Zellen, darunter Keulenzellen und Becherzellen, sowie Zilienzellen und einem Lumen differenziert werden (Abb. 2) [19,20]. Es kommt hierbei sowohl zur Zusammenlagerung der Zellen als auch zur Zellteilung [10]. Danahay et al. beschrieben eine Möglichkeit der Kultivierung von Bronchosphären. Hierbei befindet sich außen die basale Seite des Epithels und innen die luminalen Seite. Luminal erfolgt die Ausbildung von mukussezernierenden Zellen und Zellen mit schlagenden Zilien, während Basalzellen die basale Zellschicht bilden. Letztendlich imitieren die Bronchosphären den Aufbau des Bronchialepithels *in vivo* [20].

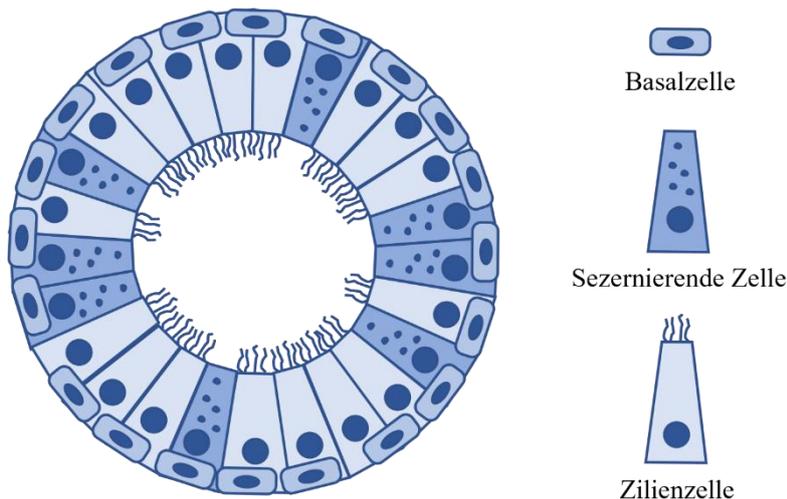


Abbildung 2. Histologischer Aufbau von Bronchosphären (nach [10])

Dargestellt ist der histologische Aufbau einer Bronchosphäre mit Basalzellen, Zilienzellen und sezernierenden Zellen, wie Becherzellen und Keulenzellen, im Querschnitt. Die Zilien sind zum Lumen hin ausgerichtet.

Im Rahmen von chronischen Erkrankungen der Atemwege wie COPD oder CF kommt es zu strukturellen Veränderungen des Epithels [60,64]. Mithilfe der Organoide können einzelne Prozesse der Krankheitsentstehung nachgestellt werden. Zustände wie chronische Infektionen können hier *in vitro* imitiert und deren Einfluss auf das Epithel untersucht werden [10]. Bei Aktivierung von Bronchosphären mit IL-13 kommt es beispielsweise zu einer Becherzellmetaplasie, welche charakteristisch für obstruktive Lungenerkrankungen ist. Danahay et al. zeigten, dass die Differenzierung der Basalzellen zu Becherzellen und damit die Becherzellmetaplasie Notch2-abhängig geschieht [20].

3.3 Chronische Erkrankungen der Atemwege

Chronische Erkrankungen der Atemwege, wie COPD oder CF, gehen mit persistierenden Infektionen und Entzündungen einher [14,82]. Der CF liegt eine Mutation des *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR)-Gens zugrunde [44,61,65]. Die hierdurch beeinträchtigte, nach intraluminally gerichtete Chloridionenübertragung und die damit erhöhte Wasserabsorption führen zu einem zähen Mukus in den Atemwegen [47,76]. In dieser Mukusschicht sammeln sich Bakterien und bilden die Ursache für häufig wiederkehrende Atemwegsinfektionen [76]. Infolgedessen kommt es gehäuft zu Infektionen der Lunge [72]. Das Bakterium *P. aeruginosa* ist ein dominantes Pathogen, das die Atemwege von CF-Patienten und -Patientinnen mit steigendem Alter chronisch infiziert [33,66]. Es wird angenommen, dass *P. aeruginosa* maßgeblich die Entzündung in den Atemwegen bei CF-Betroffenen antreibt [66]. Der COPD liegt eine chronische Exposition mit inhalativen Noxen wie Zigarettenrauch oder ein Alpha-1-Antitrypsinmangel zugrunde [3,75]. Bei der COPD sind Infektionen mit *H. influenzae*

vorherrschend. *H. influenzae* infiziert häufig die Lungen von COPD-Patienten und Patientinnen chronisch und verursacht, wie auch virale Infekte, akute Exazerbationen [72]. Beide Erkrankungen gehen mit einer gesteigerten Obstruktion der Atemwege und einer chronischen neutrophilen Entzündung einher [21].

Die angeborene Immunabwehr stellt einen wichtigen Prozess in der Infektionsbekämpfung dar. Eine prolongierte Aktivierung der Abwehrmechanismen kann allerdings zu einem Progress der Erkrankung führen [33,72]. Der hyperinflammatorische Zustand ist bei CF und COPD maßgeblich an der Destruktion des Lungengewebes und dem Verlust an Lungenfunktion beteiligt und wirkt sich stark negativ auf die Lebensdauer der Betroffenen aus [14]. Anders als im gesunden Epithel ist hier das Verhältnis zwischen Becherzellen und Zilienzellen deutlich in Richtung der Becherzellen verschoben [10]. Eine Hyperplasie von Becher- und Basalzellen bildet sich aus, welche in einer Mukushyperproduktion und einer gestörten mukoziliären *Clearance* mündet [21,75].

3.4 Toll-like Rezeptoren und deren Liganden

Atemwegsepithelzellen bilden zahlreiche PRRs wie TLRs, darunter TLR1-5, wie bereits in zahlreichen Arbeiten beschrieben wurde [4,7,21,30,34]. Darüber hinaus bilden Atemwegsepithelzellen auch intrazelluläre PRRs wie *retinoic acid-inducible gene 1* (RIG1) und *melanoma differentiation associated gene 5* (MDA5), die unter anderem virale RNA im Zytosol erkennen [34]. In der vorliegenden Arbeit werden TLR1-5 und deren Liganden betrachtet. TLRs sind sowohl oberflächlich als auch endosomal exprimiert [23]. TLR1, 2, 4 und 5 finden sich überwiegend an der Plasmamembran, während TLR3 vor allem intrazellulär exprimiert wird [43,57]. TLRs spielen eine zentrale Rolle bei der Erkennung mikrobieller Infektion bzw. Besiedlung und bei der entsprechenden Einleitung von Abwehrmaßnahmen [11]. Die Aktivierung führt zur Expression verschiedener Gene, darunter derer von Zytokinen, Chemokinen und antimikrobiellen Peptiden [7]. Werden die plasmamembranständigen TLR2 (bilden einen Komplex mit TLR1), TLR4 und TLR5 über ihre entsprechenden Liganden aktiviert, kommt es über eine von *myeloid differentiation factor 88* (MyD88) abhängige Signalkaskade, die auch weitere Faktoren wie *IL-1R-associated protein kinase 1* (IRAK1) und *TNF receptor-associated factor 6* (TRAF6) beinhaltet, unter anderem zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B und *mitogen activated protein kinases* (MAPKs) [4]. Dies führt zu einer verstärkten Expression von Zytokinen wie IL-8 und IL-6, Muzinen und antimikrobiellen Peptiden [11,14]. Die Aktivierung von TLR3 führt über eine von *Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adaptor protein inducing interferon- β* (TRIF) sowie *interferon regulatory factor 3* (IRF3) abhängige Signalkaskade zur Expression von Typ-I-Interferonen, darunter Interferon β (IFN β) und IFN β -regulierte Gene wie *IFN-inducible protein 10* (IP-10) [12,71]. Auch für TLR4 wurde für Entzündungszellen beschrieben, dass dieser nach Aktivierung in das Endosom gelangt und hier die TRIF-abhängige Signalkaskade aktiviert [77]. TLRs werden von Atemwegsepithelzellen konstitutiv

exprimiert. Darüber hinaus kann ihre Expression aber auch durch inflammatorische Zytokine und PAMPs induziert bzw. gesteigert werden [49].

Die einzelnen TLRs können *in vitro* durch folgende PAMPs aktiviert werden: TLR2 im Komplex mit TLR1 durch bakterielle Lipoproteine, wie das synthetische Pam3CSK4, TLR3 durch virale RNA und das synthetische Poly(I:C), TLR4 durch LPS und TLR5 durch Flagellin [7,33,71,86].

Verschiedene Studien zeigten, dass Atemwegsepithelzellen doppelsträngige virale RNA über TLR3 erkennen und verschiedene grampositive und gramnegative Bakterien über TLR2 und TLR4 detektieren [31]. Da *P. aeruginosa* bei der CF eine bedeutende Rolle spielt, untersuchten zahlreiche Studien über welche PRRs *P. aeruginosa* Atemwegsepithelzellen aktiviert [2,29,52]. *P. aeruginosa* verfügt über Liganden, die potenziell an mehrere TLR binden können, darunter 1, 2, 4, 5, 6 und 9 [14]. Flagellin ist ein primärer Bestandteil bakterieller Flagellen und wird vorrangig über TLR5 detektiert [14,35]. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass TLR5 bei der Erkennung Flagellin-exprimierender *P. aeruginosa* auch bei Atemwegsepithelzellen eine zentrale Stellung einnimmt [14,35]. Zudem besteht die Möglichkeit, dass Flagellin über das Typ-III-Sekretionssystem in das Zytoplasma gelangt und hier über *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors family caspase-associated recruitment domain-containing protein 4* (NLRC4), das Inflammasom und Caspase 1 die Entzündung vermittelt [50,51]. Es ist unklar, inwiefern dies in Atemwegsepithelzellen von Bedeutung ist. Neben TLR5 konnte auch für TLR2 und TLR4 eine Rolle bei der Erkennung von *P. aeruginosa* nachgewiesen werden [2,50].

3.5 Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss pathogener bakterieller und viraler Stimulation auf die Zellzusammensetzung des Epithels in humanen 3D-Bronchosphären zu untersuchen. Hierzu sollte ein Modell zur Kultivierung von Bronchosphären aus Basalzellen des humanen Bronchialepithels etabliert werden. Während der Kultivierung sollte eine Behandlung der Bronchosphären mit verschiedenen PAMPs, welche als TLR-Liganden dienen, erfolgen. Weiterhin galt es, eine Methode zur Einbettung der Bronchosphären für die Anfertigung histologischer Schnitte zu entwickeln. Hiermit sollte die Zellzusammensetzung der behandelten Bronchosphären im Vergleich zu einer Kontrollgruppe untersucht werden.

4 Material und Methoden

4.1 Geräte

Tabelle 1. Übersicht der verwendeten Geräte

Gerät	Produktname	Hersteller
Brutschrank	Hera cell	Heraeus
Gewebeinfiltrationsautomat	TP 1020	Leica
Kamera	DS126311	Canon
Mikroskop	Axiovert 25 C	CarlZeiss
Mikroskop	BX51TRF	Olympus
Schlittenmikrotom	SM2000 R	Leica
Schüttelinkubator	Environmental Shaker-Incubator ES-20	Biosan
Sicherheitswerkbank	HERAsafe KS 18	Thermo Fisher Scientific
Waage	EW4200-2NM	Kern
Wasserbad	GFL 1003 Wasserbad	GFL
Zentrifuge	Heraeus Labofuge 400	Function Line
Zentrifuge	Megafuge 1.0R	Kendro Laboratory Products

4.2 Software

Tabelle 2. Übersicht der verwendeten Software

Anwendung	Programm	Hersteller
Bildaufnahme	cellSens Dimension	Olympus
Bildverarbeitung	Fiji (ImageJ)	GNU General Public License
Statistik	Prism 8	GraphPad Software, Inc.
Tabellenkalkulation	Excel 2019	Microsoft Corporation

4.3 Kulturmedien und Lösungen

Tabelle 3. Übersicht der verwendeten Kulturmedien und Lösungen

Medium/Lösung	Zusammensetzung/Hersteller
Wachstumsmedium	Bronchial Epithelial Cell Growth Medium (BEGM) and SingleQuots (BulletKit), Lonza
Differenzierungsmedium	250 ml BEGM and SingleQuots (BulletKit) (ohne Zugabe von Retinsäure und Triiodthyronin), Lonza + 250ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Liquid (High Glucose), Life Technologies
10x PBS	KCL (2,7 mM), KH ₂ PO ₄ (1,5 mM), Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O (5 mM), NaCl (137 mM), pH 7,2 – 7,4
EDTA-Puffer	1 mM EDTA in 1 l destilliertem Wasser, pH = 8,0
10x TBS	24,2 g Tris base, 80 g NaCL in 1 l destilliertem Wasser, pH = 7,4
TBS-T	10x TBS 1:10 in Zielvolumen verdünnt, Zugabe von 0,1% Tween-20

Weitere verwendete Geräte, Materialien und Lösungen werden in den folgenden Unterkapiteln aufgeführt.

4.4 Gewinnung, Isolation und Kultivierung primärer Atemwegsepithelzellen

Aus Lungenresektaten von Operationen der Klinik für Thorax- und Herz-Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes konnten primäre Atemwegsepithelzellen gewonnen werden. Genutzt wurde tumorfreies Lungengewebe. Gemäß internem Protokoll wurden primäre Atemwegsepithelzellen isoliert [8]. Die Zustimmung der Ethik-Kommission der Ärztekammer des Saarlandes hierfür lag vor. Alle Teilnehmenden gaben eine schriftliche Einverständniserklärung ab. Die Kultivierung der primären Atemwegsepithelzellen erfolgte in entsprechendem Wachstumsmedium (siehe Tabelle 3) in 75 cm² Zellkulturflaschen (Greiner) im Brutschrank (37°C 5% CO₂, 100% Luftfeuchtigkeit). Der Umgang mit den Zellen und den entsprechenden Medien und Lösungen fand unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank (siehe Tabelle 1) statt.

4.5 Kultivierung von Bronchosphären

Primäre Atemwegsepithelzellen wurden in Matrigel kultiviert mit dem Ziel der Ausbildung differenzierter Bronchosphären. Die Methode basiert auf dem Protokoll der Kultivierung von Bronchosphären der University of Sussex, wie angewandt von Danahay et al. (2015) [20]. Das entsprechende Protokoll wurde durch Dr. Henry Danahay zur Verfügung gestellt und für die vorliegende Arbeit adaptiert.

96-well-Platten (Sterile, U-bottom, Cellstar) wurden mit 40 µl 25% Matrigel (Corning Matrigel Basement Membrane Matrix, Growth Factor Reduced, Corning) in Differenzierungsmedium (siehe Tabelle 3) mit 50 nM/l Retinsäure (all trans Retinoic acid, Sigma) je Well vorbeschichtet. Die Platten wurden zur gleichmäßigen Verteilung des Matrigels und Entfernung von beim Pipettieren entstandenen Luftblasen für 3 Minuten zentrifugiert (2000 rpm, 4°C) und anschließend für 2 Stunden in den Brutschrank (37°C 5% CO₂, 100% Luftfeuchtigkeit) gestellt.

Die primären Atemwegsepithelzellen wurden in Zellkulturflaschen (siehe 4.4) bis zu einer Konfluenz von ca. 80% kultiviert. Das Wachstumsmedium wurde abgesaugt und der Zellrasen mit 25 ml 1x PBS (Dulbecco's PBS 1x, ohne Kalzium und Magnesium, PAA) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen von der Kulturfläche mittels 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung (0,05% Trypsin / 0,02% EDTA, Invitrogen) gelöst. Nach Inkubation bei 37°C für 5 Minuten wurden 10 ml TNS (Trypsin Neutralizing Solution, Lonza) zugegeben, die Zellen resuspendiert und in ein 50 ml Röhrchen (GBO) übertragen. Es folgte eine Zentrifugation bei 600 x g für 5 Minuten. Der Flüssigkeitsüberstand wurde abgesaugt und die Zellen wurden anschließend in 5 ml Differenzierungsmedium (siehe Tabelle 3) resuspendiert. Eine Verdünnung der Suspension bis zur gewünschten Konzentration von 3×10^4 Zellen/ml wurde durch Zugabe von weiterem Differenzierungsmedium hergestellt. Der Zellsuspension wurde Matrigel zu einer finalen Konzentration von 5% hinzugefügt. Weiterhin wurden 50 nM/l Retinsäure zugegeben. Anschließend wurden je 80 µl der Zellsuspension in die vorbeschichteten Wells pipettiert.

An Tag 2 nach Aussaat der Zellen in die Wells, wurden je Well 120 µl frisches Differenzierungsmedium mit 5% Matrigel und 50 nM/l Retinsäure hinzugegeben. Infolgedessen wurde alle vier Tage ein Mediumwechsel durchgeführt. Hierfür wurden jeweils vorsichtig 120 µl Volumen je Well abgenommen. Daraufhin wurde jeweils 120 µl frisches Differenzierungsmedium mit 5% Matrigel und 50 nM/l Retinsäure hinzugegeben. Die Kultivierung endete an Tag 30.

