

Aus dem Bereich Innere Medizin V – Pneumologie

Theoretische Medizin und Biowissenschaften

der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes,

Homburg/Saar

**Nicht typisierbarer *Haemophilus influenzae* unterdrückt die Expression  
von Surfactant Protein B und Surfactant Protein C in alveolären  
Epithelzellen vom Typ II**

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

**2024**

vorgelegt von: Hannah Sophie Stodden

geb. am: 09.03.1997 in Saarbrücken

### **Erklärung gemäß § 7 Abs. 1 'r. 4**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich/entgeltlich geholfen:

1. Prof. Dr. Christoph Beisswenger: Bereitstellung des Themas, Betreuung der Doktorarbeit, Ratschläge bei wissenschaftlichen Fragestellungen
2. Prof. Dr. Dr. Robert Bals: Bereitstellung des Themas und Supervision des Projekts
3. Dr. Felix Ritzmann: Hilfestellung bei Präparation, Einarbeitung in die Isolationstechnik von alveolaren Epithelzellen, sowie Zellkultur und molekularbiologische Arbeitsweisen, Ratschläge bei wissenschaftlichen Fragestellungen
4. Anja Honecker: Tierhaltung, Hilfestellung bei der Durchführung von ELISA

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater/innen oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe. Vor Aufnahme der vorstehenden Versicherung an Eides Statt wurde ich über die Bedeutung einer eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung belehrt.

Ort, Datum

Unterschrift der/des Promovierenden

Unterschrift der die Versicherung an Eides statt aufnehmenden Beamtin bzw. des aufnehmenden Beamten

Teilergebnisse der hier vorliegenden Arbeit wurden bereits vorab veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht:

Vella G, Ritzmann F, Wolf L, Kamyschnikov A, **Stodden H**, Herr C, Slevogt H, Bals R, Beisswenger C. IL-17C contributes to NTHi-induced inflammation and lung damage in experimental COPD and is present in sputum during acute exacerbations. PLoS One. 2021 Jan 7;16(1):e0243484. doi: 10.1371/journal.pone.0243484. PMID: 33411748; PMCID: PMC7790230.

**Stodden H**, Ritzmann F, Herr C, Bals R, Beisswenger C (11. März 2021). “Nontypeable Haemophilus influenzae suppresses SP-B and SP-C expression in alveolar epithelial type II cells” 19<sup>th</sup> Lung Science Conference der European Respiratory Society.

# Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung: Nicht typisierbarer Haemophilus influenzae unterdrückt die Expression von Surfactant Protein B und Surfactant Protein C in alveolären Epithelzellen vom Typ II.....	3
2. Summary: Non-typable Haemophilus influenzae suppresses the expression of Surfactant protein B and Surfactant protein C in type II alveolar epithelial cells .....	5
3. Einleitung .....	7
3.1. Epithelien der Lunge .....	7
3.2. Erkrankungen der Lunge .....	8
3.3. Air-Liquid-Interface Kulturen .....	10
3.4. Angeborenes Immunsystem und Epithelien .....	12
3.5. Lungenregeneration und DKK3 .....	13
4. Fragestellung .....	16
5. Material und Methodik .....	17
5.1. Materialien und Geräte .....	17
5.1.1. Geräte und Materialien .....	17
5.1.2. Chemikalien, Kits und Reagenzien .....	17
5.1.3. Puffer, Lösungen und Kulturmedien .....	19
5.1.4. Primer für PCR.....	20
5.1.5. Mäuse .....	21
5.2. Methoden.....	21
5.2.1. Isolation muriner alveolarer Epithelzellen .....	21
5.2.2. Kultivierung und Stimulation der Zellen.....	22
5.2.3. NTHi-Lösung .....	23
5.2.4. Messung des Widerstands .....	23
5.2.5. RNA-Isolation und Umschreibung.....	24
5.2.6. Quantitative Real Time PCR.....	25
5.2.7. ELISA .....	26
5.2.8. Statistik.....	26
6. Ergebnisse .....	27
6.1. Stimulation mit NTHi führt zu einer verminderten Expression von Pneumozyten-Markern.....	27
6.2. Die Defizienz von DKK3 führt zu einer verminderten epithelialen Barriere.....	32
6.3. Einfluss von p53-Aktivator und p53-Inhibitor auf Lungenepithelzellen .....	34
7. Diskussion .....	37
7.1. Exposition mit NTHi beeinflusst die Ausbildung der epithelialen Barriere.....	37

7.2.	Exposition mit NTHi vermindert die epitheliale Barriere und Expression von Typ 2 Markern in differenzierten Epithelzellen .....	39
7.3.	Aus DKK3-defizienten Mäusen isolierte epitheliale Zellen bilden eine verminderte epitheliale Barriere aus.....	39
8.	Ausblick.....	41
9.	Literaturverzeichnis.....	42
10.	Abkürzungsverzeichnis .....	50
11.	Abbildungsverzeichnis .....	52
12.	Tabellenverzeichnis.....	52
13.	Danksagung.....	53
14.	Lebenslauf.....	54

## 1. Zusammenfassung: Nicht typisierbarer *Haemophilus influenzae* unterdrückt die Expression von Surfactant Protein B und Surfactant Protein C in alveolären Epithelzellen vom Typ II

Weltweit leiden Millionen Menschen unter chronischen Erkrankungen der Lunge, wie der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) oder der Mukoviszidose. Gekennzeichnet sind diese unheilbaren Erkrankungen durch einen langjährigen Verlauf mit intermittierend akuten Exazerbationen, meist ausgelöst durch virale oder bakterielle Erreger. Aufgrund der chronischen Entzündung kommt es langfristig zu Veränderungen und Umbauten des Lungenepithels. Durch die geschwächte Immunabwehr in der Lunge werden chronische bakterielle Besiedlungen, häufig mit Non-Typeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) und *Pseudomonas aeruginosa*, begünstigt, was den Krankheitsverlauf negativ beeinflusst.

In der Lunge wird NTHi hauptsächlich über die Toll-like-Rezeptoren TLR2 und TLR4 erkannt. Diese Mustererkennungsrezeptoren (Pattern Recognition Receptors, PRRs) setzen bei Kontakt mit Pathogenen Signalkaskaden in Gang, in deren Verlauf zahlreiche Entzündungsmediatoren freigesetzt und die zelluläre Immunabwehr aktiviert wird. Auch ein Einfluss von PRRs auf die epithelialen Barrieren der Lunge, die Teil der pulmonalen Immunabwehr sind, ist wahrscheinlich. So gibt es Hinweise, dass die Aktivierung epithelialer Stamm- bzw. Vorläuferzellen über PRRs deren Regeneration und Differenzierung beeinflusst.

In den letzten Jahren konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass bei der Regeneration und Differenzierung von Pneumozyten der Wnt (wingless und Int-1) -Signalweg eine bedeutende Rolle spielt. Dickkopf 3 (DKK3) gehört zu der Familie der Dickkopf-Glykoproteine, die bei der Regulation des Wnt-Signalwegs Einfluss haben. Durch welche genauen molekularen Mechanismen die Aktivität von DKK3 reguliert wird, welchen Einfluss DKK3 auf die Regeneration der Lunge, und damit auch auf den Verlauf chronischer Lungenerkrankungen hat, ist bisher nicht bekannt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von NTHi auf die Differenzierung von murinen alveolaren Pneumozyten zu untersuchen. Weiterhin wurde die Bedeutung von TLR2/4 und DKK3 bei der Regeneration und Differenzierung des Lungenepithels betrachtet.