4.6 Behandlung mit PAMPs

Je Versuch wurden fünf Gruppen gebildet. Eine Gruppe bestand aus 8 Einzel-Wells einer 96-Well-Platte und wurde, mit Ausnahme der unbehandelten Kontrollgruppe, mit je einem TLR-agonisierenden PAMP, bzw. einem TLR-Liganden, behandelt. Beginnend an Tag 2 wurden bei jedem Mediumwechsel alle vier Tage die entsprechenden PAMPs (siehe Tabelle 4) dem frischen Medium hinzugefügt. Die

Konzentration betrug hierbei jeweils 100 ng/ml. Zur Verdünnung der PAMPs wurde jeweils Differenzierungsmedium (siehe Tabelle 3) verwendet, sodass bei der Kontrollgruppe auf eine Zugabe von PBS verzichtet wurde.

Tabelle 4. Übersicht der verwendeten PAMPs

PAMPs	Ziel-TLR	Hersteller	Artikelnummer
Pam3CSK4	TLR1, TLR2	InvivoGen	t1rl-pms
Poly(I:C)	TLR3	InvivoGen	t1rl-pic
LPS	TLR4	InvivoGen	t1rl-pb5lps
Flagellin	TLR5	InvivoGen	t1rl-pafla

4.7 Phasenkontrastmikroskopie

Verwendet wurde das Mikroskop Axiovert 25 des Herstellers Carl Zeiss Microscopy GmbH. Die 96-Well-Platten wurden während der Kultivierung der Bronchosphären mikroskopiert. In 20-facher Vergrößerung wurden an den Tagen 14, 22 und 30 der Kultivierung jeweils alle im sichtbaren Bereich befindlichen Bronchosphären gezählt und zusätzlich diejenigen darunter, welche sichtbar schlagende Zilien zeigten. Bilder der Mikroskopie wurden mittels der Kamera Canon DS126311 (Objektiv: EFS 18-55mm, Image Stabilizer Macro 0.25m/0,8ft) angefertigt. Die Auswertung der Bilder erfolgte mittels Fiji (ImageJ). Anhand der aufgenommenen Bilder in 5-facher Vergrößerung wurden die Durchmesser der einzelnen Bronchosphären gemessen. Außerdem erfolgte anhand derselben Bilder die Auszählung der sichtbaren Bronchosphären und derjenigen darunter, welche ein sichtbares Lumen aufwiesen.

4.8 Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt [69]. Ultradünnschnitte wurden angefertigt und mit Uranylacetat angefärbt. Zur Mikroskopie wurde ein FEI Tecnai T12 Transmissions-elektronenmikroskop bei 100 kV mit einer digitalen 8-bit-Kamera verwendet. Die Durchführung erfolgte am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität des Saarlandes mit freundlicher Unterstützung von Prof. Dr. med. Thomas Tschernig.

4.9 Paraffineinbettung von Bronchosphären

4.9.1 Erarbeitung der Einbettungsmethode für die Erstellung histologischer Schnitte

Für die Einbettung von Bronchosphären mit dem Ziel der Erstellung histologischer Schnitte lag zum Zeitpunkt der Arbeit kein Protokoll in der Arbeitsgruppe vor. Die folgenden Versuche wurden daher zur Etablierung eines Protokolls hierfür unternommen. Das Ziel war es, die Bronchosphären auf ein möglichst geringes Volumen zu konzentrieren, um beim Schneiden der Paraffinblöcke zuverlässig eine maximale Zahl an Bronchosphären pro Schnitt zu treffen. Besonders mit mehrmaligem Transfer und diversen Waschschritten wurde von einem Verlust an Bronchosphären ausgegangen. Beides musste daher auf ein Minimum begrenzt werden. Zur Entfernung des Matrigels wurde Corning Cell Recovery Solution (Corning) verwendet [55]. Bei Einbettung in klassischen histologischen Ausgießformen ergaben sich verschiedene Probleme. Die Bronchosphären sammelten sich am Boden der Form, sodass beim Schneiden des Blocks ein Schnitt alle Bronchosphären hätte treffen müssen, was sich als unpraktikabel erwies (Abb. 3A). Alternativ konnte für eine Verteilung der Bronchosphären innerhalb der Ausgießform gesorgt werden. Das Volumen der Formen war allerdings zu groß, sodass die Chance bei Schnitten eine ausreichende Zahl an Bronchosphären zu treffen zu gering war (Abb. 3B). Das Volumen innerhalb der Formen wurde daher in verschiedenen Versuchen reduziert (Abb. 4).

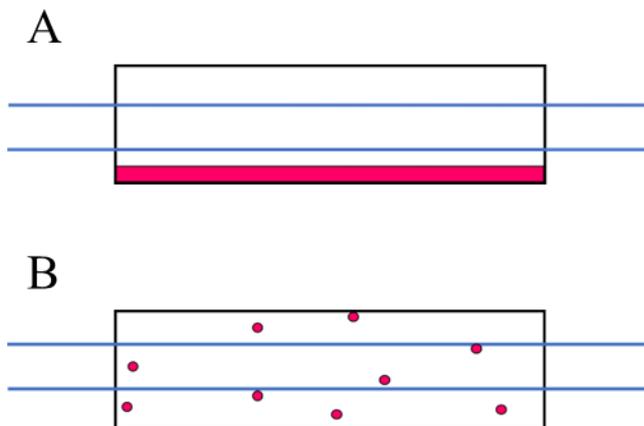


Abbildung 3. Verteilungsmuster der Bronchosphären innerhalb von histologischen Ausgießformen

Schematisch dargestellte Ausgießform aus der Seitenansicht. (A) Rote Fläche, (B) rote Kreise: Bronchosphären; Blaue Linien: Schnittebenen. Mit dieser Herangehensweise war keine Erstellung verwertbarer Paraffinschnitte möglich.

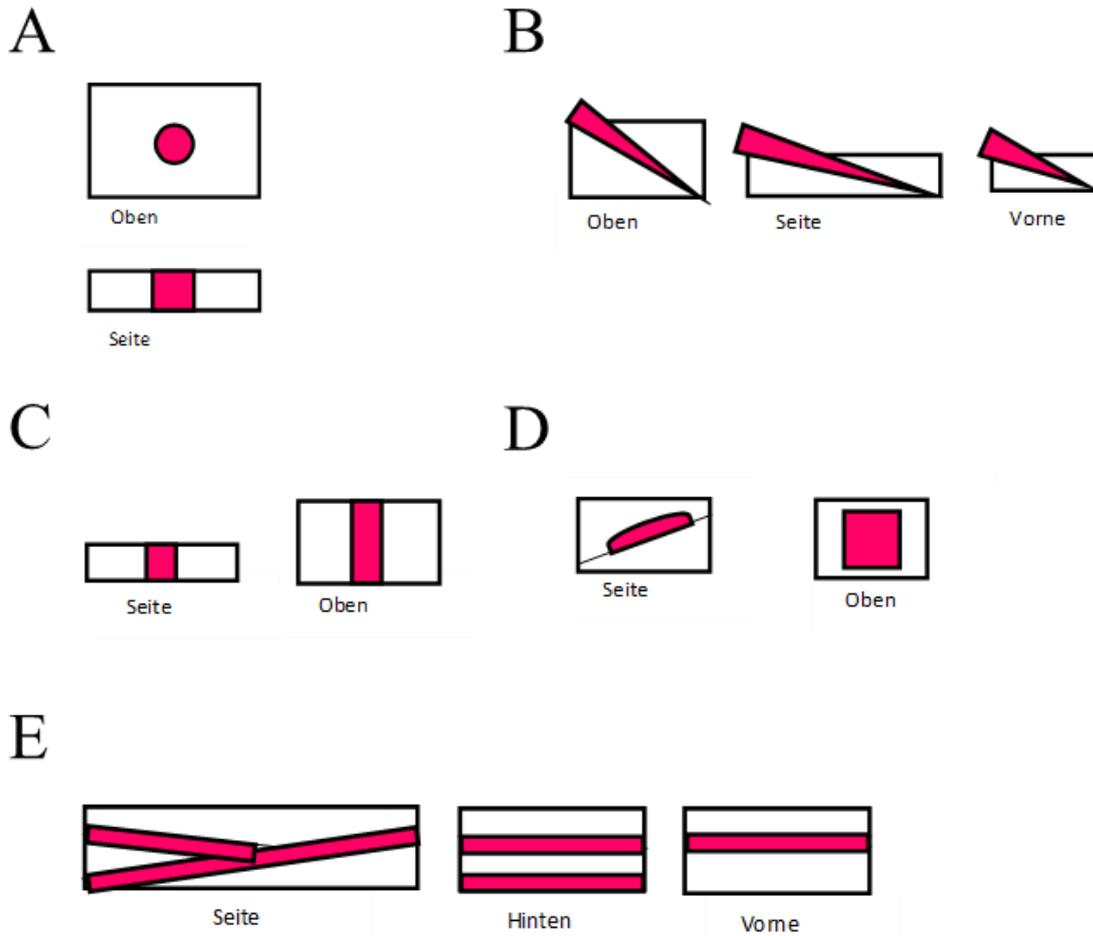


Abbildung 4. Einbettungsversuche zur Verminderung des Verteilungsvolumens der Bronchosphären

Histologische Ausgießformen mit jeweiligem Blickwinkel. Rot: Verteilungsbereich der Bronchosphären. Unterschiedliche Verteilungsmuster durch Umgießen verschiedener Formen mit Agarose. (A, B) Umgießen von Pipettenspitzen. (C, D, E) Geschichtetes Eingießen in die histologische Ausgießform. Hieraus ließen sich keine verwertbaren Paraffinschnitte erstellen.

Die verschiedenen Ausgüsse wurden mit Agarose (3%, Type VII-A: Low Gelling Temperature, Sigma), mit dem Ziel der Erstellung von Paraffinschnitten, angefertigt. Die bisher gezeigten Ansätze ermöglichten es nicht, Paraffinschnitte mit einer ausreichend hohen Anzahl an Bronchosphären zu erstellen. Letztendlich stellte sich als zuverlässigste Methode die Agaroseeinbettung der Bronchosphären in der Kunststoffverpackung von sterilen Spritzenfiltern (Sterile Syringe Filter, VWR, Europe) heraus (siehe auch Abschnitt 3.8.2 und Abb. 5). Es gelang hiermit eine hohe Zahl an Bronchosphären in einer Schicht von 1-2 mm auf eine kreisförmige Fläche mit maximalem Durchmesser von ca. 50 mm zu konzentrieren. Die Menge an Bronchosphären wurde darüber hinaus durch das Poolen mehrerer kultivierter Wells erhöht.

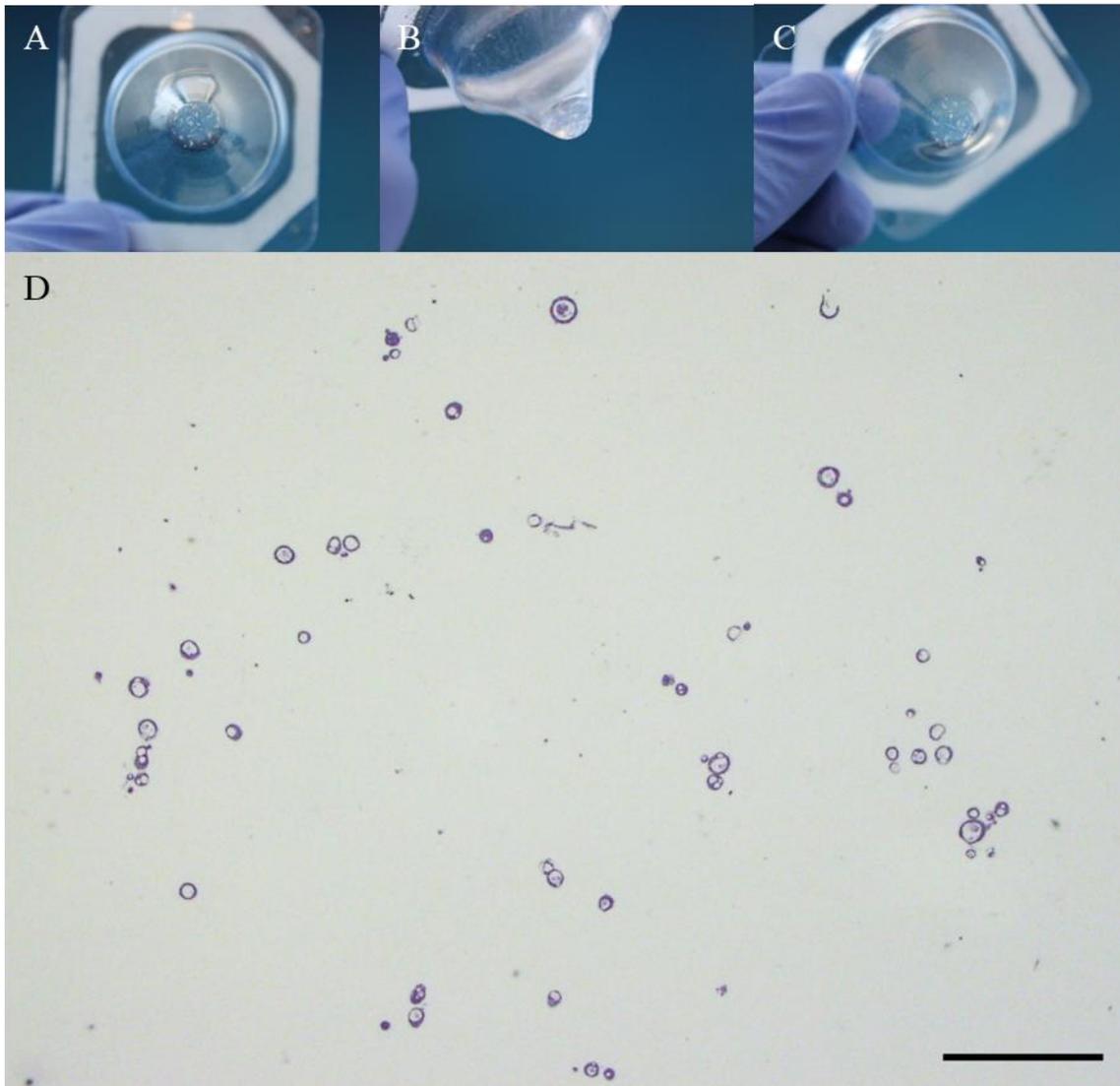


Abbildung 5. Einbettung der Bronchosphären

(A-C) Bronchosphären in Agarose innerhalb einer Filterverpackung. (D) Paraffinschnitt (HE-Färbung) der mit dieser Methode eingebetteten Bronchosphären (Maßstab: 500 µm).

4.9.2 Methode der Agaroseinbettung für die anschließende Paraffineinbettung

Das Zellkulturmedium in den Wells wurde abgesaugt. Anschließend wurde der gesamte Wellinhalt mittels einer Mikropipette vorsichtig in eine Filterpackung (Sterile Syringe Filter, VWR, Europe) übertragen. Zur Sicherstellung einer möglichst hohen Dichte an Bronchosphären wurden jeweils 6-8 Wells gepoolt. Um das Matrigel aufzulösen, wurde 1 ml Corning Cell Recovery Solution (Corning) hinzugegeben und die Filterpackung für eine Stunde bei 4°C auf Eis stehen gelassen. Anschließend wurde die Flüssigkeit mit einer Mikropipette abgesaugt. Zur Fixierung der Bronchosphären wurde 1 ml mit 1x PBS gepufferter 4%iger Paraformaldehydlösung zugegeben. Nach 30 Minuten wurde die Paraformaldehydlösung abgesaugt. Die Bronchosphären wurden hiernach einmalig mit 1x PBS gewaschen. Bei

Zugabe der entsprechenden Flüssigkeiten galt es darauf zu achten, die Bronchosphären nicht aufzuwirbeln und sie bei Absaugen der Flüssigkeiten nicht mit aufzusaugen. Im nächsten Schritt wurde flüssige Agarose (3%, 60°C, Type VII-A: Low Gelling Temperature, Sigma) zugegeben. Ein Tropfen mit einer 1 ml Mikropipette genügte hierbei. Unmittelbar danach wurde die Agarose in der Filterpackung vorsichtig umgerührt, um die Bronchosphären möglichst gleichmäßig zu verteilen. Die Filterpackung wurde für eine Minute in einen Schüttelinkubator mit mäßiger Geschwindigkeit bei 37°C gestellt, um ein erneutes Absinken der Bronchosphären zu verhindern. Im Anschluss wurde die Filterpackung für 30 Minuten bei 4°C abgekühlt. Die nun hiernach feste Agarose mit den verteilten Bronchosphären (Abb. 5A-C) wurde vorsichtig aus der Filterpackung herausgehoben. Der Agaroseausguss wurde bis zur anschließenden Paraffineinbettung in einer Einbettkassette (Rotilabo, Roth) in PBS-gepufferter 4%iger Paraformaldehydlösung aufbewahrt. Der Erfolg der Methode ließ sich in den im Verlauf angefertigten Paraffinschnitten bestätigen (Abb. 5D).

4.9.3 Paraffineinbettung und Erstellung histologischer Schnitte

Die Einbettung in Paraffin fand in einem Gewebeeinfiltrationsautomaten (TP 1020, Leica) im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes statt. Die Paraffinblöcke wurden an einem Schlittenmikrotom (SM2000R, Leica) in 2 µm dicke Scheiben geschnitten und die Schnitte nach dem Glätten in Wasser bei 40°C auf Objektträger (Superfrost plus, Menzel GmbH) aufgezogen.

4.10 Immunfluoreszenzfärbung

Ziel der Immunfluoreszenzfärbung war der Nachweis von Mukus in den Bronchosphären. Hierzu wurden Basalzellen mittels eines Antikörpers gegen Keratin 5 (KRT5) und Mukus sowie mukussezernierende Zellen mittels eines Antikörpers gegen Mucin 5B (MUC5B) gefärbt. Die Sichtbarmachung von Zellkernen erfolgte mittels DAPI. Die Schnitte wurden mittels Xylols (5 mal 10 Minuten in 100% Xylol) entparaffiniert. Anschließend wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe rehydratisiert (4 mal 5 Minuten in 100% Ethanol, 1 mal 5 Minuten in 70% Ethanol, Waschen in destilliertem Wasser, 2 Stunden in TBS-T, Waschen in PBS). Zur Antigenrückgewinnung wurden die Schnitte in 1 mM EDTA-Puffer in der Mikrowelle für 45 Minuten leicht siedend aufgeköcht. Die warmen Schnitte wurden langsam durch Zugabe von demineralisiertem Wasser abgekühlt. Weiterhin wurde zweimal für je 5 Minuten in PBS gewaschen. Anschließend erfolgte das Blocken von unspezifischen Bindungsstellen. Hierzu wurden die Schnitte für 30 Minuten in PBS + BSA (0,2%, Sigma-Aldrich) gestellt.

Die primären Antikörper wurden in PBS + BSA (0,2%) gegeben. Der Anti-MUC5B-Antikörper (Mucin 5B, A-3, host species mouse, santa cruz) wurde hierbei in einer Konzentration von 2 µg/ml und der Anti-KRT5-Antikörper (Anti Cytokeratin 5 Antibody, EPR 1600Y, host species rabbit, abcam) in einer

Konzentration von 0,65 µg/ml verwendet. Es wurden jeweils 50 µl Antikörperlösung auf einem Deckglas (100pcs Cover Glass 22x40 mm, VWR international) verteilt. Die Objektträger wurden mit der Zellseite auf die Deckgläser geführt, sodass sich ein Flüssigkeitsfilm dazwischen bildete. Anschließend wurden die Objektträger mitsamt Deckgläsern wieder angehoben. Die Slides wurden bei 4°C über Nacht mit der Antikörperlösung inkubiert. Hiernach wurden die Slides dreimal mit TBS-T gewaschen.

Die sekundären Antikörper wurden ebenfalls in PBS + BSA (0,2%) verdünnt (Anti mouse IgG whole molecule FITC, Sigma, Konzentration: 31,25 µg/ml; Goat Anti Rabbit IgG (H+L) Cyanine 5, ThermoFisher Scientific, Konzentration: 4 µg/ml). Es wurden jeweils 50 µl der Antikörperlösung je Slide verwendet. Die Slides wurden 30 Minuten bei Dunkelheit mit den sekundären Antikörpern inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit TBS-T und einmal mit destilliertem Wasser gewaschen.

Schließlich wurde ein DAPI mounting medium (Fluoroshield mounting medium with DAPI, abcam) auf die Slides gegeben und die Slides mittels eines Deckglases (100pcs Cover Glass 22x40mm, VWR international) und eines Eindeckmediums (Eukitt Quick-hardening mounting medium, sigma-aldrich) eingedeckt.

4.11 Immunhistochemie

Die Paraffinschnitte wurden entparaffiniert, die Antigene rückgewonnen und unspezifische Bindungsstellen geblockt, wie in Abschnitt 3.9 beschrieben. Anschließend wurden die Schnitte mit dem primären Antikörper gegen Mucin 5AC (MUC5AC, host species mouse, abcam) in einer Konzentration von 2,5 µg/ml über Nacht bei 4°C inkubiert. Nachfolgend wurden die Schnitte dreifach je 5 Minuten mit 1x PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundäntikörper (Nichirei-Histofine® MOUSESTAIN KIT, anti-mouse, Nichirei Biosciences Inc.) erfolgte gemäß Herstellerangaben mit einem Tropfen pro Objektträger für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die Schnitte wurden dreifach je 5 Minuten mit 1x PBS gewaschen und mit Aminoethylcarbazol entwickelt. Mit dem Auftreten positiver Reaktionen wurde die Reaktion mittels neutralem 1x PBS-Puffer gestoppt. Anschließend erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin (Sigma-Aldrich) für eine Minute. Die überschüssige Färbelösung wurde ausgewaschen und die Objektträger kurz in Ammoniakwasser getaucht, um die Hintergrundfärbung der Schnitte zu bläuen. Die Schnitte wurden mittels eines Eindeckmediums (Aquatex, Merck KGaA) eingedeckt.

4.12 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Es erfolgte eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung entparaffinierter Präparate (Entparaffinierung siehe Abschnitt 4.9) nach Standardprotokoll. Als Lösungen verwendet wurden hierzu Hämalaun nach Mayer

(Dako REAL Hematoxylin), Eosin wässrig 0,5% (Carl Roth GmbH) und Roti-Histokitt Eindeckmedium (Carl Roth GmbH).

4.13 Hellfeld- und Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Mikroskopie der Paraffinschnitte erfolgte mittels des Mikroskops Olympus BX51TRF. Bildaufnahmen wurden mittels des Programms Olympus cellSens Dimension angefertigt. In HE-Übersichtsfärbungen wurde die Ausbildung von Lumina und zum Lumen gerichteten Zilien in den Bronchosphären dokumentiert. Der gesamte Anteil an Bronchosphären auf einem Paraffinschnitt wurde je Gruppe und unabhängigem Versuch gezählt sowie der Anteil derer mit einem sichtbaren Lumen und derer mit sichtbaren Zilien. Zur Bildauswertung wurde das Programm Fiji (ImageJ) genutzt. In der Immunfluoreszenzfärbung wurde hier die Intensität des MUC5B-Signals pro Fläche (Integrated Density) der einzelnen Bronchosphären für die jeweiligen Gruppen der unabhängigen Versuche berechnet. Ebenso wurde auf diesem Wege die Intensität des MUC5AC-Signals in der Immunhistochemischen Färbung ermittelt.

4.14 Statistische Auswertung

Die Statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels der Software Prism (GraphPad Software, Inc.). Die Datenpunkte jedes unabhängigen Experiments wurden aus mehreren technischen Replikaten erstellt. Bei den Werten der unterschiedlichen Versuchsgruppen wurde jeweils ein t-Test zur Kontrollgruppe durchgeführt. Eine statistische Signifikanz wurde für Ergebnisse mit p-Werten $< 0,05$ angenommen.

5 Ergebnisse

5.1 Die Kultivierung von primären Atemwegsepithelzellen in Matrigel führt zu einer Bildung von Bronchosphären

Es wurde die Kultivierung von Bronchosphären nach einem Protokoll von Danahay et al. adaptiert und etabliert [20]. Die Kultivierung primärer Basalzellen in Matrigel für 30 Tage führt zu einer Bildung differenzierter dreidimensionaler Bronchosphären. In der Phasenkontrastmikroskopie ist innerhalb der Bronchosphären ein Lumen zu erkennen (Abb. 6A). Luminal sind deutlich schlagende Zilien sichtbar. In der HE-Färbung von Paraffinschnitten sind morphologisch klar Zilien abgrenzbar (Abb. 6B). Mittels Immunfluoreszenzfärbung lässt sich deutlich Mukus innerhalb der Bronchosphären anfärben (Abb. 6C). Zilien sind darüber hinaus in der Elektronenmikroskopie klar sichtbar (Abb. 6D).

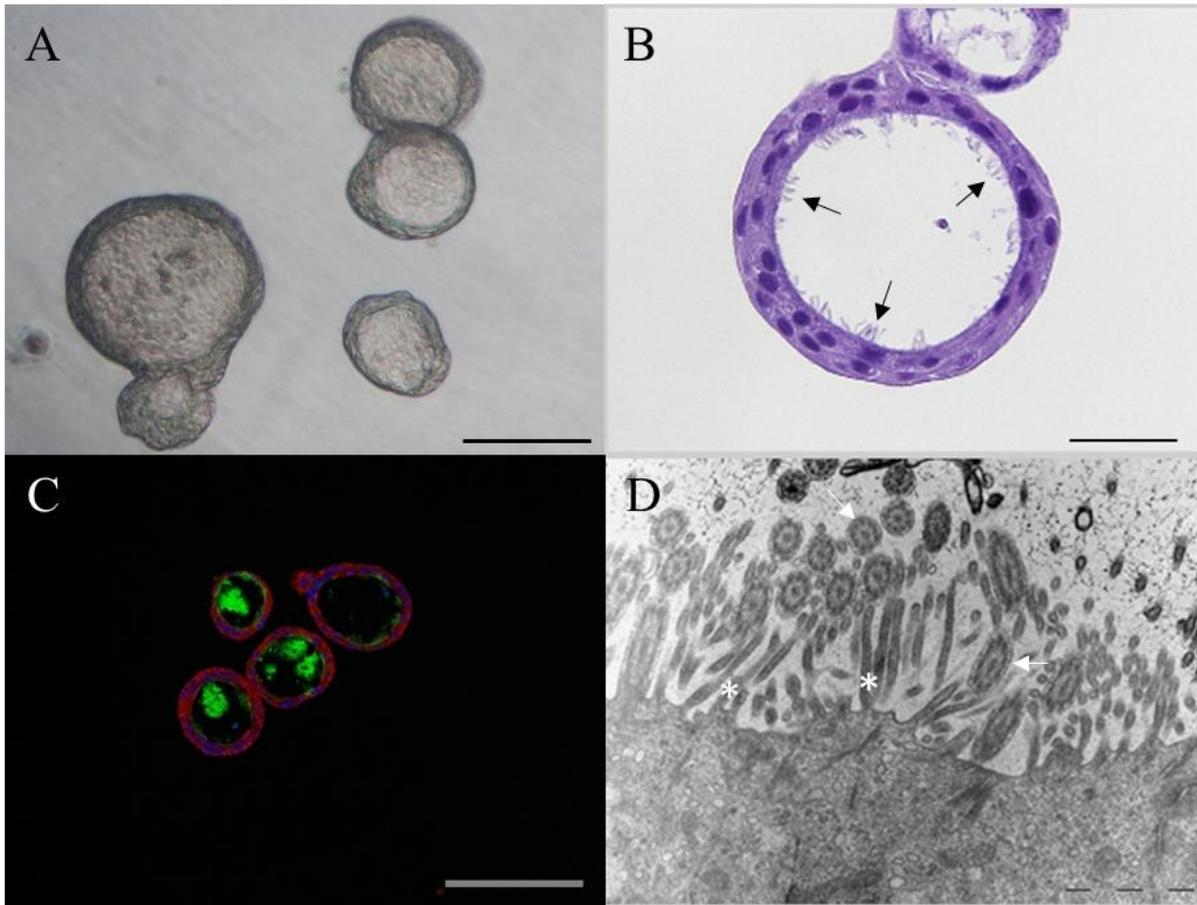


Abbildung 6. Mikroskopie von Bronchosphären. (A) Phasenkontrastmikroskopie während der Kultivierung an Tag 30 (Maßstab: 200µm). Die Bronchosphären wurden anschließend an Tag 30 eingebettet, (B) HE-Übersichtsfärbungen angefertigt (Maßstab: 20µm; die Pfeile zeigen Zilien) und eine (C) Immunfluoreszenzfärbung für KRT5 (roter Kanal) und MUC5B (grüner Kanal) durchgeführt (Maßstab: 100µm). (D) Elektronenmikroskopie der luminalen Seite einer Bronchosphäre, eingebettet an Tag 30 der Kultivierung (23.000-fache Vergrößerung). Sichtbar sind Mikrovilli (*) und Kinozilien (Pfeile). Die Aufnahme wurde am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität des Saarlandes mit freundlicher Unterstützung von Prof. Dr. med. Thomas Tschernig erstellt.

5.2 Die Behandlung mit PAMPs führt zu einer veränderten Differenzierung von Bronchosphären

Zur Klärung inwiefern bestimmte PAMPs, welche als TLR-Liganden fungieren, die Differenzierung von primären Basalzellen in Bronchosphären beeinflussen, wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Die Bronchosphären wurden, abgesehen von einer Kontrollgruppe, bis Tag 30 mit Pam3CSK4, Poly(I:C), LPS und Flagellin in einer Konzentration von jeweils 100 ng/ml behandelt. Die Behandlung begann ab Tag 3 nach dem Ausbringen der Zellen. Mittels Phasenkontrastmikroskopie, HE-Färbung histologischer Schnitte und Immunfluoreszenzfärbung sowie Immunhistochemie histologischer Schnitte wurden verschiedene Parameter wie Ziliogenese und Mukusbildung ausgewertet.

5.2.1 Flagellin vermindert die Ausbildung von Bronchosphären mit sichtbaren Zilien

An den Tagen 14, 22 und 30 der Kultivierung wurden die Bronchosphären mittels Phasenkontrastmikroskopie betrachtet und der prozentuale Anteil an Bronchosphären mit sichtbaren Zilien ermittelt (Abb. 7A-D). In der Behandlungsgruppe mit Flagellin zeigte sich in allen Versuchen an den Tagen 22 und 30 eine signifikante Verminderung im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. In Versuch 1 zeigte sich an Tag 30 darüber hinaus eine signifikant verminderte Zilienausbildung bei Behandlung mit Poly(I:C) und mit LPS im Vergleich zur Kontrolle. Im 2. Versuch ließ sich an Tag 22 bei Behandlung mit LPS eine signifikant verminderte Zilienausbildung im Vergleich zur Kontrolle nachweisen. Versuch 3 zeigte an Tag 30 eine Verminderung des Anteils mit Zilien in Vergleich zu Tag 22 in allen Gruppen. Bei Behandlung mit Pam3CSK4 ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen.

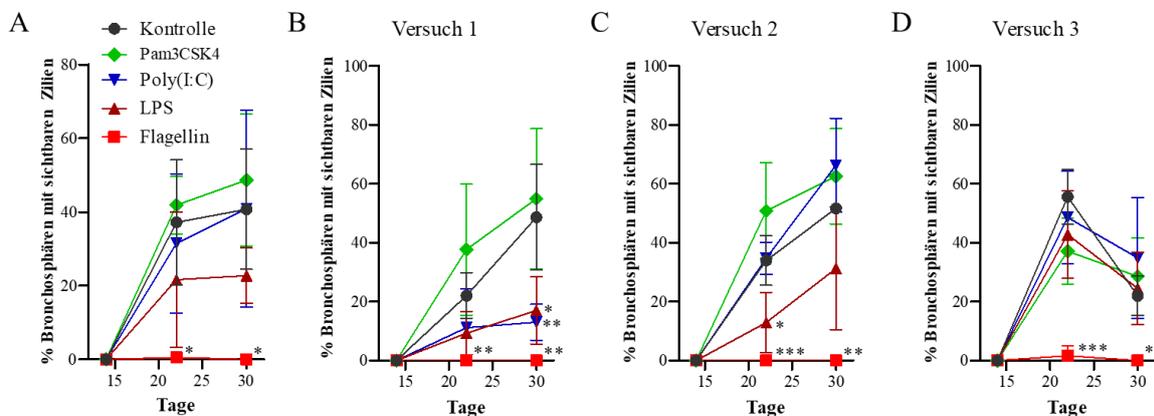


Abbildung 7. Flagellin führt zu einer signifikanten Verminderung der Bildung von Bronchosphären mit sichtbaren Zilien in der Phasenkontrastmikroskopie

Primäre Atemwegsepithelzellen wurden zur Ausbildung von Bronchosphären in Matrigel kultiviert. Ab Tag 3 (48 Stunden nach dem Ausbringen der Zellen) wurden die Zellen mit einem Kontrollmedium oder mit jeweils 100 ng/ml Pam3CSK4, Poly(I:C), LPS oder Flagellin behandelt. An den Tagen 14, 22 und 30 wurde mittels Phasenkontrastmikroskopie der prozentuale Anteil an Bronchosphären mit sichtbaren Zilien ausgewertet. (A) Anteil an Bronchosphären mit sichtbaren Zilien als Mittelwert der unabhängigen Versuche. Die Daten sind mit \pm SD und n = 3 je Gruppe dargestellt. (B-D) Gezeigt wird der Anteil an Bronchosphären mit sichtbaren Zilien der unabhängigen Versuche. Die Daten sind mit \pm SD und n = 3-4 Wells je Gruppe dargestellt. Die behandelten Gruppen wurden mittels Student's t-Test (zweiseitig) mit der Kontrollgruppe verglichen. *p < 0.05, **p < 0.01 und ***p < 0.001.