Primäre Alveolarepithelzellen wurden aus Wildtypmäusen, Mäusen defizient für TLR2/4 und Mäusen defizient für DKK3 isoliert und in Transwells kultiviert. 48 Stunden später wurde ein Airlift durchgeführt, um Air-Liquid-Interface (ALI) Kulturen zu erhalten. In diesen Kulturen haben die Epithelzellen sowohl Kontakt zur Luft als auch zur Flüssigkeit, wodurch, im Vergleich zu herkömmlichen Zellkulturen, die Epithelzellen der Atemwege in-vitro wesentlich besser nachgebildet und erforscht werden können. Die kultivierten Zellen wurden zum Zeitpunkt des Airlifts oder 24 Stunden nach dem Airlift mit NTHi stimuliert. Der transepitheliale elektrische Widerstand (transepithelial electrical resistance, TEER), die Expression von Differenzierungsmarkern und die Zytokinfreisetzung wurden gemessen.

Stimulation mit NTHi am Tag des Airlifts resultierte in einem signifikant erhöhten TEER, sowie einer verminderten Expression von Surfactant Protein B und Surfactant Protein C, Marker für Typ 2 Alveolarzellen. Auch die Expression der Typ 1 Alveolarzellmarker Hopx und Aquaporin 5, sowie Claudin 18, das entscheidend für die Ausbildung von Tight Junctions in Typ 1 Zellen ist, waren vermindert. Dieser Effekt war unabhängig von TLR2/4. Jedoch kam es bei TLR2/4 defizienten Kulturen zu einer verminderten Freisetzung des inflammatorischen Zytokins Keratinocyt-Derived Chemokine (KC). Wurden die Zellen erst 24 Stunden nach Airlift mit NTHi stimuliert, kam es zur Ausbildung eines verminderten TEER. Auch die Expression von Surfactant Protein B, Surfactant Protein C und auch Hopx war vermindert. Hierbei zeigte sich jedoch kein Unterschied in der Expression von Tight-Junction Markern. In den Kulturen aus *Dkk3*<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde ein signifikant verminderter TEER gemessen, jedoch kein Unterschied nach Stimulation mit NTHi.

Durch die vorliegende Arbeit konnte gezeigt werden, dass NTHi einen Einfluss auf die Ausbildung und Differenzierungsfähigkeit der epithelialen Barriere hat. Dieser Einfluss scheint unabhängig von TLR2/4 zu sein, wird jedoch durch das Vorhandensein von DKK3 beeinflusst. Zukünftige Studien müssen, unter anderem durch Verwendung moderner Methoden, wie Single-cell sequencing, zeigen, über welche zellulären Mechanismen Bakterien, bzw. das Mikrobiom, die Ausprägung epithelialer Stammzellen beeinflussen und welche Rolle dies bei chronischen Lungenerkrankungen, wie der COPD spielt. Das ALI-Regenerationsmodell kann auch genutzt werden, um den Einfluss verschiedener Wirkstoffe auf die epitheliale Barriere und Regeneration zu erforschen um neue Therapieansätze für chronische Lungenerkrankungen, wie die COPD oder die Mukoviszidose zu finden.

## **2. Summary: Non-typable *Haemophilus influenzae* suppresses the expression of Surfactant protein B and Surfactant protein C in type II alveolar epithelial cells**

Millions of people around the world suffer from chronic lung diseases such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD) or cystic fibrosis. These incurable diseases are characterised by a long-term course with intermittent acute exacerbations, usually triggered by viral or bacterial pathogens. The chronic inflammation leads to long-term modifications and remodelling of the lung epithelium. The weakened immune defence in the lungs favours chronic bacterial colonisation, commonly with non-typeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) and *Pseudomonas aeruginosa*, which has a negative impact on the progression of the disease.

In the lungs, NTHi is mainly recognised by the Toll-like receptors TLR2 and TLR4. Upon contact with pathogens, these pattern recognition receptors (PRRs) initiate signalling cascades during which numerous inflammatory mediators are released and the cellular immune defence is activated. It is also likely that PRRs influence the epithelial barriers of the lungs, which are part of the pulmonary immune defence. There is evidence that the activation of epithelial stem and progenitor cells via PRRs influences their regeneration and differentiation.

In recent years, various studies have shown that the Wnt (wingless and Int-1) signalling pathway plays an important role in the regeneration and differentiation of pneumocytes. Dickkopf 3 (DKK3) belongs to the family of Dickkopf glycoproteins, which are involved in the regulation of the Wnt - signalling pathway. The exact molecular mechanisms by which the activity of DKK3 is regulated and the influence of DKK3 on lung regeneration, and therefore on the course of chronic lung diseases, are not yet known.

The aim of the present study was to investigate the influence of NTHi on the differentiation of murine alveolar pneumocytes. Furthermore, the importance of TLR2/4 and DKK3 in the regeneration and differentiation of the lung epithelium was analysed.

Primary alveolar epithelial cells were isolated from wild-type mice, mice deficient for TLR2/4 and mice deficient for DKK3 and cultured in transwells. 48 hours later an airlift was performed to obtain air-liquid interface (ALI) cultures. In these cultures the epithelial cells are in contact with both air and liquid, which, compared to conventional cell cultures, allows the epithelial cells of the airways to be mimicked and researched much better in vitro. The cultured cells were stimulated with NTHi at the time of the airlift or 24 hours after the airlift. Transepithelial electrical resistance (TEER), expression of differentiation markers and cytokine release were measured.

Stimulation with NTHi on the day of the airlift resulted in a significantly increased TEER, as well as a reduced expression of surfactant protein B and surfactant protein C, marker for type 2 alveolar cells. The expression of the type 1 alveolar cell markers Hopx and aquaporin 5, as well as claudin



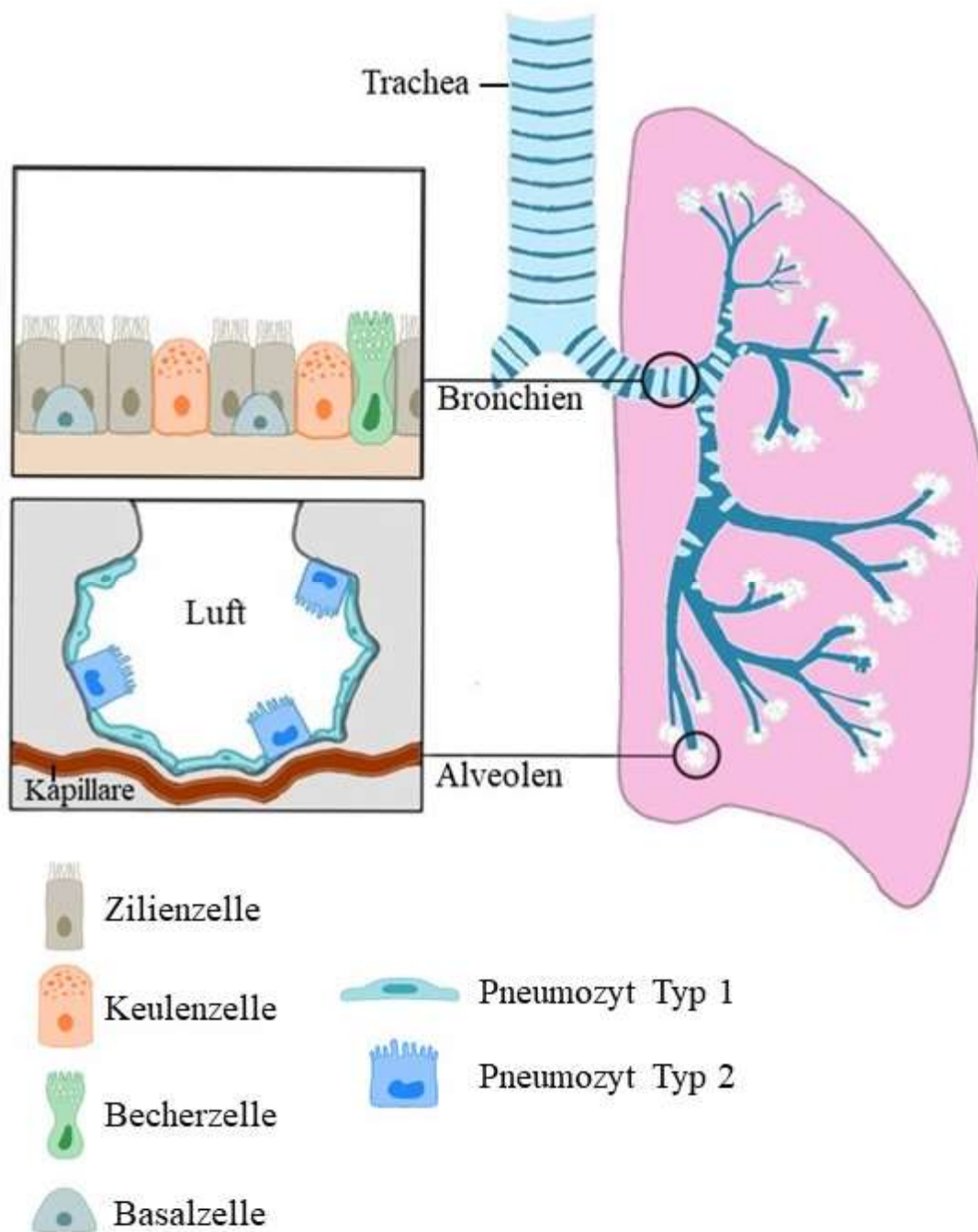
18, which is crucial for the formation of tight junctions in type 1 cells, was also reduced. This effect was independent of TLR2/4. But in TLR2/4-deficient cultures there was a reduced release of the inflammatory cytokine keratinocyte-derived chemokine (KC). If the cells were stimulated with NTHi only 24 hours after airlift, a reduced TEER was observed. The expression of surfactant protein B, surfactant protein C and Hopx was also reduced. However, there was no difference in the expression of tight junction markers. In the cultures from *Dkk3*<sup>-/-</sup> mice, a significantly reduced TEER was measured, but no difference after stimulation with NTHi.

The present study has shown that NTHi has an influence on the formation and differentiation capacity of the epithelial barrier. This influence appears to be independent of TLR2/4, but is influenced by the presence of DKK3. Future studies, including the use of modern methods such as single-cell sequencing, must show the cellular mechanisms by which bacteria or the microbiome influence the development of epithelial stem cells and what role this plays in chronic lung diseases such as COPD. The ALI regeneration model can also be used to investigate the influence of various active substances on the epithelial barrier and regeneration in order to find new therapeutic approaches for chronic lung diseases such as COPD or cystic fibrosis.

### 3. Einleitung

#### 3.1. Epithelien der Lunge

Der Respirationstrakt des Menschen ist aus einem Verzweigungssystem aufgebaut, bestehend aus Luftröhre, Bronchien, Bronchiolen und den Alveolen, in denen der eigentliche Gasaustausch stattfindet [47] (Abbildung 1). Ausgekleidet sind die Atemwege mit einem respiratorischen Flimmerepithel, bestehend aus den Basalzellen, mukussezernierenden Becherzellen und den namensgebenden Flimmerzellen. Darüber hinaus sind auch noch seltene Zellen, wie zum Beispiel Bürstenzellen zu finden. Tiefer in den Atemwegen kommen sogenannte Keulenzellen (= Club-Zellen, ehemals Clara-Zellen) hinzu [1,9,54]. Basalzellen fungieren als Stammzellen und können in Zilien-, Becher- und Keulenzellen differenzieren [37]. In der distalen Lunge befinden sich die Alveolen mit den Pneumozyten Typ 1, welche mit ihren großen Zellkörpern den größten Teil der epithelialen Oberfläche bilden. Sie sind maßgeblich an der Bildung der Blut-Luft-Schranke beteiligt und somit entscheidend für den pulmonalen Gasaustausch [35]. Die kubischen Pneumozyten Typ 2 produzieren den Surfactant, dieser senkt die Oberflächenspannung und verhindert so ein Kollabieren der Alveolen [9,15,38,54]. Bei Verletzungen des alveolaren Epithels oder zur Erhaltung der Homöostase können Pneumozyten Typ 2 mit Stammzelleigenschaften proliferieren und in Pneumozyten Typ 1 differenzieren [9,62,68]. Aber auch Keulenzellen können, zumindest in der Maus, zu Typ 2-artigen Zellen differenzieren [22,37].



**Abbildung 1: Aufbau der Epithelien der Lunge**

Die Atemwege sind ausgekleidet mit einem respiratorischen Flimmerepithel, unter anderem bestehend aus Zilienzellen, Keulenzellen, Becherzellen und Basalzellen. In den Alveolen finden sich die Pneumozyten Typ 1, die mit ihren großen Zelleibern maßgeblich an der Bildung der Blut-Luft-Schranke beteiligt sind, sowie die kubischen Pneumozyten Typ 2.

### 3.2. Erkrankungen der Lunge

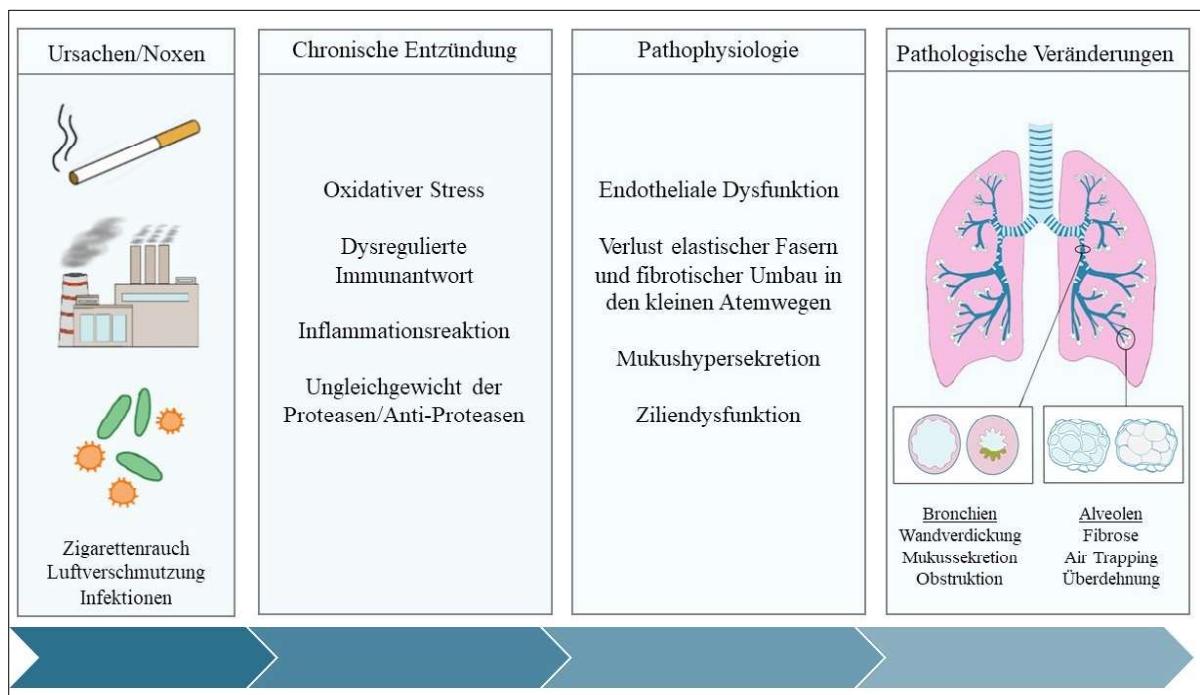
Zahlreiche Menschen auf der ganzen Welt leiden an Erkrankungen der Lunge oder deren Folgen. Im Jahr 2019 war laut WHO die dritthäufigste Todesursache weltweit die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD), gefolgt von infektiösen Erkrankungen, wie der Lungenentzündung. Todesfälle aufgrund von Krebserkrankungen der Lunge sind global die sechsthäufigste

Todesursache. In Ländern mit hohem Einkommen, beispielsweise Deutschland, verschieben sich die Häufigkeiten leicht, bei den Erkrankungen der Atemwege ist die Mortalität der Krebserkrankungen höher als die der COPD [77]. Lungenerkrankungen stellen aufgrund der alternden Gesellschaft und ihrer hohen finanziellen Belastung des Gesundheitssystems eine Herausforderung für die Zukunft dar [23,54]. COPD ist nur symptomatisch behandelbar, jedoch vermeidbar, da sie durch Inhalation von Schadstoffen hervorgerufen wird. Trotzdem wird erwartet, dass die Belastung durch die COPD in den kommenden Jahren noch steigen wird [26].