Weiterhin wurde der prozentuale Anteil an Bronchosphären mit sichtbaren Zilien in der HE-Färbung von Paraffinschnitten ausgewertet (Abb. 8A). Hierbei zeigte sich ein signifikant verminderter Anteil bei Behandlung mit Flagellin im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Bei Behandlung mit

Pam3CSK4, Poly(I:C) und LPS ließ sich gemittelt über die drei Versuche kein signifikanter Unterschied feststellen (Abb. 8B-E).

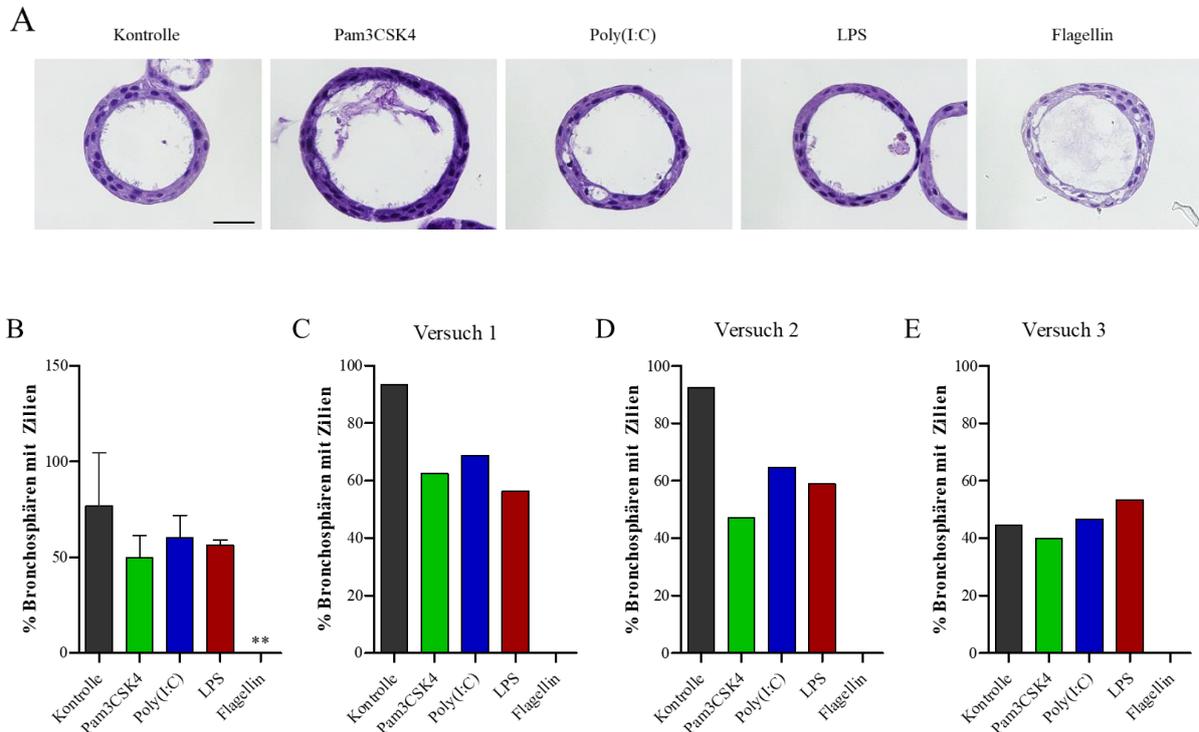


Abbildung 8. Flagellin führt zu einer signifikanten Verminderung der Bildung von Bronchosphären mit histologisch sichtbaren Zilien

Nach 30 Tagen der Kultivierung wurden die Bronchosphären der einzelnen Gruppen vereinigt, eingebettet, histologische Schnitte angefertigt und mit der HE-Färbung angefärbt. (A) Gezeigt sind repräsentative Bronchosphären aus der Kontrollgruppe ohne Behandlung und aus den Gruppen nach Behandlung mit Pam3CSK4, Poly(I:C), LPS und Flagellin. Der Skalierungsbalken entspricht einer Länge von 20 μm . (B) Anteil an Bronchosphären mit Zilien als Mittelwert der unabhängigen Versuche. Die Daten sind mit $\pm\text{SD}$ und $n = 3$ je Gruppe dargestellt. Die behandelten Gruppen wurden mittels Student's t-Test (zweiseitig) mit der Kontrollgruppe verglichen. $**p < 0.01$. (C - E) Gezeigt wird der Anteil an Bronchosphären mit Zilien der unabhängigen Versuche. Die Daten sind mit $n = 13-18$ je Gruppe dargestellt.

5.2.2 Flagellin vermindert die Ausbildung sichtbarer Lumina

Mittels Phasenkontrastmikroskopie wurde nach 14, 22 und 30 Tagen der Kultivierung der prozentuale Anteil an Bronchosphären mit sichtbarem Lumen ausgewertet (Abb. 9). Unter Behandlung mit Flagellin zeigte sich eine tendenzielle Verringerung der Ausbildung von Lumina. Eine signifikante Abweichung von der unbehandelten Gruppe konnte allerdings unter Behandlung mit Pam3CSK4, LPS, Poly(I:C) oder Flagellin nicht festgestellt werden.

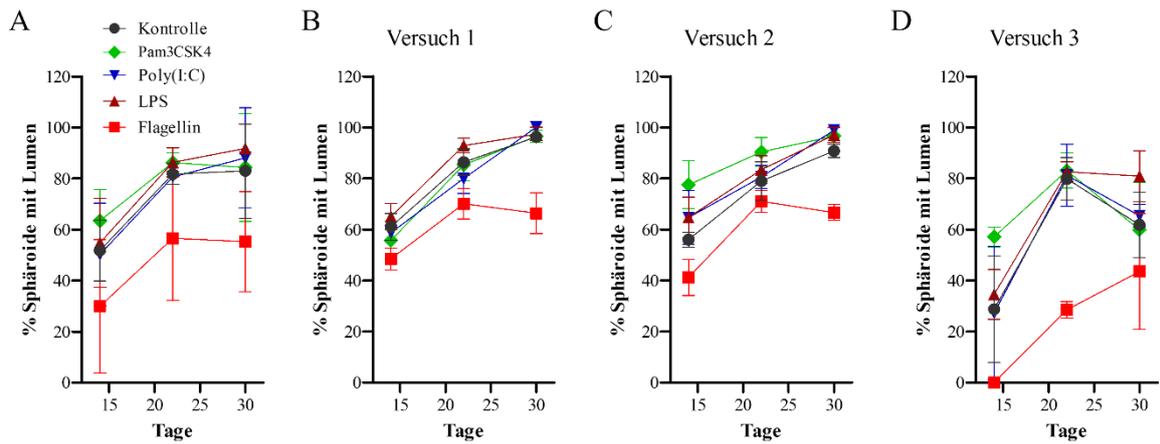


Abbildung 9. Flagellin führt zu einer leichten Verminderung der Ausbildung von Lumina

An den Tagen 14, 22 und 30 wurde mittels Phasenkontrastmikroskopie der prozentuale Anteil an Bronchosphären mit sichtbarem Lumen ausgewertet. (A) Anteil an Bronchosphären mit sichtbarem Lumen als Mittelwert der unabhängigen Versuche. Die Daten sind mit \pm SD und $n = 3$ je Gruppe dargestellt. (B-D) Gezeigt wird der Anteil an Bronchosphären mit sichtbarem Lumen der unabhängigen Versuche. Die Daten sind mit \pm SD und $n = 3-4$ Wells je Gruppe dargestellt. Die behandelten Gruppen wurden mittels Student's t-Test (zweiseitig) mit der Kontrollgruppe verglichen.

Weiterhin wurden Paraffinschnitte der Bronchosphären in HE-Färbung ausgewertet (Abb. 10). Hier zeigte sich ein signifikant verminderter Anteil an Bronchosphären mit Lumen bei Behandlung mit Flagellin im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Abb. 10A). Der Anteil an Bronchosphären mit Lumen lag in allen drei Versuchen, sowohl bei der Kontrollgruppe als auch bei den mit Pam4CSK4, Poly(I:C) und LPS behandelten Kulturen zwischen 87 und 100%, während etwa 50 bis 75% der mit Flagellin behandelten Kulturen ein Lumen aufwiesen (Abb. 10B-D). Die Tendenz des verminderten Einflusses durch Flagellin aus der Phasenkontrastmikroskopie wird hierdurch bestätigt. Abbildung 10E zeigt eine HE-Färbung mit Flagellin behandelter Bronchosphären.

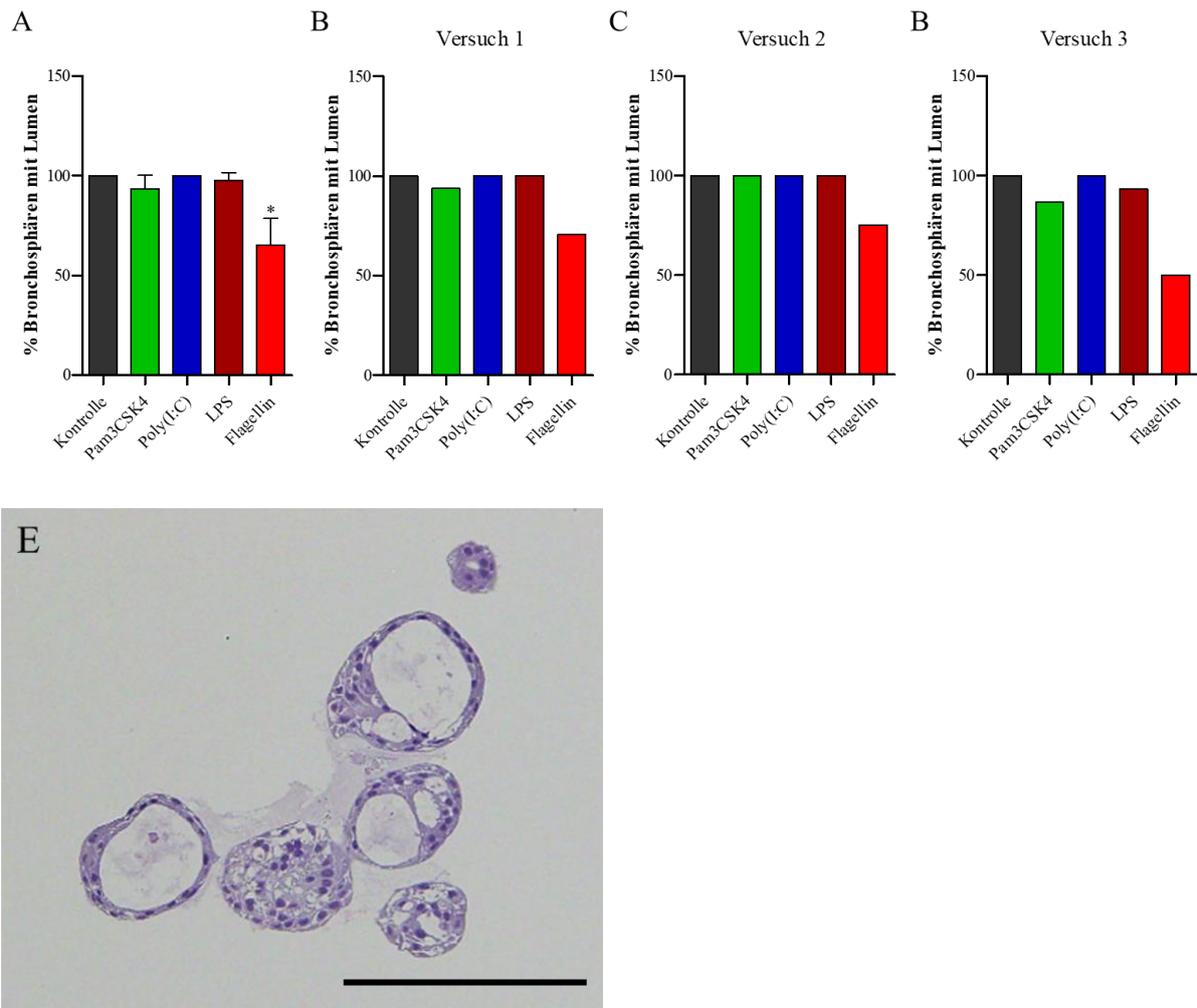
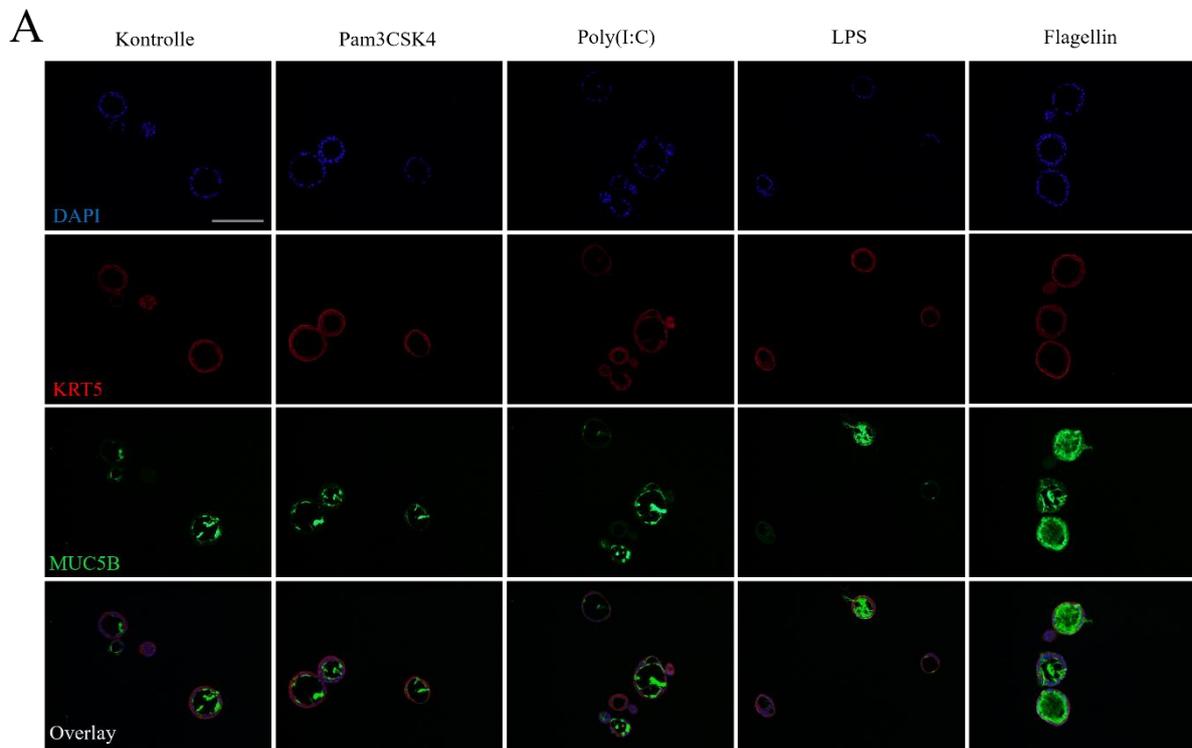


Abbildung 10. Flagellin führt zu einer signifikant verminderten Bildung von Bronchosphären mit Lumen

Nach 30 Tagen der Kultivierung wurden die Bronchosphären der einzelnen Gruppen vereinigt, eingebettet, histologische Schnitte angefertigt und mit der HE-Färbung angefärbt. (A) Anteil an Bronchosphären mit Lumen als Mittelwert der unabhängigen Versuche. Die Daten sind mit \pm SD und $n = 3$ je Gruppe dargestellt. Die behandelten Gruppen wurden mittels Student's t-Test (zweiseitig) mit der Kontrollgruppe verglichen. $*p < 0.05$. (B - D) Gezeigt wird der Anteil an Bronchosphären mit Lumen der unabhängigen Versuche. Die Daten sind mit $n = 13-18$ je Gruppe dargestellt. (E) Gezeigt sind Bronchosphären aus der mit Flagellin behandelten Gruppe. Der Skalierungsbalken entspricht einer Länge von $100 \mu\text{m}$.