Die Pathogenese der COPD ist multifaktoriell bedingt. Eine zentrale Rolle spielt die chronische Entzündung der kleinen Atemwege, ausgelöst durch chronische Noxen, in Industrienationen hauptsächlich das Rauchen. Weitere Ursachen sind beispielsweise Luftverschmutzung durch das Arbeiten im Bergbau oder das Kochen auf offener Flamme in geschlossenen Räumen. Aus der Inhalation der Schadstoffe resultiert oxidativer Stress, freie Sauerstoffradikale begünstigen die Aktivierung von Immunzellen und fördern die chronische Entzündung über proinflammatorische Signalkaskaden [3]. Es kommt zur Rekrutierung von Neutrophilen, sowie eosinophilen Granulozyten, CD8+-Lymphozyten und Makrophagen [53]. Insbesondere bei jüngeren Patienten kann ein genetisch bedingter Alpha-1-Antitrypsinmangel vorliegen, der ein Risikofaktor für die COPD ist [25]. Beim Alpha-1-Antitrypsinmangel entsteht ein Ungleichgewicht aus Proteasen und Protease-Inhibitoren und eine dadurch bedingte Zerstörung des Lungenparenchyms [61]. Aber auch durch Entzündungszellen, wie Makrophagen und Granulozyten können Proteasen freigesetzt werden, woraus ebenfalls ein gestörtes Gleichgewicht der Proteasen und Anti-Proteasen resultiert [3]. Weitere Merkmale der COPD sind die Mukushypersekretion und die Obstruktion der Atemwege, die im Verlauf der Erkrankung durch den fibrotischen Umbau der Lunge, die mukoziliäre Dysfunktion und die Hyperreagibilität entstehen. Nach langjährigem chronischem Verlauf kann es zu Ausbildung eines Emphysems und systemischen Auswirkungen, unter anderem auf das Herz-Kreislauf-System kommen [25]. Die Remodellierung der Atemwege führt zu Zerstörung von Alveolarsepten, Einengung des Lumens durch Verdickung der Atemwegswände und schlussendlich einem erhöhten Druck im Gefäßsystem der Lunge [53]. Außerdem kommt es durch die alveoläre Hypoxie zu einer Vasokonstriktion und über einen längeren Zeitraum zu strukturellen Veränderungen im Gefäßbett der Lunge [42]. Das Auftreten einer Pulmonalen Hypertonie und damit einhergehendem Herzversagen bei COPD Patienten verkürzt das Überleben signifikant [8]. Eine Übersicht über die Pathophysiologie der COPD findet sich in Abbildung 2.

Durch virale oder bakterielle Infektionen kann es zu einer episodischen Verstärkung der Inflammation und Verschlechterung der klinischen Symptomatik kommen, dies nennt man eine akute Exazerbation [30]. Auch eine chronische mikrobielle Besiedlung der Lunge, begünstigt durch, das durch Noxen geschwächte Abwehrsystem der Lunge, ist kennzeichnend für die COPD [36]. *H. influenzae* ist ein gramnegatives kugelförmiges Bakterium, dass als kommensaler Organismus in

der nasopharyngealen Flora der meisten Menschen existiert. Einige Stämme bilden eine Polysaccharid-Kapsel aus, unbekapselte Stämme werden als Nicht-Typisierte-*H. Influenzae* (NTHi) zusammengefasst [57]. NTHi ist der Keim mit der größten klinischen Bedeutung, der aus Lungen von stabilen COPD-Patienten isoliert werden kann [36,57]. Die bakterielle Kolonisation der Lunge führt zu einer Verstärkung der Inflammation, Steigerung der Mukussekretion, gestörten Zilienfunktion und somit einer verminderten Funktion des pulmonalen Immunsystems, eine Abwärtsspirale entsteht [56]. Zudem kann NTHi auch bei akuten Exazerbation auslösend sein [30,36,57].



**Abbildung 2: Pathophysiologie der COPD**

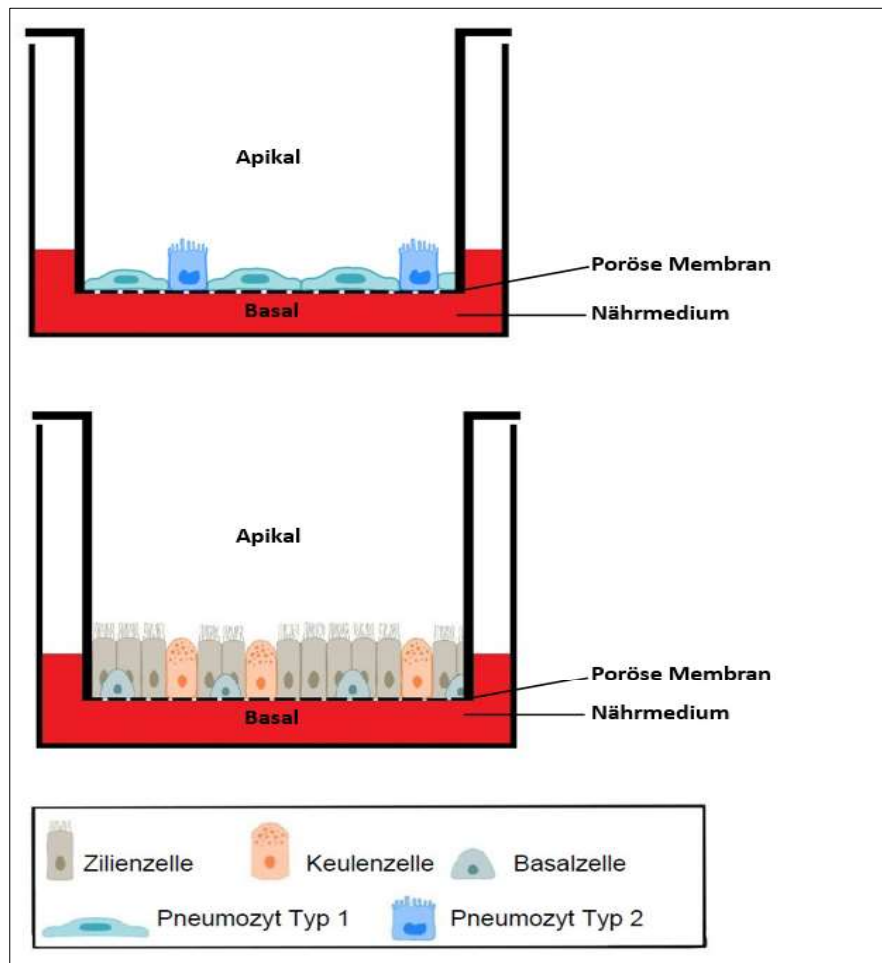
Noxen, insbesondere Zigarettenrauch, lösen durch den oxidativen Stress eine chronische Entzündung der Atemwege aus. Die Freisetzung von Mediatoren löst eine dysregulierte Immunantwort aus, welche letztendlich in endothelialer Dysfunktion und einem fibrotischem Umbau der Lunge, begleitet von Mukushypersekretion, resultiert. Im Verlauf kommt es zur Obstruktion der Atemwege und Überblähung der Alveolen.