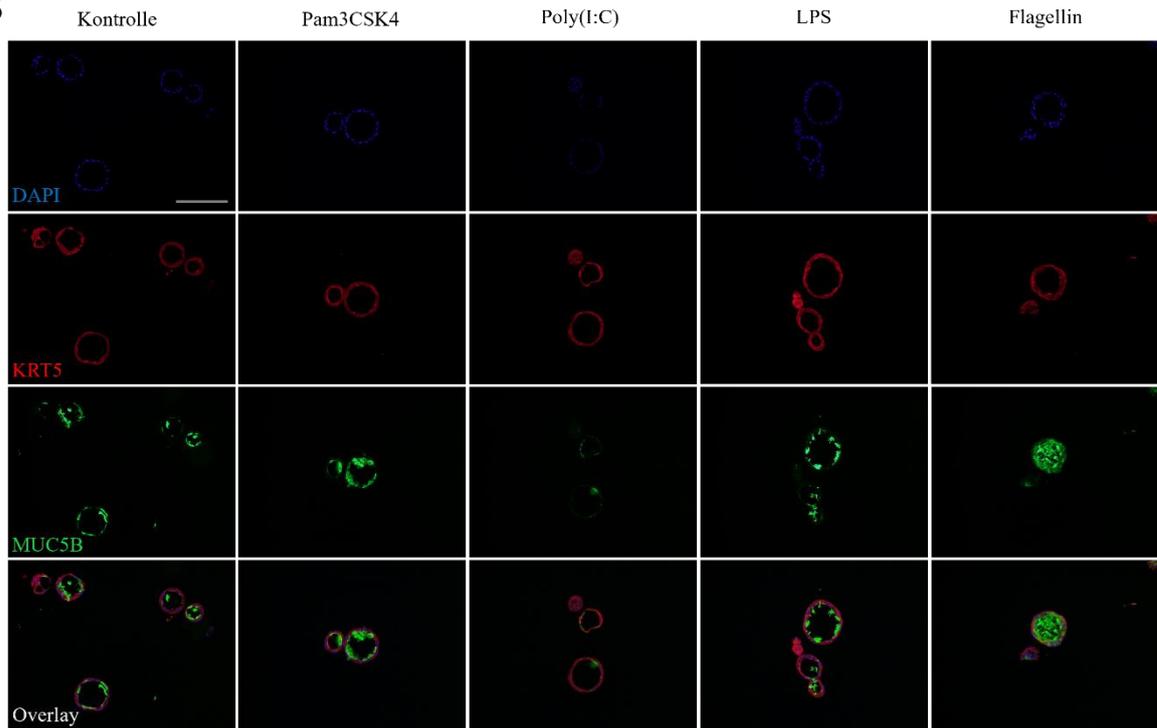
5.2.3 Flagellin und Pam3CSK4 steigern die Mukusproduktion

Zur Untersuchung der Mukusproduktion der differenzierten Bronchosphären wurden Immunfluoreszenzfärbungen von Paraffinschnitten angefertigt. Mittels Antikörperfärbung wurde der Basalzellmarker KRT5 und das Muzin MUC5B gefärbt. Zellkerne wurden mit einer DAPI-Färbung sichtbar gemacht. Repräsentative Färbungen der einzelnen Versuche sind in Abbildung 11A-C dargestellt. Mittels Fiji (ImageJ) wurde die Intensität des Signals für MUC5B pro Fläche der einzelnen Bronchosphären in der entsprechenden Schnittebene berechnet (Abb. 11D-G). Es zeigte sich gemittelt über die drei unabhängigen Versuche eine signifikant höhere Intensität nach Behandlung mit Pam3CSK4 und mit Flagellin im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 11D). In Versuch 2 konnte darüber hinaus eine signifikant erhöhte Intensität nach Behandlung mit Poly(I:C) festgestellt werden (Abb. 11F). Weiterhin war die Intensität in Versuch 3 bei Pam3CSK4, LPS, Poly(I:C) und bei Flagellin gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht (Abb. 11G).



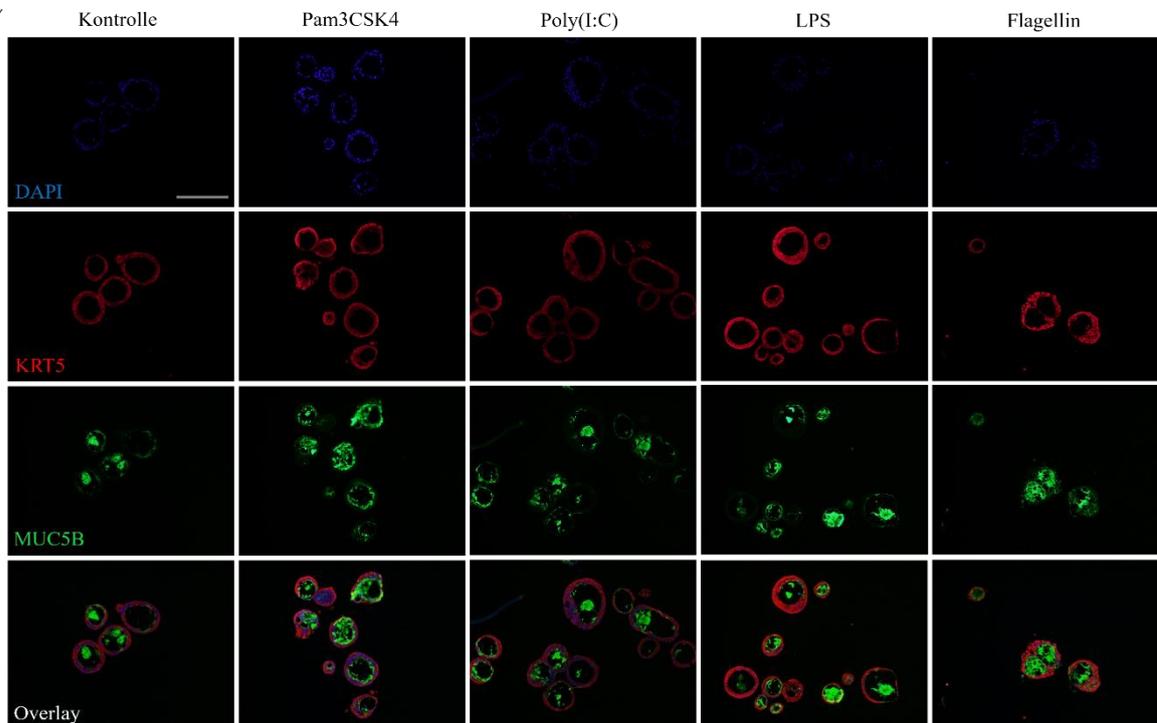
Versuch 1

B



Versuch 2

C



Versuch 3

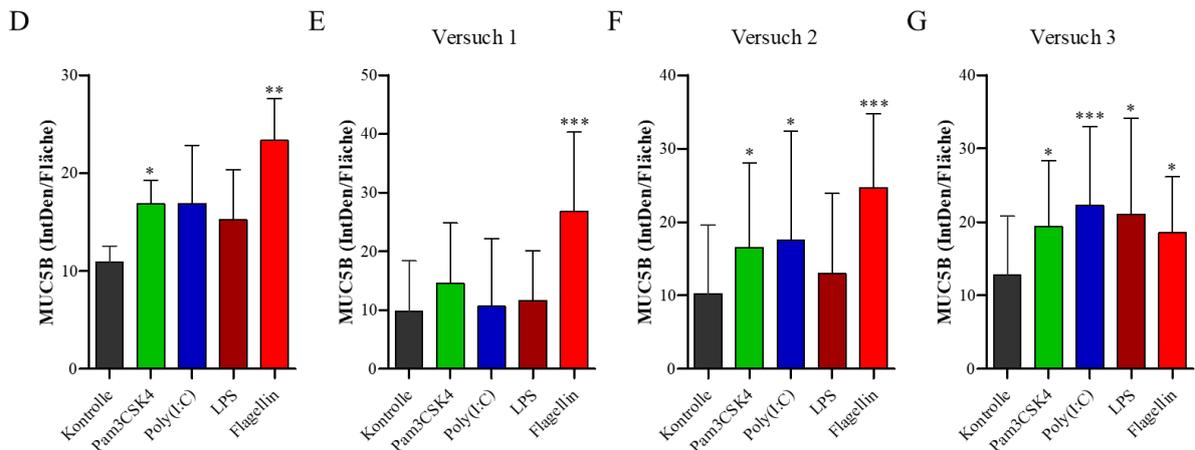


Abbildung 11. Flagellin und Pam3CSK4 führen zu einer gesteigerten Bildung von MUC5B in Bronchosphären

Nach 30 Tagen der Kultivierung wurden die Bronchosphären der einzelnen Gruppen vereinigt, eingebettet, histologische Schnitte angefertigt und eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. (A-C) Gezeigt sind jeweils Bronchosphären aus der Gruppe ohne Behandlung und aus der Gruppe bei Behandlung mit Pam3CSK4, Poly(I:C), LPS und Flagellin. Es wurden Basalzellen mittels KRT5-Antikörper, Mukus mittels MUC5B-Antikörper und Zellkerne mittels DAPI angefärbt. Die jeweilig einzelnen Färbungen sowie ein Overlay aus allen Färbungen sind dargestellt. Der Skalierungsbalken entspricht einer Länge von 100 μm . (D) Intensität (Integrated Density (IntDen)) des Signals der MUC5B-Färbung pro Fläche der einzelnen Bronchosphären als Mittelwert der unabhängigen Versuche. Die Daten sind mit $\pm\text{SD}$ und $n = 3$ je Gruppe dargestellt. (E-G) Gezeigt wird die Intensität des MUC5B-Signals pro Fläche der Bronchosphären der unabhängigen Versuche. Die Daten sind mit $\pm\text{SD}$ und $n = 11-36$ je Gruppe dargestellt. Die behandelten Gruppen wurden mittels Student's t-Test (zweiseitig) mit der Kontrollgruppe verglichen. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$.

Weiterhin wurde immunhistochemisch das Muzin MUC5AC angefärbt. Repräsentative Färbungen der einzelnen Gruppen sind in Abbildung 12A dargestellt. Mittels Fiji (ImageJ) wurde die Intensität des Signals für MUC5AC pro Fläche der einzelnen Bronchosphären in der entsprechenden Schnittebene berechnet (Abb. 12B-E). Es zeigte sich gemittelt über die drei unabhängigen Versuche eine signifikant höhere Intensität nach Behandlung mit Flagellin im Vergleich zur Kontrollgruppe.

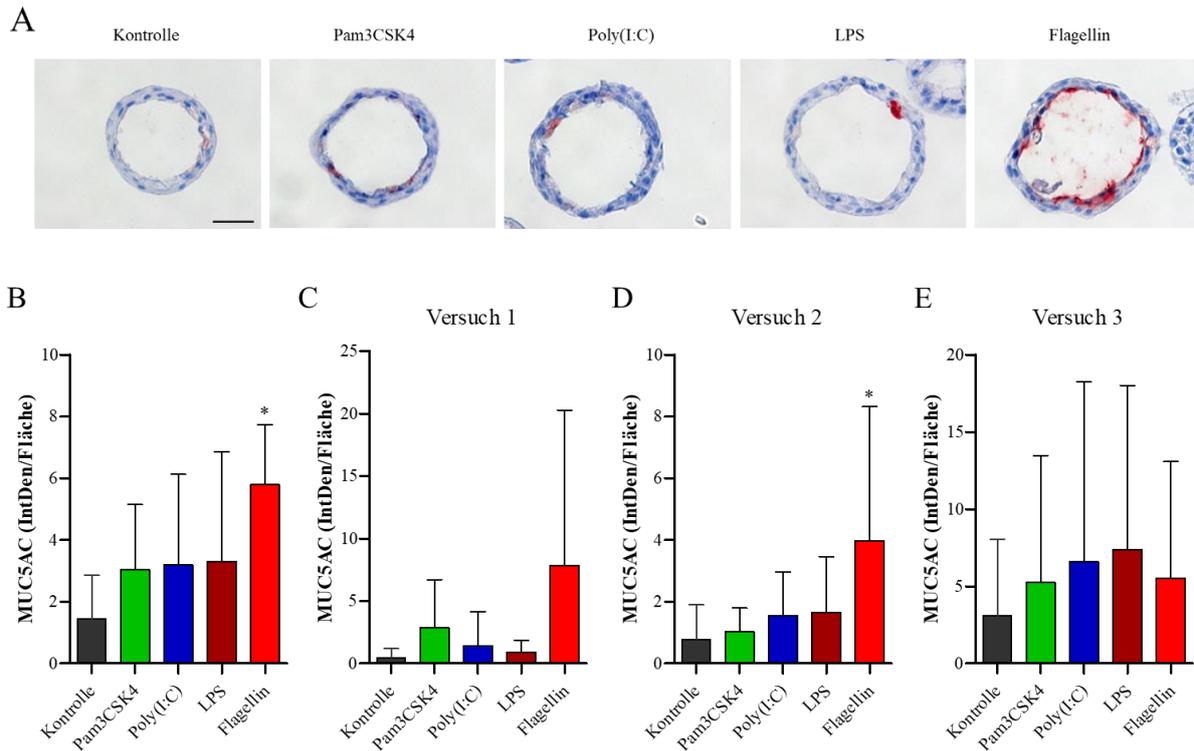


Abbildung 12. Flagellin führt zu einer gesteigerten Bildung von MUC5AC in Bronchosphären

Nach 30 Tagen der Kultivierung wurden die Bronchosphären der einzelnen Gruppen vereinigt, eingebettet, histologische Schnitte angefertigt und eine Immunhistochemie durchgeführt. (A) Gezeigt sind jeweils Bronchosphären aus der Gruppe ohne Behandlung und aus der Gruppe bei Behandlung mit Pam3CSK4, Poly(I:C), LPS und Flagellin. Es wurde Mukus mittels MUC5AC-Antikörper angefärbt. Der Skalierungsbalken entspricht einer Länge von 20 μm . (B) Intensität (Integrated Density (IntDen)) des Signals der MUC5AC-Färbung pro Fläche der einzelnen Bronchosphären als Mittelwert der unabhängigen Versuche. Die Daten sind mit $\pm\text{SD}$ und $n = 3$ je Gruppe dargestellt. (C-E) Gezeigt wird die Intensität des MUC5AC-Signals pro Fläche der Bronchosphären der unabhängigen Versuche. Die Daten sind mit $\pm\text{SD}$ und $n = 5-12$ je Gruppe dargestellt. Die behandelten Gruppen wurden mittels Student's t-Test (zweiseitig) mit der Kontrollgruppe verglichen. $*p < 0.05$.

5.2.4 PAMPs führen zu keiner Veränderung des Größenwachstums der Bronchosphären

Die Durchmesser der Bronchosphären wurden während der Kultivierung an den Tagen 14, 22 und 30 anhand phasenkontrastmikroskopischer Aufnahmen mittels Fiji (ImageJ) gemessen. Hierbei zeigte sich in den Behandlungsgruppen Pam3CSK4, LPS, Poly(I:C) und Flagellin kein signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrollgruppe (Abb. 13A-D). In allen Gruppen zeigte sich tendenziell eine Stagnation des Größenwachstums nach Tag 22.

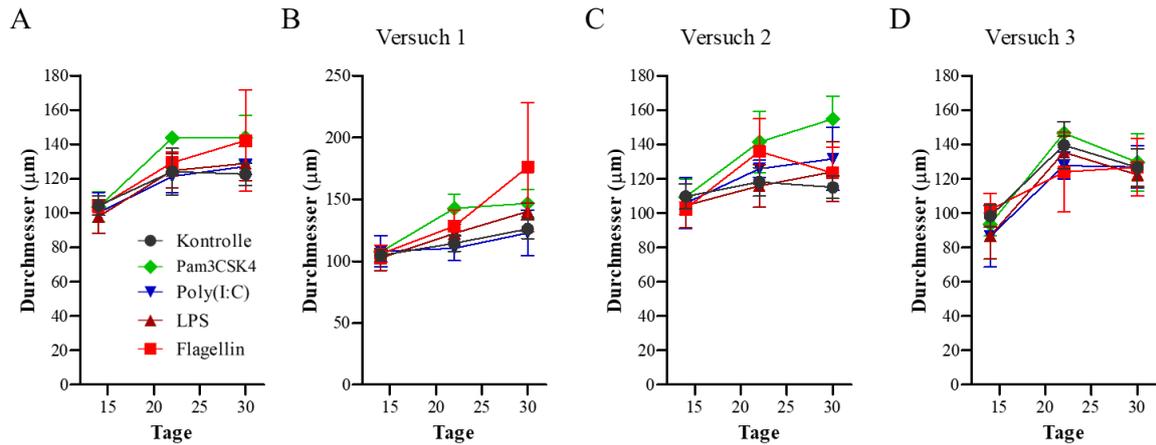


Abbildung 13. PAMPs führen zu keiner signifikanten Veränderung des Größenwachstums von Bronchosphären

An den Tagen 14, 22 und 30 wurde anhand phasenkontrastmikroskopischer Aufnahmen der Durchmesser der einzelnen Bronchosphären gemessen und ausgewertet. (A) Durchmesser der Bronchosphären als Mittelwert der unabhängigen Versuche. Die Daten sind mit \pm SD und $n = 3$ je Gruppe dargestellt. (B-D) Gezeigt wird der Durchmesser der Bronchosphären der unabhängigen Versuche. Die Daten sind mit \pm SD und $n = 4$ Wells je Gruppe (5–37 Bronchosphären je Well im Mittelwert) dargestellt. Die behandelten Gruppen wurden mittels Student's t-Test (zweiseitig) mit der Kontrollgruppe verglichen.

6 Diskussion

Eine zentrale Frage bei der Betrachtung chronischer Atemwegserkrankungen wie der COPD und der CF ist die Ursache der strukturellen Umbauprozesse des Epithels. Hierzu zählen die Becherzellhyperplasie, der Verlust schlagender Zilien und die dadurch beeinträchtigte mukoziliäre *Clearance* [21].

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode zur Kultivierung humaner Bronchosphären etabliert, die es erlaubt die zugrunde liegenden Mechanismen der Pathogenese chronischer Lungenerkrankungen in humanem Epithel zu untersuchen. Aus primären Basalzellen des humanen Atemwegsepithels konnten Bronchosphären mit Lumen, schlagenden Zilien und sekretorischen Zellen differenziert werden. Darüber hinaus wurde der Einfluss verschiedener PAMPs auf die Entwicklung der Bronchosphären untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit Flagellin während der Differenzierungsphase die Ziliogenese hemmt und zu einer starken Expression von Muzinen führt. Auch der synthetische TLR-2-Ligand Pam3CSK4 induzierte eine gesteigerte Mukusproduktion. Pam3CSK4 hatte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Ausbildung von Zilien. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine fortdauernde Aktivierung des respiratorischen Epithels durch bakterielle Faktoren wie Flagellin über TLRs maßgeblich zu einer übermäßigen Mukusbildung und Becherzellhyperplasie führt. Dies trägt potenziell bei der COPD und der CF zu einer eingeschränkten mukoziliären *Clearance* und einem Teufelskreis aus geschwächter Abwehr in der Lunge und wiederkehrenden Infektionen bei [72].

6.1 Bronchosphären als Methode zur Untersuchung der Differenzierung des Bronchialepithels

Organoide wie Bronchosphären ahmen die Zellzusammensetzung und Funktion des Ursprungsgewebes in einer 3D-Struktur in der Zellkultur nach. Es konnte gezeigt werden, dass die dreidimensionale Struktur einen wichtigen Einfluss auf die Funktion von Zellen hat und Signalwege, welche die Zelldifferenzierung regulieren, bei der Organentwicklung im Organismus und bei der Bildung von Organoiden *in vitro* vergleichbar sind [42]. Dies stellt einen herausragenden Vorteil gegenüber konventionellen, zweidimensionalen Zellkulturmethoden dar.

Da Organoiden in Mikroplatten kultiviert werden können, bietet sich darüber hinaus im Vergleich zu anderen Kultivierungsmethoden, wie beispielsweise Air-liquid Interface (ALI)-Kulturen, die Möglichkeit eine weitaus größere Anzahl an Einheiten parallel auszuwerten. Es können daher potenzielle zelluläre Mechanismen und Wirkstoffe im Hochdurchsatz-Screening analysiert werden, wie im Fall des respiratorischen Epithels beispielsweise die der Differenzierung von Basalzellen zu einem ausdifferenzierten Epithel oder Zelltoxizität [10,39].

In der vorliegenden Arbeit konnte erfolgreich eine Methode zur Kultivierung von Bronchosphären nach einem publizierten Protokoll von Danahay et al. adaptiert werden. Wie bereits von Danahay et al.

beschrieben, konnten hiermit humane Basalzellen des Bronchialepithels zu einem mukoziliären Epithel in einer 3D-Struktur differenzieren [20]. Darüber hinaus wurde ein Protokoll zur histologischen Analyse entwickelt. In diesem Protokoll werden Bronchosphären in Agarose eingebettet, sodass sich die Bronchosphären in hoher Anzahl in einer dünnen Schicht von etwa 1-2 mm, konzentriert auf eine kreisförmige Fläche mit einem maximalen Durchmesser von ca. 50 mm, befinden. In daraus erstellten Paraffinschnitten sind daher zahlreiche angeschnittene Bronchosphären für histologische Analysen auffindbar. Mittels Übersichts-, Fluoreszenz- und immunhistochemischer Färbungen konnte die Ausbildung von Zilien und Lumina, die Zellzusammensetzung und Bildung von Muzinen in zahlreichen Bronchosphären parallel analysiert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass mittels dieser Methodik Bronchosphären und deren Differenzierung unter verschiedenen Versuchsbedingungen adäquat und in großer Zahl analysiert werden können.

Die im Rahmen dieser Arbeit kultivierten Bronchosphären bildeten zum Lumen gerichtete Zilien, wie es bei einer physiologischen Polarisierung der Zellen zu erwarten wäre. Die Zilien zeigten sich motil. Im Atemwegsepithel sorgt ein Microtubuli-Netzwerk unter der apikalen Zelloberfläche, kommunizierend über apikale Zellverbindungen, für eine planare Zellpolarität und damit eine gleichgerichtete Zilienbewegung. Inwiefern in den betrachteten Bronchosphären eine gerichtete Motilität besteht, wie sie zur effizienten mukoziliären *Clearance in vivo* vonnöten ist, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt [80].

Die Anzahl und die Verteilung von Basalzellen in den humanen Atemwegen können je nach Spender oder Spenderin und je nach Abschnitt der Atemwege unterschiedlich ausfallen. Dahingehend kann sich sowohl das Wachstum als auch die Differenzierung von Bronchosphären *in vitro* unterscheiden [10]. In dieser Arbeit wurden Basalzellen verschiedener Spender/-innen verwendet, die aus Lungenresektionen im Rahmen von Operationen gewonnen wurden. Der Verlauf der Differenzierung war bei den Spendern und Spenderinnen vergleichbar. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Durchmesser der Bronchosphären. In den histologischen Übersichtsfärbungen zeigte sich zudem, dass bis zu über 90% der Bronchosphären Zilien aufwiesen. Auf diese Arbeit aufbauende Arbeiten zeigten, dass es mit der hier etablierten Methodik auch möglich ist, Bronchosphären aus Basalzellen zu differenzieren, die mittels Bürstenbiopsie im Rahmen einer Lungenlavage aus unterschiedlichen Abschnitten der Lunge gewonnen wurden [62]. Inwiefern Organoide aus Basalzellen unterschiedlicher Lungenabschnitte sich z.B. in ihrer zellulären Zusammensetzung unterscheiden, müssen zukünftige Studien zeigen.

Die etablierte Methodik wurde folgend genutzt, um die Auswirkung mikrobieller Stimuli auf die Differenzierung des respiratorischen Epithels zu prüfen.

6.2 Die Behandlung mit TLR-Liganden beeinflusst die Differenzierung der Bronchosphären

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von TLRs mittels PAMPs die Differenzierung von Basalzellen des Atemwegsepithels zu Bronchosphären beeinflusst. Gemäß den erhobenen Daten verursacht eine andauernde Aktivierung von TLRs eine Mukushyperproduktion und im Fall von Flagellin eine verminderte Zilienentwicklung.

Die Expression der TLRs 1-5 in Basalzellen und im differenzierten Bronchialepithel ist in der Literatur hinreichend beschrieben [34,36]. Verschiedene Arbeiten zeigten, dass Basalzellen und das differenzierte Epithel über diese TLRs aktiviert werden können und dass dies unter anderem zu einer gesteigerten Abgabe von inflammatorischen Mediatoren und antimikrobiellen Peptiden führt [34,37]. In dieser Arbeit wurden Liganden für TLR1/2 (Pam3CSK4), TLR3 (Poly(I:C)), TLR4 (LPS) und TLR5 (Flagellin) in einer Konzentration von je 100 ng/ml verwendet. Die Behandlung mit den verschiedenen Liganden unterschied sich in der Wirkung auf die Differenzierung der Bronchosphären. Während die Behandlung mit Flagellin zu einer Mukushyperproduktion und einer Hemmung der Zilienbildung führte, hatten die Liganden Poly(I:C) und LPS über alle drei Experimente gemittelt keinen signifikanten Einfluss auf die Differenzierung. Pam3CSK4 bewirkte ausschließlich eine Mukushyperproduktion. Flagellin führte darüber hinaus zu einer leicht verminderten Bildung an Bronchosphären mit Lumen. Die unterschiedlich ausgeprägte Reaktion auf die Liganden könnte auf die Dichte bzw. Stärke der Expression der entsprechenden TLRs, deren Lokalisation und die aktivierten Signalwege zurückzuführen sein. Sowohl TLR2 und TLR4 als auch TLR5 vermitteln die Expression von Entzündungsmediatoren über MyD88, MAP-Kinasen und Transkriptionsfaktoren wie NF κ B [16,22,23]. NF κ B nimmt eine zentrale Stellung bei der induzierten Expression von MUC5AC ein [24]. Eine im Vergleich zu Flagellin verminderte Wirkung von Pam3CSK4 auf die Bildung von Mukus und die Ziliogenese könnte an einer geringeren Expression von TLR2 und seines Korezeptors TLR1 liegen. Zudem legen Studien nahe, dass das Fehlen von Korezeptoren wie CD36 in Atemwegsepithelzellen zu einer verminderten Reaktion auf TLR2-Liganden führen könnte. Das geringe Ansprechen von LPS lässt sich möglicherweise durch ein Fehlen nötiger Korezeptoren wie MD2 und CD14 in Atemwegsepithelzellen erklären [81]. Eine verminderte Expression von Korezeptoren könnte im Fall von TLR2 und TLR4 außerdem zu einer verminderten Induktion von Muzinen führen. Auch wenn es Spender/-innen-abhängig zu einer etwas gesteigerten Expression von Mukus kam, reichte die Aktivierung über TLR2 und TLR4 nicht für eine Hemmung der Ziliogenese.

TLR3 vermittelt die Expression von inflammatorischen Mediatoren wie IFN β über TRIF-abhängige Signalwege unabhängig von MyD88 [23,31]. In zwei Experimenten konnte nach Behandlung mit Poly(I:C) eine gesteigerte Muzinexpression beobachtet werden. Da auch über den TRIF-abhängigen Signalweg Transkriptionsfaktoren wie NF κ B und MAP-Kinasen aktiviert werden, ist dieses Ergebnis plausibel [23]. Somit ist es denkbar, dass Poly(I:C) eine gesteigerte Expression von Muzinen induziert.

Dies geschieht aufgrund des MyD88-unabhängigen Signalwegs allerdings nicht mit der gleichen Stärke wie durch Flagellin, sodass keine Hemmung der Ziliogenese zu beobachten war [31].

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten PAMPs wurden jeweils mit frischem Medium hinzugegeben. Fraglich ist, ob die TLR-Aktivierung basal stattfindet, eine Diffusion bis zu den luminalen Rezeptoren erfolgt oder sich die Wirkung gar intrazellulär entfaltet. Gemäß dem Eintritt inhalierter Pathogene, wäre *in vivo* eine Wirkung von luminal zu erwarten, wobei bei chronischen Infektionen der Atemwege Bakterien und bakterielle Bestandteile auch von Atemwegsepithelzellen aufgenommen werden und in das geschädigte Gewebe eindringen [45]. Entsprechend des hier verwendeten Versuchsaufbaus ist eine primäre Wirkung von basal denkbar, da die Liganden zu einem früheren Zeitpunkt der Organoid-Differenzierung hinzugegeben wurden. Da zu dem frühen Zeitpunkt die Basalzellen noch undifferenziert sind und sich keine Sphären gebildet haben, kann davon ausgegangen werden, dass die verschiedenen Liganden die Zellen gut erreichten. Es ist denkbar, dass sich die Wirkung der Liganden schon zu diesem frühen Zeitpunkt entfaltet.

Chronische Lungenerkrankungen gehen mit einer geschädigten epithelialen Barriere einher [25,81]. Eine ständige Aktivierung von Basalzellen durch mikrobielle Bestandteile könnte daher eine adäquate Regeneration des Atemwegsepithels stören und eine exzessive Mukusbildung verursachen.

Die Wirkung von Flagellin wird gesondert im folgenden Kapitel diskutiert.

6.3 Die Behandlung mit Flagellin führt zu einer deutlich veränderten Differenzierung der Bronchosphären

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Flagellin eine besonders starke Wirkung auf die Differenzierung der Bronchosphären hat. Die Behandlung mit Flagellin führte, gerade im Vergleich zu den anderen TLR-Liganden, zu einer verstärkten Bildung von Mukus und einer verminderten Bildung von Zilien. Darüber hinaus waren vermehrt Bronchosphären ohne Lumen auffindbar.

Eine deutliche Aktivierung des Immunsystems bei Stimulation durch Flagellin ist generell bekannt [41]. Hayashi et al. beschrieben, dass der TLR5-Rezeptor nur durch Flagellin aktiviert wird [35]. Zhang et al. zeigten, dass Atemwegsepithelzellen *P. aeruginosa* über Flagellin mittels TLR5 detektieren [86]. Auch Blohmke et al. zeigten, dass Flagellin über TLR5 maßgeblich zur Aktivierung von Zellen durch *P. aeruginosa* beiträgt und dass bei 75% klinischer Isolate von *P. aeruginosa* eine durch Flagellin vermittelte TLR5-Aktivierung bei chronischer CF erhalten bleibt [14]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass eine fortdauernde Aktivierung von Atemwegsepithelzellen über die Flagellin-TLR5-Achse bei der CF nicht nur zur chronischen Entzündung der Atemwege beiträgt, sondern auch die Homöostase und Regeneration des Atemwegsepithels beeinträchtigt, was wiederum zu einer Becherzellmetaplasie beiträgt. Es ist allerdings möglich, dass neben TLR5 auch weitere Rezeptoren an der

Erkennung von Flagellin beteiligt sind. Yue Zhao et al. zeigten, dass eine zytosolische Detektion von Flagellin beispielsweise durch den NLRC4-Inflammasom-Rezeptor erfolgen kann, weshalb die in dieser Arbeit beschriebenen Effekte von Flagellin möglicherweise nicht ausschließlich auf TLR5-Rezeptoren zurückgeführt werden können [87]. Allerdings sind für diese Aktivierung bakterielle Sekretionssysteme notwendig, welche in den Versuchsbedingungen dieser Arbeit nicht gegeben waren. Zudem ist die Aktivierung des NLRC4-Inflammasoms primär für Alveolarmakrophagen, nicht aber für Epithelzellen beschrieben. Eine Funktion für NLRC4 und Flagellin in Makrophagen konnte im *P. aeruginosa*-induzierten Pneumoniemodell nachgewiesen werden [18]. Es lässt sich daher aber nicht ausschließen, dass auch derartige Signalwege *in vivo* eine Rolle spielen und für die gestörte Geweberegeneration und Hyperinflammation mitverantwortlich sind. Dahingehend sind weitere Studien nötig.

Danahay et al. konnten in Folge von Behandlung von Bronchosphären mit IL-13 und IL-17A, bekannte Mediatoren bei Asthma bzw. Infektion mit extrazellulären Bakterien wie *P. aeruginosa*, eine Becherzellmetaplasie mit erhöhter Mukusproduktion und einer Verminderung von Markern für Zilienzellen detektieren [20,54,83]. Darüber hinaus konnte eine Abhängigkeit dessen von Notch2 festgestellt werden. Bei Inhibition von Notch2 konnte keine Becherzellmetaplasie im Rahmen der IL-13 und IL-17A-Stimulation mehr beobachtet werden [20]. Inwiefern Notch2 auch bei der Flagellin-induzierten Hemmung der Ziliogenese und Becherzellmetaplasie eine Funktion hat und welche Signalwege hier noch beteiligt sind, müssen weitere Studien zeigen. Es ist jedoch denkbar, dass im Fall von TLR5 und IL-17A gleiche Signalwege zu den beobachteten Effekten führen. So führt sowohl die Aktivierung von TLR5 als auch des IL-17A-Rezeptorkomplexes zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NFκB und MAP-Kinasen mit Hilfe von Adaptorproteinen wie TRAF6 und TAK1 [6,23]. Da neben weiteren Entzündungsmediatoren auch IL-17 für die Entzündungsmediation bei Infektion mit *P. aeruginosa* verantwortlich gemacht wird, ist es denkbar, dass bakterielle Faktoren additiv oder sogar synergistisch mit körpereigenen Entzündungsmediatoren zur Becherzellmetaplasie führen [54,83].

Sicher konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Stimulation mit Flagellin eine veränderte Differenzierung der Bronchosphären zur Folge hat. Die weitere Untersuchung dahingehend möglicher anderer Ursachen, neben der zu erwartenden Aktivierung von TLR5, könnten zukünftige Studien liefern.