### 3.3. Air-Liquid-Interface Kulturen

Das Lungenepithel ist mit seiner luminalen Seite in Kontakt mit der Luft. In sogenannten Air-Liquid-Interface (ALI) Kulturen kann humanes Bronchialepithel ex vivo in einer Art und Weise kultiviert werden, die der Situation im Organismus nahekommt. So können Basalzellen aus Lungenresektionen oder Bürstenabstrichen, die während einer bronchoalveolären Lavage gewonnen werden, in konventioneller Zellkultur vermehrt und folgend auf Transwells ausgebracht werden (Abbildung 3) [7,14]. In solchen Transwells haben die Zellen über eine Filtermembran Kontakt zum Nährmedium. Wird apikal, nachdem die Zellen die Membran vollständig bedecken, das Medium im Airlift entfernt, bildet sich ein differenziertes Flimmerepithel, indem Basal-, Becher- und

Zilienzellen unterschieden werden können. ALI Kulturen mit Bronchialepithel wurde in der Vergangenheit in zahlreichen Studien verwendet, die z.B. den Einfluss von Zigarettenrauch, Infektionen und Wirkstoffen auf das Atemwegsepithel adressierten [6]. Auch mit Zellen aus der Trachea der Maus können ALI Kulturen mit Atemwegsepithel kultiviert werden [2].

In den letzten Jahren wurden auch Protokolle zur Kultivierung von Pneumozyten in ALI Kulturen entwickelt, wobei für humane Pneumozyten keine überzeugenden Protokolle existieren. So bilden aus der Schweinelunge isolierte Epithelzellen auf Transwells innerhalb weniger Tage einen



**Abbildung 3: Aufbau der ALI Kulturen**

Das apikale Kompartiment ist durch eine poröse Filtermembran vom basalen Kompartiment getrennt. Zellen werden auf der Membran kultiviert und können so basolateral ernährt werden. Apikal stehen sie in Kontakt mit der Luft, wodurch im Gegensatz zu herkömmlicher Zellkultur die Imitation der Konstellationen in der Lunge möglich ist.

konfluenten Monolayer mit typischen Interzellularverbindungen (Tight Junctions) [69]. Die gebildete epitheliale Barriere ist zudem durch einen transepithelialen Widerstand von bis zu 2.000  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  und die Expression von Pneumozyten-Markern wie Surfactant Protein C gekennzeichnet [60].

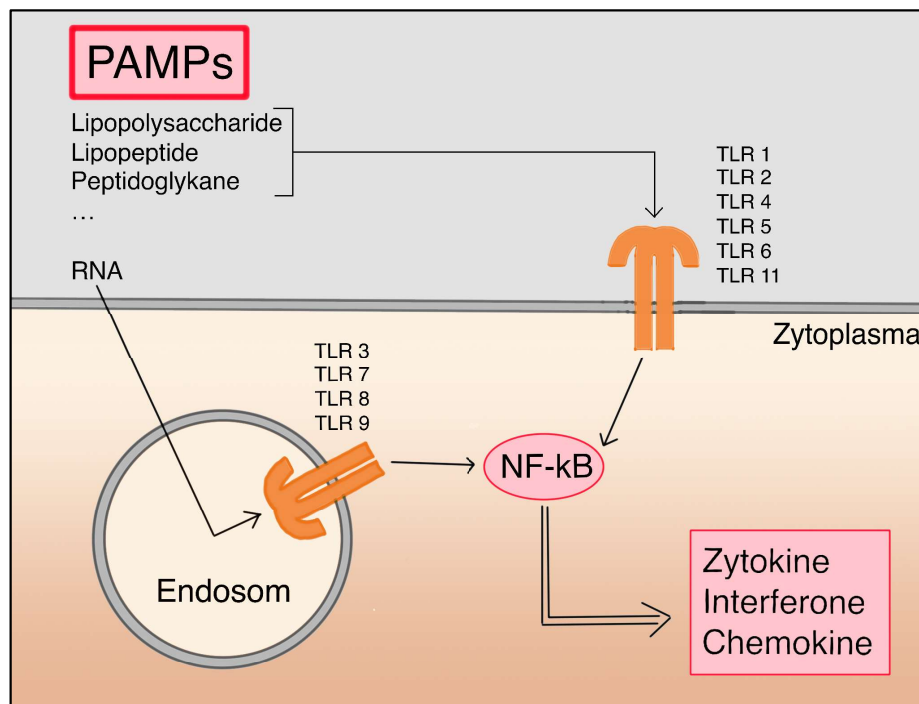
Dieses Modell kann z.B. für Transportstudien von Medikamenten genutzt werden. Basierend hierauf wurde ein Protokoll etabliert, das es erlaubt Zellen aus der distalen Lunge der Maus zu kultivieren. Wolf et al. zeigten, dass isolierte Lungenepithelzellen eine epitheliale Barriere bilden und

Pneumozyten-Marker wie Surfactant Protein C exprimieren. Dieses Modell wurde unter anderem genutzt um die Auswirkung der Defizienz des Rezeptors receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) auf die Bildung der epithelialen Barriere zu prüfen [74,75].

### **3.4. Angeborenes Immunsystem und Epithelien**

Das Immunsystem des Menschen hat die Aufgabe den Körper vor der schädigenden Wirkung von Mikroorganismen, Viren, fremden Proteinen, entarteten Zellen usw. zu bewahren. Man unterscheidet zwischen der angeborenen Immunabwehr und der erworbenen (adaptiven) Abwehr [47]. Das angeborene Immunsystem ist ab der Geburt sofort einsatzbereit. Es besteht aus mehreren Komponenten: Essenziell für das respiratorische Epithel ist die Barrierefunktion [38]. Sie wird durch enge Zellkontakte gebildet, sogenannte Tight Junctions. Sie bilden Proteinkomplexe (u.a. Claudine, Occludin, Zo-1 [67]), die die Dichte der epithelialen Barriere gewährleisten [73]. Unterstützt wird diese Barriere durch einen dünnen Schleimfilm, gebildet von Becherzellen und Drüsen, an denen Mikroorganismen und Schmutzpartikel haften bleiben [47]. Bei der mukoziliären Reinigung befördern die Kinozilien der Flimmerzellen diesen Schleim unaufhörlich zum Rachen, der dort abgehustet oder verschluckt wird [72]. Teil der angeborenen Immunabwehr sind auch lösliche Proteine, die zur Lyse und Opsonierung von Keimen beitragen (z.B. Lysozyme, Komplement) [64]. Wesentlicher Bestandteil der angeborenen Abwehr sind Entzündungszellen, vor allem Makrophagen und Granulozyten sind von Bedeutung [5,72]. Mithilfe von Mustererkennungsrezeptoren (=Pattern Recognition Receptors, PRRs) erkennen die Abwehrzellen, aber auch Strukturzellen wie Atemwegsepithelzellen, charakteristische Merkmale pathogener Keime, sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (=pathogen associated molecular patterns, PAMPs) [44]. Werden PAMPs über PRRs erkannt, wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, was in Epithelzellen zu einer vermehrten Bildung von Zytokinen (Tumor-Nekrose-Faktor etc.), Chemokinen, Muzinen und antibakteriellen Peptiden führt [50,72]. Solche Faktoren regulieren die Rekrutierung und Aktivierung von Entzündungszellen, wie Neutrophilen Granulozyten und setzen die adaptive Immunabwehr in Gang [38]. Bekannte Mustererkennungsrezeptoren sind die Toll-Like-Rezeptoren (TLRs). TLRs sind integrale Membranproteine, die auf der Zelloberfläche (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR11) oder in intrazellulären Vesikeln (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9) exprimiert werden [39]. Je nach Klasse können unterschiedliche Komponenten der Pathogene erkannt werden. So kann beispielsweise TLR4 Lipopolysaccharide gram-negativer Bakterien erkennen und TLR2 Lipoproteine und Peptidoglykane gram-positiver Bakterien, TLR3,

7 und 8 tragen zur Erkennung viraler Erreger bei, zudem können zytosolische Rezeptoren virale Bestandteile, wie RNA erkennen [31,39]. Eine Übersicht findet sich in Abbildung 4.



**Abbildung 4: Erkennung von PAMPs über den Mustererkennungsrezeptor TLR, nach [39,45]**

Toll-like-Rezeptoren werden auf der Zelloberfläche oder intrazellulär exprimiert und erkennen charakteristische Merkmale von Pathogenen, sogenannte PAMPs. Daraufhin wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die zur Aktivierung von Zytokinen, Interferonen und Chemokinen führt.

Die adaptive Immunabwehr wird im Laufe des Lebens erlernt und stetig verbessert. Aktiviert wird sie von antigenpräsentierenden Zellen, zum Beispiel Makrophagen oder dendritischen Zellen [47]. Teil der adaptiven Abwehr sind die B-Lymphozyten, die lösliche Antikörper bilden und Mikroben damit unschädlich machen (humorale Abwehr) wohingegen die T-Lymphozyten die zelluläre Immunabwehr bilden [47]. Es besteht ein komplexes Zusammenspiel von T-Helferzellen, deren Aufgabe die Erkennung eines Antigens ist, und zytotoxischen T-Zellen, welche den Erreger angreifen, sowie den B-Zellen [38].

### 3.5. Lungenregeneration und DKK3

In der jüngeren Vergangenheit beschäftigten sich zahlreiche Studien mit epithelialen Stammzellen und Vorläuferzellen des Respirationstrakts. Dabei zeigten Daten aus Single-cell Sequencing (Einzelzellanalysen), dass sich aus Basalzellen Keulenzellen entwickeln können. Aus diesen wiederum entstehen Becher- und Zilienzellen [41,49]. Im Parenchym der Lunge sind die Typ-II-Pneumozyten entscheidend für die Homoöstate und Regeneration der Lunge, insbesondere nach



einer Infektion oder Verletzungen [81]. Sie sind die Vorläuferzellen der Typ-I-Pneumozyten. Studien an Mäusen haben ergeben, dass bei einer schweren Schädigung der Lunge auch Keulenzellen, lokalisiert in den terminalen Bronchiolen, in Typ-2-Pneumozyten-ähnliche Zellen differenzieren können. Diese exprimieren charakteristische Typ-2-Pneumozytenmarker wie Surfactant. Ob sie bisher unerforschte Aufgaben bei der Regeneration und Reparatur des Lungengewebes übernehmen oder tatsächlich echte Typ-2-Pneumozyten sind, bleibt abzuwarten und wird in der Zukunft Gegenstand weiterer Forschung sein [12,29,51,58,62]. Einzelne Untersuchungen gaben Hinweise darauf, dass in den menschlichen Atemwegsbronchiolen sekretorische Epithelzellen als Vorläuferzellen für Typ-2-Pneumozyten fungieren könnten [10].

In den letzten Jahren adressierten verschiedene Studien, über welche Mechanismen die Regeneration von Pneumozyten reguliert und welche Rolle die Wechselwirkung mit Fibroblasten hier innehat. So konnte eine Funktion des Wnt (wingless and Int-1)/ $\beta$ -Catenin-Signalweges bei der Proliferation und Differenzierung von alveolaren Vorläuferzellen nachgewiesen werden. Im kanonischen Wnt-Signalweg vermitteln Wnt-Liganden über  $\beta$ -Catenin die Transkription von Zielgenen, während in nicht-kanonischen Wegen unabhängig von  $\beta$ -Catenin zelluläre Signalwege wie  $Ca^{2+}$ - oder MAP-Kinase-vermittelte Wege reguliert werden [55]. Frank et al. zeigten, dass die Aktivierung von Wnt-abhängigen Signalwegen während der Alveologenese die Proliferation von Typ II Pneumozyten anregt, wohingegen die Blockade von Wnt-Signalwegen zur Differenzierung zu Typ I Zellen führt [21]. Lee et al. zeigten im Mausmodell und mit 3D Organoiden, dass in der adulten Lunge spezifische mesenchymale Zellen Wnt-abhängig die Selbsterneuerung und Differenzierung von Typ II Zellen vermitteln [33]. Barkauskas et al. und Zacharias et al. publizierten Protokolle, die es erlauben, humane Typ II Vorläuferzellen zu isolieren und hieraus 3D Organoide bestehend aus Typ II und Typ I Pneumozyten zu differenzieren [9,81]. Auch in diesen Modellen führte die Aktivierung von Wnt zur Expansion von Typ II Pneumozyten und die Inhibierung von Wnt zur Differenzierung hin zu Typ I Pneumozyten [81]. Die Funktion von Wnt-Signalwegen wurde auch in murinen COPD-Modellen untersucht. Baarsma et al. zeigten in Rauch- und Elastase-abhängigen murinen COPD-Modellen und mittels der Analyse humaner Proben, dass WNT-5A nicht-kanonische Wnt-Signalwege aktiviert und dies zur Pathogenese der COPD beiträgt [4]. Diese Studien zeigen, dass die vorübergehende Aktivierung von Wnt-Signalwegen für die Entwicklung sowie den Erhalt der Integrität der Lunge von Bedeutung ist, eine fehlgeleitete Aktivierung des Wnt-Signalwegs aber auch zu Lungenschäden führen kann.

Dickkopf 3 (DKK3) gehört zu der Familie der Dickkopf (DKK) Glykoproteine (DKK1 bis 4), für die eine Funktion bei der Regulation von Wnt-Signalwegen beschrieben ist. Studien zeigten, dass DKK1, 2 und 4 den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Weg inhibieren, indem sie z.B. als Antagonisten direkt an LRP6 (Lipoprotein receptor-related protein 6), welches ein Bestandteil des Rezeptorkomplexes für Wnt-Liganden ist, binden und den Endozytose-abhängigen Abbau von LRP6 induzieren [55]. Die

Wirkung von DKK3, welches sich in seiner molekularen Masse und Ähnlichkeit in der Sequenz von den anderen DKK Proteinen unterscheidet, ist hingegen unklar. So induziert es nicht die Internalisation von LRP6 und zeigte sich kontextabhängig als Aktivator bzw. Antagonist des Wnt-Signalwegs [19,20,43,55,80]. Die molekularen Mechanismen, die der Aktivität von DKK3 zugrunde liegen, sowie die Rezeptoren für DKK3 sind unklar bzw. nicht bekannt [55]. Verschiedene Studien untersuchten die Funktion von DKK3 bei Nieren- und Tumorerkrankungen. Eine Arbeit von Ferrari et al. schlägt vor, dass die Expression von DKK3 in Tumor-assoziierten Fibroblasten mit der Aggressivität von Brust-, Darm- und Eierstockkrebs im Zusammenhang steht und dass DKK3 die tumorfördernde Funktion der Fibroblasten über Wnt-Signalwege reguliert. Es zeigte sich, dass DKK3 Wnt-Signalwege potenziert, indem es Kremen (Kringles containing transmembrane proteins), das Wnt-Signalwege negativ reguliert, destabilisiert [20]. Zhou et al. zeigten, dass DKK3 die Tumorprogression bei Pankreaskrebs über die Aktivierung von NF- $\kappa$ B fördert [83]. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass DKK3 Nierenfibrose vorantreibt [19,55]. Eine Funktion von DKK3 bei der Regeneration der Lunge und chronischen Lungenerkrankungen ist in der Literatur bisher nicht beschrieben.

#### **4. Fragestellung**

Bakterielle Infektionen sind maßgeblich am Verlauf chronischer Erkrankungen der Lunge wie der COPD und der Mukoviszidose beteiligt. Es stellt sich daher die Frage, inwiefern bakterielle Belastung die Regeneration von Pneumozyten Typ 2 beeinflusst. In der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, wie sich bakterielle Exposition im Air-Liquid-Interface Modell auf die Differenzierung von Lungenepithelzellen auswirkt. Zudem sollte geprüft werden, inwiefern Toll-like Rezeptoren und DKK3 die Differenzierung des Epithels regulieren.

## 5. Material und Methodik

### 5.1. Materialien und Geräte

#### 5.1.1. Geräte und Materialien

Folgende Materialien und Geräte wurden bei dieser Arbeit verwendet.