6.4 PAMPs sind maßgeblich an der Pathophysiologie von CF und COPD beteiligt

Chronische Atemwegsinfektionen wie CF und COPD gehen mit einer Becherzellhyperplasie, einer Mukushyperproduktion, -sekretion sowie -akkumulation und einem Verlust an Zilienzellen einher [21]. Der Anteil an mukusproduzierenden Zellen gegenüber Zilienzellen ist bei Menschen mit chronischen Atemwegsinfektionen wie CF oder COPD erhöht [10]. Ursächlich in Verbindung gebracht werden

hiermit chronische Infektionszustände der Atemwege [10,72]. Die der CF und COPD zugrundeliegenden Pathologien und die rezidivierenden Infektionen verstärken sich im Laufe der Zeit gegenseitig [15]. Vermehrt zäher Mukus wird abgegeben, wodurch die mukoziliäre *Clearance* abnimmt. Pathogene werden anschließend vermehrt im Mukus gefangen, erreichen die epithelialen Oberflächen, dringen in das Gewebe ein und bedingen lokale Infektionen, welche eine Mukuszellhyperplasie zur Folge haben [48]. Der Progress der COPD und der CF stehen in starkem Zusammenhang mit der Ansammlung von entzündlichem Mukus im Lumen der Atemwege [40]. Eine tragende Rolle bei der Immunreaktion auf Pathogene spielen TLRs, über welche die Epithelzellen PAMPs registrieren können [30].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bakterielle und virale Komponenten zu einer deutlich veränderten Differenzierung des humanen Bronchialepithels führen können. Konkret bedeutet dies eine verminderte Ausbildung an Zilien und eine Mukushyperproduktion. Die erhobenen Daten weisen darauf hin, dass die strukturellen Veränderungen des Bronchialepithels bei chronischen Erkrankungen der Atemwege nicht rein von endogenen Faktoren abhängig sind, wie beispielsweise die Dysfunktionalität des CFTR-Proteins bei der CF [44,61,65]. Adam et al. zeigten, dass frisch isolierte humane Atemwegsepithelzellen von CF-Patienten und -Patientinnen in ALI-Kultivierung einen hyperinflammatorischen Phänotyp aufweisen, der bei Ausbleiben einer entzündlichen Stimulation bereits nach der ersten Passage der Basalzellen zurückgeht. Die Anzahl der Becherzellen war in CF- und nicht-CF-Kulturen vergleichbar und erhöhte sich unter inflammatorischer Stimulation gleichermaßen [1]. Hajj et al. konnten eine Basalzellhyperplasie in nicht-infektiösem regenerierten humanem CF-Epithel zeigen. Eine signifikant erhöhte Ausbildung von Becherzellen und eine signifikant verminderte Ausbildung von Zilienzellen konnten hier nicht festgestellt werden [32]. Dies stützt die Annahme, dass strukturelle Umbauprozesse des Atemwegsepithels bei chronischen Atemwegserkrankungen wie der CF und COPD, maßgeblich auf Infektionen, vermittelt durch PAMPs der Krankheitserreger, zurückgehen. Während in der vorliegenden Arbeit die Differenzierung von Zilienzellen in humanen Bronchosphären unter Stimulation durch Flagellin im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe deutlich vermindert war, zeigten Adam et al. eine verzögerte Differenzierung von Zilienzellen bei CF-Kulturen auch ohne inflammatorische Stimulation [1]. Inflammatorische Reaktionen auf Pathogene dienen physiologischerweise der Abwehr und dem Schutz des Organismus [34]. Bei chronischen Atemwegserkrankungen wie CF und COPD spielen allerdings auch schädliche autoinflammatorische Prozesse eine Rolle, die in Folge der eigentlichen Abwehrreaktion angestoßen werden [34,45]. Studien konnten zeigen, dass bei CF-Erkrankung bereits pränatal Umbauprozesse im Atemwegsepithel stattfinden ohne jegliche Infektion [21,28,56,78]. Dies spricht auf der anderen Seite für einen Umbau des Bronchialepithels nicht ausschließlich durch Pathogene im Rahmen von Atemwegsinfektionen. Weiterhin gilt es zu erwähnen, dass Zellen in aktuellen Publikationen überwiegend aus erwachsenen Spendern gewonnen werden, sodass nur eingeschränkt Erkenntnisse zur Pathophysiologie chronischer Atemwegserkrankungen im Kindesalter gewonnen werden können [55].

Die Konsequenz der gewonnenen Erkenntnisse für die Therapie chronischer Atemwegserkrankungen wäre ein effizientes Erkennen und Behandeln von Atemwegsinfektionen, wie z.B. durch *P. aeruginosa* bei CF. Hierdurch kann nicht nur die akute Krankheitsexazerbation kontrolliert werden, sondern voraussichtlich auch der Krankheitsverlauf insgesamt deutlich gebessert werden [29,76]. Die Erforschung von Wirkstoffen, welche die Bildung von Biofilmen verhindern und so die Bakterien zugänglich für Antibiotika machen, ist ein vielversprechender Ansatz [70]. Weiterhin könnten die zugehörigen Signalwege der TLR-vermittelten Immunreaktion pharmakotherapeutisch moduliert werden.

6.5 Ausblick

Die Wirkung von PAMPs auf die Differenzierung von primären Atemwegsepithelzellen zu Bronchosphären wurde in der vorliegenden Arbeit in drei unabhängigen Versuchen geprüft. Es zeigte sich eine Mukushyperproduktion und eine verminderte Ausbildung an Zilienzellen in Folge von TLR-Aktivierung. Eine höhere Versuchszahl mit einer höheren Anzahl sowohl gesunder als auch unterschiedlich erkrankter Spender/-innen könnten weitere Erkenntnisse liefern. Spender/-innen-abhängige Effekte könnten gezielt herausgearbeitet werden. Weiterhin könnten die genauen Signalwege, die zu einer veränderten Differenzierung, in Folge der Stimulation durch PAMPs, führen, weiter untersucht werden. Bronchosphären könnten ein nützliches Modell darstellen, um diesen Fragestellungen weiter nachzugehen. Darüber hinaus könnten Schnittstellen identifiziert werden, an denen mittels Pharmakotherapie modulierend eingegriffen werden kann. Die Versuchsdauer für längere Beobachtungen könnte in zukünftigen Studien ebenfalls erhöht werden. Nikolić et al. zeigten beispielsweise eine Möglichkeit die Organoiden zu passagieren und damit die Kultivierungsdauer zu erhöhen [55]. Ein konkretes therapeutisches Ziel könnte die Basalzellendifferenzierung und die Mukushyperproduktion sein, um die Lungenfunktion bei CF oder COPD zu verbessern. Wie bereits gezeigt, könnten Forschungsansätze hierfür die Inhibition von TLR-, Inflammasom- oder Notch-Signalwegen mittels *small molecules* oder Antikörpern in humanen Bronchosphären sein [14,84]. Blohmke et al. zeigten eine verminderte proinflammatorische Reaktion durch Inhibition von TLR5 bei Infektion mit *P. aeruginosa* in CF-Atemwegsepithel. Dies könnte ein potenzieller therapeutischer Angriffspunkt sein. Es bestünde der Vorteil, dass nur die Immunantwort auf Flagellin geblockt würde, während die weiteren Immunmechanismen unbeeinflusst blieben [14].

Organoiden, wie in dem hier gezeigten Modell, bieten darüber hinaus Potenzial im Bereich der personalisierten Medizin. Atemwegsepithelzellen von chronisch lungenerkrankten Menschen können beispielsweise über eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) gewonnen, *in vitro* als Bronchosphären kultiviert werden, und es könnten konkret auf die vorliegende Pathophysiologie zugeschnittene Therapiemodelle getestet werden [68]. Es können die konkrete Variation der Erkrankung, der Fortschritt und das Ansprechen der Therapie berücksichtigt werden [79]. Im Falle der CF zeigten Berkers et al. beispielsweise ein Verfahren, wodurch mit rektalen Organoiden das Ansprechen auf CFTR-Modulatoren getestet werden

konnte [13]. Auch Organoide aus Atemwegsepithelzellen werden bereits genutzt, um CFTR-adressierende Wirkstoffe zu testen [73].

Hynds et al. beschrieben ein Paradigma zur Anwendung von Organoiden in der translationalen Medizin. Mittels einer aus einem Patienten oder einer Patientin gewonnenen Gewebeprobe können Organoide in hoher Zahl kultiviert werden. In hohem Durchsatz können Untersuchungen bezüglich Wirksamkeit und Toxizität einer Pharmakotherapie am Gewebe des entsprechenden Individuums *in vitro* durchgeführt werden. Dieses so gewonnene Wissen kann potenziell genutzt und in Form einer suffizienten Therapie unmittelbar angewandt werden [42]. Organoide können hiermit sowohl im Bereich der Grundlagenforschung als auch in der translationalen Forschung eingesetzt werden. Krankheiten können am Modell *in vitro* untersucht werden und es können Medikamenten-Screenings durchgeführt werden [10]. Ein perspektivisch denkbarer Nutzen von Organoiden wäre weiterhin ein Einsatz in der regenerativen Medizin, beispielsweise im Zusammenhang mit Organtransplantationen. Organoide sind neben der großen Annäherung an das Ursprungsgewebe trotz allem keine perfekten Imitationen. So fehlt in vielen Modellen, wie auch in dem hier vorliegenden, das umgebende Mesenchym [79]. Eine weitere Annäherung an die Bedingungen *in vivo* könnten weitere Studien liefern. Perspektivisch könnte das in der vorliegenden Arbeit angewandte Modell zunehmend Tierversuche ersetzen. Humane Atemwegsepithelzellen können aus Biopsien, Resektaten oder aus BALs gewonnen werden [68]. Die Verfügbarkeit wäre gegeben und eine stärkere Annäherung an die Bedingungen im humanen Epithel *in vivo* kann potenziell erreicht werden.

Abschließend lässt sich sagen, dass Bronchosphären eine geeignete Methode für die Erforschung chronischer Lungenerkrankungen darstellen. Sie könnten auch in Zukunft weitere Erkenntnisse über die Auswirkung anhaltender Infektionen auf das Atemwegsepithel liefern und als Grundlage für die Erforschung neuer Therapieansätze von chronischen Atemwegserkrankungen dienen.

7 Literaturverzeichnis

Literatur gem. Vorgaben der Medizinischen Fakultät der UdS.

1. Adam D, Roux-Delrieu J, Luczka E, Bonnomet A, Lesage J, Mérol JC, Polette M, Abély M, Coraux C (2015) Cystic fibrosis airway epithelium remodelling: Involvement of inflammation. *Journal of Pathology* 235:408–419
2. Adamo R, Sokol S, Soong G, Gomez MI, Prince A (2004) *Pseudomonas aeruginosa* flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30:627–634
3. Agarwal AK, Raja A, Brown BD (2021) *Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. Treasure Island (FL)
4. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783–801
5. Alcaraz J, Xu R, Mori H, Nelson CM, Mroue R, Spencer VA, Brownfield D, Radisky DC, Bustamante C, Bissell MJ (2008) Laminin and biomimetic extracellular elasticity enhance functional differentiation in mammary epithelia. *EMBO Journal* 27:2829–2838
6. Amatya N, Garg A V., Gaffen SL (2017) IL-17 Signaling: The Yin and the Yang. *Trends Immunol* 38:310–322
7. Bals R, Hiemstra PS (2004) Innate immunity in the lung: How epithelial cells fight against respiratory pathogens. *European Respiratory Journal* 23:327–333
8. Bals R, Beisswenger C, Blouquit S, Chinet T (2004) Isolation and air-liquid interface culture of human large airway and bronchiolar epithelial cells. *Journal of Cystic Fibrosis* 3:49–51
9. Barkauskas CE, Crouce MJ, Rackley CR, Bowie EJ, Keene DR, Stripp BR, Randell SH, Noble PW, Hogan BLM (2013) Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *Journal of Clinical Investigation* 123:3025–3036
10. Barkauskas CE, Chung MI, Fioret B, Gao X, Katsura H, Hogan BLM (2017) Lung organoids: Current uses and future promise. *Development (Cambridge)* 144:986–997
11. Beisswenger C, Lysenko ES, Weiser JN (2009) Early bacterial colonization induces toll-like receptor-dependent transforming growth factor β signaling in the epithelium. *Infect Immun* 77:2212–2220
12. Beisswenger C, Hess C, Bals R (2012) *Aspergillus fumigatus* conidia induce interferon- β signaling in respiratory epithelial cells. *European Respiratory Journal* 39:411–418

13. Berkers G, van Mourik P, Vonk AM, Kruisselbrink E, Dekkers JF, de Winter-de Groot KM, Arets HGM, Marck-van der Wilt REP, Dijkema JS, Vanderschuren MM, Houwen RHJ, Heijerman HGM, van de Graaf EA, Elias SG, Majoor CJ, Koppelman GH, Roukema J, Bakker M, Janssens HM, van der Meer R, Vries RGJ, Clevers HC, de Jonge HR, Beekman JM, van der Ent CK (2019) Rectal Organoids Enable Personalized Treatment of Cystic Fibrosis. *Cell Rep* 26:1701-1708.e3
14. Blohmke CJ, Victor RE, Hirschfeld AF, Elias IM, Hancock DG, Lane CR, Davidson AGF, Wilcox PG, Smith KD, Overhage J, Hancock REW, Turvey SE (2008) Innate Immunity Mediated by TLR5 as a Novel Antiinflammatory Target for Cystic Fibrosis Lung Disease. *The Journal of Immunology* 180:7764–7773
15. Boucher RC (2007) Airway surface dehydration in cystic fibrosis: Pathogenesis and therapy. *Annu Rev Med* 58:157–170
16. Chen Y, Garvin LM, Nickola TJ, Watson AM, Colberg-Poley AM, Rose MC (2014) IL-1 β induction of MUC5AC gene expression is mediated by CREB and NF- κ B and repressed by dexamethasone. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 306:797–807
17. Cholon DM, Gentsch M (2018) Recent progress in translational cystic fibrosis research using precision medicine strategies. *Journal of Cystic Fibrosis* 17:S52–S60
18. Cohen TS, Prince AS (2013) Activation of inflammasome signaling mediates pathology of acute *P. aeruginosa* pneumonia. *Journal of Clinical Investigation* 123:1630–1637
19. Dakhore S, Nayer B, Hasegawa K (2018) Human pluripotent stem cell culture: Current status, challenges, and advancement. *Stem Cells Int* 2018:
20. Danahay H, Pessotti AD, Coote J, Montgomery BE, Xia D, Wilson A, Yang H, Wang Z, Bevan L, Thomas C, Petit S, London A, LeMotte P, Doelemeyer A, Vélez-Reyes GL, Bernasconi P, Fryer CJ, Edwards M, Capodiecì P, Chen A, Hild M, Jaffe AB (2015) Notch2 is required for inflammatory cytokine-driven goblet cell metaplasia in the lung. *Cell Rep* 10:239–252
21. De Rose V, Molloy K, Gohy S, Pilette C, Greene CM (2018) Airway epithelium dysfunction in cystic fibrosis and COPD. *Mediators Inflamm* 2018:
22. Dickinson JD, Sweeter JM, Staab EB, Nelson AJ, Bailey KL, Warren KJ, Jaramillo AM, Dickey BF, Poole JA (2019) Myd88 controls airway epithelial Muc5ac expression during TLR activation conditions from agricultural organic dust exposure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 316:L334–L347
23. Fitzgerald KA, Kagan JC (2020) Toll-like Receptors and the Control of Immunity. *Cell* 180:1044–1066

24. Fujisawa T, Velichko S, Thai P, Hung L-Y, Huang F, Wu R (2009) Regulation of Airway MUC5AC Expression by IL-1 β and IL-17A; the NF- κ B Paradigm . *The Journal of Immunology* 183:6236–6243
25. Ganesan S, Comstock AT, Sajjan US (2013) Barrier function of airway tract epithelium. *Tissue Barriers* 1:e24997
26. Garcíá SR, Deprez M, Lebrigand K, Cavard A, Paquet A, Arguel MJ, Magnone V, Truchi M, Caballero I, Leroy S, Marquette CH, Marcet B, Barbry P, Zaragosi LE (2019) Novel dynamics of human mucociliary differentiation revealed by single-cell RNA sequencing of nasal epithelial cultures. *Development (Cambridge)* 146:
27. Gjorevski N, Nelson CM (2010) Endogenous patterns of mechanical stress are required for branching morphogenesis. *Integrative Biology* 2:424–434
28. Gosden CM, Gosden JR (1984) Fetal abnormalities in cystic fibrosis suggest a deficiency in proteolysis of cholecystokinin. *Lancet* 2:541–546
29. Goss CH, Burns JL (2007) Exacerbations in cystic fibrosis· 1: Epidemiology and pathogenesis. *Thorax* 62:360–367
30. Greene CM, Carroll TP, Smith SGJ, Taggart CC, Devaney J, Griffin S, O’Neill SJ, McElvaney NG (2005) TLR-Induced Inflammation in Cystic Fibrosis and Non-Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells. *The Journal of Immunology* 174:1638–1646
31. Guillot L, Le Goffic R, Bloch S, Escriou N, Akira S, Chignard M, Si-Tahar M (2005) Involvement of Toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus. *Journal of Biological Chemistry* 280:5571–5580
32. Hajj R, Lesimple P, Nawrocki-Raby B, Birembaut P, Puchelle E, Coraux C (2007) Human airway surface epithelial regeneration is delayed and abnormal in cystic fibrosis. *J Pathol* 211:340–350
33. Hartl D, Gaggar A, Bruscia E, Hector A, Marcos V, Jung A, Greene C, McElvaney G, Mall M, Döring G (2012) Innate immunity in cystic fibrosis lung disease. *Journal of Cystic Fibrosis* 11:363–382
34. Hartl D, Tirouvanziam R, Laval J, Greene CM, Habel D, Sharma L, Yildirim AÖ, Dela Cruz CS, Hogaboam CM (2018) Innate Immunity of the Lung: From Basic Mechanisms to Translational Medicine. *J Innate Immun* 10:487–501
35. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410:1099–1103