Bezeichnung	Hersteller, Land
CFX96 Touch Real time System	BioRad, USA
Elisa Platte	Greiner, Deutschland
Inkubator Hera Cell	Heraeus, Deutschland
Inkubator Minitron	Infors HAT, Deutschland
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Deutschland
LS Columns	Miltenyi, Deutschland
MidiMACS Separator	Miltenyi, Deutschland
MyCycler	BioRad, USA
NanoDrop 8000	Thermo Scientific, Deutschland
Sterilbank Hera Safe	Heraeus, Deutschland
T100 Thermal Cycler	BioRad, USA
Transwells (12x 6,5 mm Inserts; 0,4 µm Poren; 24-well, clear, PET)	Corning, USA
Voltohmessgerät Millicell ERS	Merck, Deutschland
Wasserbad	Gesellschaft für Laborgeräte, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Labofuge 400	Thermo Scientific, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Fresco 21	Thermo Scientific, Deutschland

**Tabelle 1:** Geräte und Materialien

#### 5.1.2. Chemikalien, Kits und Reagenzien

Folgende Chemikalien, Kits und Reagenzien wurden bei dieser Arbeit verwendet.

Bezeichnung	Hersteller
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, USA
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, USA
Calcium Chlorid Dihydrat (CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich, USA
CD 326 (EpCam) Antibody, mouse	Miltenyi, Deutschland
CD 326 (EpCam), Micro Beads, mouse	Miltenyi, Deutschland

Desoxyribunuclease I	Sigma-Aldrich, USA
Dispase	Corning, USA
DMEM/F12 mit Glutamin, Gibco	Life Technologies, USA
DuoSet Elisa	R&D Systems, USA
Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA)	Life Technologies, USA
Fetales Kälberserum (FBS)	Life Technologies, USA
Fibronectin	Corning, USA
Glucose	Carl Roth, Deutschland
Hirn-Herz-Medium	Roth, Deutschland
Hydroxyethyl-Piperazinyl-Ethansulfonsäure (HEPES)	Life Technologies, USA
Insulin-Transferrin-Sodium-Selenite Supplement (ITSS)	Sigma-Aldrich, USA
Kochblutagar	BD, Deutschland
Laminin	Sigma-Aldrich, USA
Magnesium Sulfate Heptahydrat (MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich, USA
Natrium Chlorid (NaCl)	Carl Roth, Deutschland
Non-Essential-Amino-Acid-Solution (NEAA)	Sigma-Aldrich, USA
NucleoSpin RNA Set	Macherey-Nagel, Deutschland
p53-Aktivator	Abcam, Vereinigtes Königreich
p53-Inhibitor	Abcam, Vereinigtes Königreich
Penicillin-Streptomycin	Life Technologies, USA
Phosphat Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich, USA
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Deutschland
Potassium Chloride (KCl)	Carl Roth, Deutschland
Primocin	Invivogen, USA
Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific, Deutschland
SensiMix SYBR Kit	Bioline, Deutschland
Sodium Hydroxide (NaOH)	Carl Roth, Deutschland
Sodium Phosphate dibasic heptahydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich, USA
Supplement B	BD, Deutschland

**Tabelle 2:** Chemikalien, Reagenzien und Kits

### 5.1.3. Puffer, Lösungen und Kulturmedien

Folgende Puffer, Lösungen und Kulturmedien wurden bei dieser Arbeit hergestellt und verwendet.

BSSB-Puffer
<ul style="list-style-type: none"><li>- 8 g NaCl</li><li>- 0,4 g KCl</li><li>- 0,14 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> * 7H<sub>2</sub>O</li><li>- 2,38 g HEPES</li><li>- 1 g Glucose</li><li>- 0,29 g MgSO<sub>4</sub> * 7 H<sub>2</sub>O</li><li>- 0,27g CaCl<sub>2</sub> * 2 H<sub>2</sub>O</li><li>- In 1000 ml Aqua bidest lösen</li><li>- PH mit NaOH auf 7,4 einstellen</li><li>- Steril filtrieren</li><li>- 10 ml Pencillin-Streptomycin dazugeben</li></ul>
Complete Mouse Medium (CMM)
<ul style="list-style-type: none"><li>- 500 ml DMEM/F12 (Gibco 11320-074) mit Glutamin</li><li>- 1,25g BSA (0,25%)</li><li>- 5 ml HEPES (10mM)</li><li>- 5 ml NEAA (1%)</li><li>- 5 mg Insulin-Transferrin-Sodium-Selenite (ITSS)</li><li>- 1 ml Primocin</li><li>- ITSS in 1 ml DMEM/F12 lösen, BSA bei 37°C in 35 ml DMEM/F12 lösen</li><li>- ITSS und BSA steril filtrieren</li></ul>
MACS-Waschpuffer
<ul style="list-style-type: none"><li>- 1000 ml PBS</li><li>- 0,5g BSA</li><li>- 0,0545g EDTA</li><li>- Steril filtrieren</li></ul>

**Tabelle 3:** Puffer, Lösungen und Kulturmedien

#### 5.1.4. Primer für PCR

Gen		Primersequenz
Claudin 4 [76]	Forward	5'-ACA GGT CCT GGG AAT CTC CT-3'
	Reverse	5'-CAC TGC ATC TGA CCT GTG CT-3'
Occludin [76]	Forward	5'-GAG TTA ACG TCG TGG ACC GGT ATC-3'
	Reverse	5'-CCC TGA AAT ACA AAG GCA GGA ATG-3'
Zonula Occludens [76]	Forward	5'-AGG ACA CCA AAG CAT GTG AG-3'
	Reverse	5'-GGC ATT CCT GCT GGT TAC A-3'
Tm4sf1	Forward	5'-GGC ACC GTC TCA TGA CTC AA-3'
	Reverse	5'-TTG TGG AGA AAG CCG ATG CT-3'
Aquaporin-5 [76]	Forward	5'-CTG CTC CGA GCC ATC TTC TA-3'
	Reverse	5'-GGT GAA GTA GAT CCC CAC AAG A-3'
Surfactant Protein C [76]	Forward	5'-CAC AGC AAG GCC TAG GAA AG-3'
	Reverse	5'-ATC CAA CCC AGT CCC TCT CT-3'
Claudin-18 [76]	Forward	5'- GAC CGT TCA GAC CAG GTA CA-3
	Reverse	5'-GCG ATG CAC ATC ATC ACT C-3'
β-Actin [76]	Forward	5'- AGC CAT GTA CGT AGC CAT C -3'
	Reverse	5'-CTC TCA GCT GTG GTG GTG AA-3'
Dkk3 [79]	Forward	5'-TGA GGC AGT GGC TAC ACA AG-3'
	Reverse	5'-GCT GGT ATG GGG TTG AGA GA-3'
Lyz2 [63]	Forward	5'-ATG GAA TGG CTG GCT ACT ATG G-3'
	Reverse	5'-ACC AGT ATC GGC TAT TGA TCT GA-3'
P15/Cdkn2b [40]	Forward	5'-CCC TGC CAC CCT TAC CAG A-3'
	Reverse	5'-CAG ATA CCT CGC AAT GTC ACG-3'
Trp53 [65]	Forward	5'-CGC TGC TCC GAT GGT GAT-3'
	Reverse	5'-GGC GAA AAG TCT GCC TGT CTT-3'
Hopx	Forward	5'-TAT ACT GTC CCC TCG GAG TGT-3'
	Reverse	5'-TGC GCG TCT GAC TAA GGA TG-3'
T1a [82]	Forward	5'-AGC AAA GCC AAG ACA GTA TCG C-3'
	Reverse	5'-TTA GGA CTG GGC TGG AAT GTG T-3'
P21/Cdkn1a [40]	Forward	5'-CCT GGT GAT GTC CGA CCT G-3'
	Reverse	5'-CCA TGA GCG CAT CGC AAT C-3'
P16/CDKN2A [48]	Forward	5'-CGC AGG TTC TTG GTC ACT GT-3'
	Reverse	5'-TGT TCA CGA AAG CCA GAG CG-3'
	Forward	5'-CCA AGT GCT TGA TGT CTA CC-3'