36. Hess C, Herr C, Beisswenger C, Zakharkina T, Schmid RM, Bals R (2010) Myeloid RelA regulates pulmonary host defense networks. *European Respiratory Journal* 35:343–352
37. Hiemstra PS, McCray PB, Bals R (2015) The innate immune function of airway epithelial cells in inflammatory lung disease. *European Respiratory Journal* 45:1150 LP – 1162
38. Hiemstra PS, Amatngalim GD, Van Der Does AM, Taube C (2016) Antimicrobial peptides and innate lung defenses: Role in infectious and noninfectious lung diseases and therapeutic applications. *Chest* 149:545–551
39. Hild M, Jaffe AB (2016) Production of 3-D airway organoids from primary human airway basal cells and their use in high-throughput screening. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 2016:IE.9.1-IE.9.15
40. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Paré PD (2004) The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 350:2645–2653
41. Honko AN, Mizel SB (2005) Flagella structure and role in pathogenesis effects of flagellin on innate and adaptive immunity. *Immunol Res* 33:83–101
42. Hynds RE, Giangreco A (2013) Concise review: The relevance of human stem cell-derived organoid models for epithelial translational medicine. *Stem Cells* 31:417–422
43. Kawai T, Akira S (2011) Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity* 34:637–650
44. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* (1979) 245:1073 LP – 1080
45. Koller B, Bals R, Roos D, Korting HC, Griese M, Hartl D (2009) Innate immune receptors on neutrophils and their role in chronic lung disease. *Eur J Clin Invest* 39:535–547
46. Lancaster MA, Knoblich JA (2014) Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. *Science* (1979) 345:
47. Matsui H, Grubb BR, Tarran R, Randell SH, Gatzky JT, Davis CW, Boucher RC (1998) Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell* 95:1005–1015
48. Matsui H, Wagner VE, Hill DB, Schwab UE, Rogers TD, Button B, Taylor 2nd RM, Superfine R, Rubinstein M, Iglewski BH, Boucher RC (2006) A physical linkage between cystic fibrosis airway surface dehydration and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:18131–18136

49. McClure R, Massari P (2014) TLR-dependent human mucosal epithelial cell responses to microbial pathogens. *Front Immunol* 5:1–13
50. McIsaac SM, Stadnyk AW, Lin T-J (2012) Toll-like receptors in the host defense against *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infection and cystic fibrosis. *J Leukoc Biol* 92:977–985
51. Miao EA, Mao DP, Yudkovsky N, Bonneau R, Lorang CG, Warren SE, Leaf IA, Aderem A (2010) Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:3076–3080
52. Mohamed F Ben, Garcia-Verdugo I, Medina M, Balloy V, Chignard M, Ramphal R, Touqui L (2012) A crucial role of flagellin in the induction of airway mucus production by *pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 7:
53. Montoro DT, Haber AL, Biton M, Vinarsky V, Lin B, Birket SE, Yuan F, Chen S, Leung HM, Villoria J, Rogel N, Burgin G, Tsankov AM, Waghray A, Slyper M, Waldman J, Nguyen L, Dionne D, Rozenblatt-Rosen O, Tata PR, Mou H, Shivaraju M, Bihler H, Mense M, Tearney GJ, Rowe SM, Engelhardt JF, Regev A, Rajagopal J (2018) A revised airway epithelial hierarchy includes CFTR-expressing ionocytes. *Nature* 560:319–324
54. Muir R, Osbourn M, Dubois A V., Doran E, Small DM, Monahan A, O’Kane CM, McAllister K, Fitzgerald DC, Kissenpfennig A, McAuley DF, Ingram RJ (2016) Innate lymphoid cells are the predominant source of IL-17A during the early pathogenesis of acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 193:407–416
55. Nikolić MZ, Caritg O, Jeng Q, Johnson JA, Sun D, Howell KJ, Brady JL, Laresgoiti U, Allen G, Butler R, Zilbauer M, Giangreco A, Rawlins EL (2017) Human embryonic lung epithelial tips are multipotent progenitors that can be expanded in vitro as long-term self-renewing organoids. *Elife* 6:1–33
56. Ornoy A, Arnon J, Katznelson D, Granat M, Caspi B, Chemke J (1987) Pathological confirmation of cystic fibrosis in the fetus following prenatal diagnosis. *Am J Med Genet* 28:935–947
57. Parker D, Prince A (2011) Innate immunity in the respiratory epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45:189–201
58. Pfeifer P, Voss M, Wonnenberg B, Hellberg J, Seiler F, Lepper PM, Bischoff M, Langer F, Schäfers HJ, Menger MD, Bals R, Beisswenger C (2013) IL-17C is a mediator of respiratory epithelial innate immune response. *Am J Respir Cell Mol Biol* 48:415–421
59. Plasschaert LW, Žilionis R, Choo-wing R, Savova V, Knehr J, Roma G, Klein AM, Jaffe AB (2018) A single-cell atlas of the airway epithelium reveals the CFTR-rich pulmonary ionocyte. *Nature* 560:377–381

60. Randell SH (2006) Airway epithelial stem cells and the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 3:718–725
61. Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, Alon NOA, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok SI, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: Cloning and characterization of complementary DNA. *Science* (1979) 245:1066–1073
62. Ritzmann F, Brand M, Sprott R, Langer F, Tschernig T, Bals R, Beisswenger C (2020) Mitotically inactivated 3T3-J2 feeder cells support the differentiation of 3D bronchospheres. *European Respiratory Journal* 56:1903
63. Rock JR, Onaitis MW, Rawlins EL, Lu Y, Clark CP, Xue Y, Randell SH, Hogan BLM (2009) Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:12771–12775
64. Rock JR, Randell SH, Hogan BLM (2010) Airway basal stem cells: A perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling. *DMM Disease Models and Mechanisms* 3:545–556
65. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem BS, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, Zsiga M, Buchwald M, Riordan JR, Tsui LC, Collins FS (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: Chromosome walking and jumping. *Science* (1979) 245:1059–1065
66. Rossi E, La Rosa R, Bartell JA, Marvig RL, Haagenen JAJ, Sommer LM, Molin S, Johansen HK (2021) *Pseudomonas aeruginosa* adaptation and evolution in patients with cystic fibrosis. *Nat Rev Microbiol* 19:331–342
67. Rossi G, Manfrin A, Lutolf MP (2018) Progress and potential in organoid research. *Nat Rev Genet* 19:671–687
68. Sachs N, Papaspyropoulos A, Zomer-van Ommen DD, Heo I, Böttinger L, Klay D, Weeber F, Huelsz-Prince G, Iakobachvili N, Amatngalim GD, Ligt J, Hoeck A, Proost N, Viveen MC, Lyubimova A, Teeven L, Derakhshan S, Korving J, Begthel H, Dekkers JF, Kumawat K, Ramos E, Oosterhout MF, Offerhaus GJ, Wiener DJ, Olimpio EP, Dijkstra KK, Smit EF, Linden M, Jaksani S, Ven M, Jonkers J, Rios AC, Voest EE, Moorsel CH, Ent CK, Cuppen E, Oudenaarden A, Coenjaerts FE, Meyaard L, Bont LJ, Peters PJ, Tans SJ, Zon JS, Boj SF, Vries RG, Beekman JM, Clevers H (2019) Long-term expanding human airway organoids for disease modeling. *EMBO J* 38:1–20
69. Schmiedl A, Kerber-Momot T, Munder A, Pabst R, Tschernig T (2010) Bacterial distribution in lung parenchyma early after pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Cell Tissue Res* 342:67–73

70. Schütz C, Ho DK, Hamed MM, Abdelsamie AS, Röhrig T, Herr C, Kany AM, Rox K, Schmelz S, Siebenbürger L, Wirth M, Börger C, Yahiaoui S, Bals R, Scrima A, Blankenfeldt W, Horstmann JC, Christmann R, Murgia X, Koch M, Berwanger A, Loretz B, Hirsch AKH, Hartmann RW, Lehr CM, Empting M (2021) A New PqsR Inverse Agonist Potentiates Tobramycin Efficacy to Eradicate *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Advanced Science* 2004369:1–12
71. Seiler F, Hellberg J, Lepper PM, Kamyschnikow A, Herr C, Bischoff M, Langer F, Schäfers H-J, Lammert F, Menger MD, Bals R, Beisswenger C (2013) FOXO Transcription Factors Regulate Innate Immune Mechanisms in Respiratory Epithelial Cells. *The Journal of Immunology* 190:1603–1613
72. Sethi S (2010) Infection as a comorbidity of COPD. *European Respiratory Journal* 35:1209–1215
73. Sette G, Cicero S Lo, Blaçonà G, Pierandrei S, Bruno SM, Salvati V, Castelli G, Falchi M, Fabrizzi B, Cimino G, De Maria R, Biffoni M, Eramo A, Lucarelli M (2021) Theratyping cystic fibrosis in vitro in ALI culture and organoid models generated from patient-derived nasal epithelial conditionally reprogrammed stem cells. *European Respiratory Journal* 58:
74. Shaykhiev R, Otaki F, Bonsu P, Dang DT, Teater M, Strulovici-Barel Y, Salit J, Harvey BG, Crystal RG (2011) Cigarette smoking reprograms apical junctional complex molecular architecture in the human airway epithelium in vivo. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68:877–892
75. Shaykhiev R (2019) Emerging biology of persistent mucous cell hyperplasia in COPD. *Thorax* 74:4–6
76. Steven M. Rowe, M.D., Stacey Miller, B.S., and Eric J. Sorscher MD (2000) Cystic fibrosis Cystic fibrosis. *Center for Disease Control* 196:1–6
77. Tan Y, Zanoni I, Cullen TW, Goodman AL, Kagan JC (2015) Mechanisms of Toll-like Receptor 4 Endocytosis Reveal a Common Immune-Evasion Strategy Used by Pathogenic and Commensal Bacteria. *Immunity* 43:909–922
78. Trinh NTN, Privé A, Maillé E, Noël J, Brochiero E (2008) EGF and K⁺ channel activity control normal and cystic fibrosis bronchial epithelia repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295:L866-80
79. Vaart J van der, Clevers H (2020) Airway Organoids as model for human diseases. *J Intern Med* 1–52
80. Vladar EK, Bayly RD, Sangoram AM, Scott MP, Axelrod JD (2012) Microtubules enable the planar cell polarity of airway cilia. *Current Biology* 22:2203–2212
81. Weitnauer M, Mijošek V, Dalpke AH (2016) Control of local immunity by airway epithelial cells. *Mucosal Immunol* 9:287–298

82. Wolf L, Herr C, Niederstraßer J, Beisswenger C, Bals R (2017) Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) maintains pulmonary structure and regulates the response to cigarette smoke. *PLoS One* 12:1–17
83. Wonnenberg B, Jungnickel C, Honecker A, Wolf L, Voss M, Bischoff M, Tschernig T, Herr C, Bals R, Beisswenger C (2016) IL-17A attracts inflammatory cells in murine lung infection with *P. aeruginosa*. *Innate Immun* 22:620–625
84. Wu Y, Cain-Hom C, Choy L, Hagenbeek TJ, De Leon GP, Chen Y, Finkle D, Venook R, Wu X, Ridgway J, Schahin-Reed D, Dow GJ, Shelton A, Stawicki S, Watts RJ, Zhang J, Choy R, Howard P, Kadyk L, Yan M, Zha J, Callahan CA, Hymowitz SG, Siebel CW (2010) Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors. *Nature* 464:1052–1057
85. Zacharias WJ, Frank DB, Zepp JA, Morley MP, Alkhaleel FA, Kong J, Zhou S, Cantu E, Morrissey EE (2018) Regeneration of the lung alveolus by an evolutionarily conserved epithelial progenitor. *Nature* 555:251–255
86. Zhang Z, Louboutin J, Weiner DJ, Goldberg JB, Wilson JM (2005) Human Airway Epithelial Cells Sense *Pseudomonas aeruginosa* Infection via Recognition of Flagellin by Toll-Like Receptor 5. *Society* 73:7151–7160
87. Zhao Y, Yang J, Shi J, Gong YN, Lu Q, Xu H, Liu L, Shao F (2011) The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature* 477:596–602

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Differenzierung von Becherzellen und Zilienzellen über Keulenzellen	S. 7
Abbildung 2:	Histologischer Aufbau von Bronchosphären	S. 10
Abbildung 3:	Verteilungsmuster der Bronchosphären innerhalb von histologischen Ausgießformen	S. 17
Abbildung 4:	Einbettungsversuche zur Verminderung des Verteilungsvolumens der Bronchosphären	S. 18
Abbildung 5:	Einbettung der Bronchosphären	S. 19
Abbildung 6:	Mikroskopie von Bronchosphären.	S. 24
Abbildung 7:	Flagellin führt zu einer signifikanten Verminderung der Bildung von Bronchosphären mit schlagenden Zilien in der Phasenkontrastmikroskopie	S. 25
Abbildung 8:	Flagellin führt zu einer signifikanten Verminderung der Bildung von Bronchosphären mit histologisch sichtbaren Zilien	S. 26
Abbildung 9:	Flagellin führt zu einer leichten Verminderung der Ausbildung von Lumina	S. 27
Abbildung 10:	Flagellin führt zu einer signifikant verminderten Bildung von Bronchosphären mit Lumen	S. 28
Abbildung 11:	Flagellin und Pam3CSK4 führen zu einer gesteigerten Bildung von MUC5B in Bronchosphären	S. 29 - 31
Abbildung 12:	Flagellin führt zu einer gesteigerten Bildung von MUC5AC in Bronchosphären	S. 32
Abbildung 13:	PAMPs führen zu keiner signifikanten Veränderung des Größenzwachstums von Bronchosphären	S. 33

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht der verwendeten Geräte	S. 13
Tabelle 2:	Übersicht der verwendeten Software	S. 13
Tabelle 3:	Übersicht der verwendeten Kulturmedien und Lösungen	S. 14
Tabelle 4:	Übersicht der verwendeten PAMPs	S. 16

10 Vorträge und Publikationen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen der folgenden Publikationen veröffentlicht.

Sprott RF, Ritzmann F, Langer F, Herr C, Bals R, Beisswenger C (Berlin, 29. – 30. November 2019)

Flagellin modulates the differentiation of 3D bronchospheres

Vortrag im Rahmen der Herbsttagung 2019 der Sektion Zellbiologie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V.

Sprott RF, 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 21:1–6

Yiwen Yao, Richard F. Sprott, Felix Ritzmann, Alexander Grißmer, Frank Langer, Christian Herr, Carola Meier, Robert Bals, Christoph Beisswenger, Thomas Tschernig

Human bronchospheres – A mirror of bronchiolar surfaces?

Translational Research in Anatomy 26 (2022) 100169

Felix Ritzmann, Richard Sprott, Frank Langer, Christian Herr, Thorsten Lehr, Thomas Tschernig, Robert Bals and Christoph Beisswenger.

Toll-like receptor signaling regulates the differentiation of 3D bronchospheres

Lung science conference der European Respiratory Society in Estoril, Portugal, 2020. Präsentiert von Felix Ritzmann, mit Posterpreis ausgezeichnet.

Felix Ritzmann, Richard Sprott, Frank Langer, Thorsten Lehr, Thomas Tschernig, Robert Bals, and Christoph Beisswenger.

Flagellin modulates the differentiation of 3D bronchospheres

Symposium 3R-Forschungsförderung des BMBF, Berlin 2019. Präsentiert von Christoph Beisswenger.

11 Danksagung

Vielmals bedanke ich mich bei Prof. Dr. Beisswenger für die Bereitstellung des Themas und die Supervision sowie Betreuung meiner Arbeit.

Bei Prof. Dr. Dr. Bals bedanke ich mich für die Bereitstellung des Themas, die wohlwollende Förderung und die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe zum Zwecke der Promotionsarbeit.

Dr. Felix Ritzmann danke ich herzlich für die ausgesprochen hilfsbereite und freundliche Betreuung des Projektes, für die technische Unterstützung bei den Versuchen, die Isolation der primären Atemwegsepithelzellen und die Immunhistochemie.

Andreas Kamyschnikow danke ich für die Paraffineinbettungen, Erstellung der Paraffinschnitte, HE-Färbungen sowie die technische Unterstützung und Ratschläge.

Anja Honecker danke ich für die Bestellung und Organisation der benötigten Materialien und Lösungen.

Der gesamten AG Bals möchte ich außerdem für die freundliche und unterstützende Zusammenarbeit danken.

PD Dr. Frank Langer aus der Klinik für Thorax- und Herz-Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes danke ich für die Bereitstellung der Lungenresektate.

Bei Prof. Dr. Thomas Tschernig und dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität des Saarlandes bedanke ich mich für die Elektronenmikroskopie.

Mein Dank gilt außerdem dem Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes für die Paraffineinbettungen.

Abschließend danke ich Dr. Henry Danahay der University of Sussex, welcher mir sein Protokoll zur Kultivierung humaner Bronchosphären zur Verfügung stellte.

Tag der Promotion: 18.12.2023
Dekan: Prof. Dr. M. D. Menger
Berichterstatter: Prof. R. Bals
Prof. G. Krasteva-Christ