Surfactant Protein B [71]	Reverse	5'-CTG GAT TCT GTT CTG GCT TA-3'
Surfactant Protein C [71]	Forward	5'-GTA GCA AAG AGG TCC TGA TG-3'
	Reverse	5'-CCT ACA ATC ACC ACG ACA A-3'
Surfactant Protein C [32]	Forward	5'-AAG GGT GAT CCA GGT TTG CCA-3'
	Reverse	5'-GAG GTC CAC TTA GTC CAC GTT CT-3'

**Tabelle 4:** Primer für PCR

### 5.1.5. Mäuse

Die Organentnahmen wurde unter Beachtung des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Eine Vorabmeldung zum Töten zu wissenschaftlichen Zwecken wurde gestellt. Die Mäuse wurden unter spezifisch-pathogenfreien Bedingungen gehalten und hatten jederzeit freien Zugang zu Futter und Wasser. Die Lungen wurden nach Tötung der Tiere aus den folgenden Mausstämmen entnommen: Wildtyp C57Bl6 Mäuse aus eigener Zucht oder Janvier (Frankreich), DKK3 defiziente Mäuse (*Dkk3*<sup>-/-</sup>, C57Bl6 Hintergrund) aus eigener Zucht der AG Prof. Fliser (Innere Medizin IV, UdS, ursprünglich DKFZ Heidelberg, AG Prof. Hermann-Josef Gröne) und TLR2/4 defiziente Mäuse (*Tlr2/4*<sup>-/-</sup>, C57Bl6 Hintergrund) aus eigener Zucht.

## 5.2. Methoden

### 5.2.1. Isolation muriner alveolarer Epithelzellen

Die Isolation erfolgte wie bereits beschrieben aus Wildtyp (WT), *TLR2/4*<sup>-/-</sup> und *Dkk3*<sup>-/-</sup> Mäusen. Die Isolation erfolgte anhand eines Protokolls zur Isolation muriner alveolarer Epithelzellen, dass entsprechend adaptiert wurde [76]. Zunächst wurde die Maus mittels intraperitonealer Injektion von Ketamin 525 mg/kg und Xylazin 35 mg/kg euthanasiert, der Zwischenzehenreflex geprüft und der Thorax eröffnet. Die linke Seite der Herzbasis wurde inzidiert und auf der rechten Seite der Herzbasis eine Kanüle eingeführt. Somit konnte die Lunge mit warmem PBS blutfrei gespült werden. Nun wurde die Trachea frei präpariert, indem Muskeln und Fett entfernt wurden, und mittels einer Venenverweilkanüle 2 ml warme Dispase in die Lunge injiziert, die dort für 2 min verblieb. Im nächsten Schritt wurden Herz und Lunge entnommen, die Lunge von Herz, Thymus, Trachea, sowie Fett befreit und in vorgewärmte Dispase gegeben.

Die Lunge wurde im Anschluss für 45 min schüttelnd bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Lunge in 20 ml CMM und 1 ml DNase in ein Falcon-Tube gegeben und mit einer Schere gründlich zerkleinert. Es folgte eine weitere circa 40-minütige



Inkubationszeit, ebenfalls schüttelnd, um die Zellen aus dem Gewebe herauszulösen. Der Inhalt des Falcons wurde nun mehrfach resuspendiert, zunächst mittels einer 10 ml, dann einer 5 ml Stabpipette und durch ein 100 µm-Zellsieb, sowie ein 40 µm-Zellsieb in einen 50 ml Falcon filtriert. So entstand eine gewebefreie Zellsuspension. Diese wurde für 5 min bei 1400 rpm (= 200 x g) zentrifugiert, der Überstand überführt und erneut zentrifugiert. Die Zellpellets wurden mit 20 ml Medium und 1 ml DNase resuspendiert und auf 2 Petrischalen verteilt. Um eine Adhäsion der Makrophagen zu gewährleisten, wurden diese für 60-90 min bei 37°C inkubiert.

Im nächsten Schritt wurde die Zellsuspension, sowie 10 ml BSSB-Puffer, die zum Waschen der Petrischalen verwendet wurden, in ein Falcon-Tube überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 1400 rpm (= 200 x g) für 5 min, das Zellpellet wurde mit 1 ml BSSB-Puffer resuspendiert und mit 5 µl Anti-EpCAM-PE für 20 min bei 4°C rotierend inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension erneut zentrifugiert (1400 rpm (= 200 x g), 5 min) und nach Zugabe von 125 µl Microbeads für 20 min bei 4°C rotierend inkubiert. Die Funktion der Microbeads besteht in der Bindung der im vorherigen Schritt mit Antikörpern markierten CD326<sup>+</sup>-Zellen. Diese können hierdurch durch magnetische Zell-Separation unter Zuhilfenahme einer MACS-Säule herausgefiltert werden. Dafür wurde die Säule zunächst mittels MACS-Waschpuffer vorbereitet, anschließend durchläuft die Zellsuspension die Säule gefolgt von 10 ml BSSB-Puffer. Um eine angereicherte Typ 2-Alveolarzell-Suspension zu erhalten, wurde im letzten Schritt zügig 5 ml CMM (mit 10% FBS versetzt) durch die Säule gedrückt und der Durchlauf aufgefangen. Mithilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde die Anzahl der Zellen bestimmt.

### **5.2.2. Kultivierung und Stimulation der Zellen**

Zur Kultivierung wurden Transwell-Air-Liquid-Interface-Platten gewählt, die zuvor mit Laminin und Fibronectin gecoatet wurde. Als Nährmedium wurden mit 10% FBS versetztes CMM verwendet. Es wurden  $0,5 \cdot 10^6$  Zellen in 200 µl Nährmedium apikal auf die Transwells pipettiert. In das basolaterale Kompartiment wurden 800 µl Nährmedium gegeben. Das Medium wurde täglich gewechselt. Nach 48 Stunden wurde ein Airlift durchgeführt. Dies bedeutet, dass das apikale Medium entfernt wurde, wodurch die kultivierten Zellen apikal in Kontakt zur Luft waren (Abbildung 3). Ab diesem Zeitpunkt ist die Oberseite der Zellschicht der Luft ausgesetzt, während die Basalseite der Zellen durch ein flüssiges Nährmedium versorgt wird. Dies ermöglicht eine möglichst spezifische in-vitro Nachbildung der Atemwege. Der genaue Versuchsaufbau der jeweiligen Experimente ist weiter unten beschrieben.

### 5.2.3. NTHi-Lösung

Aus einem klinischen Isolat von NTHi wurde zur Anzucht von Bakterien eine Vorkultur abgenommen und bei 37°C in 50 ml Hirn-Herz-Medium mit 1 % Supplement B angeimpft. Nach 24 Stunden wurden die Bakterien auf Kochblutagar ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Außerdem wurde hiervon zur Gewinnung weiterer Hauptkulturen mit Einzelkolonien weitere Vorkulturen angeimpft. Zur Inaktivierung und Lysierung der Bakterien wurde die Flüssigkultur zunächst abzentrifugiert (2500 x g, 15 min) und das erhaltene Zellpellet, nach Verwerfen des Überstands, in PBS gewaschen. Bei einer Temperatur von 70°C wurden die Bakterien inaktiviert und anschließend mittels Ultraschallsonde für eine Dauer von 45 sek lysiert. Dabei wurde die Suspension auf Eis gekühlt. Um die vollständige Inaktivierung des Lysats zu überprüfen, wurde ein Kontrollausstrich auf Kochblutagarplatten angefertigt. Mithilfe des Pierce BCA Protein Assay Kit (Verwendung nach Herstellerangaben) wurde die Quantifizierung der Gesamtproteinmenge durchgeführt und die Konzentration auf 2,5 mg/ml eingestellt [52]. Vor der Verwendung wurde eine weitere Verdünnung mit CMM (mit 10% FBS angereichert) durchgeführt um eine 5%-ige Lösung zu erhalten.

### 5.2.4. Messung des Widerstands

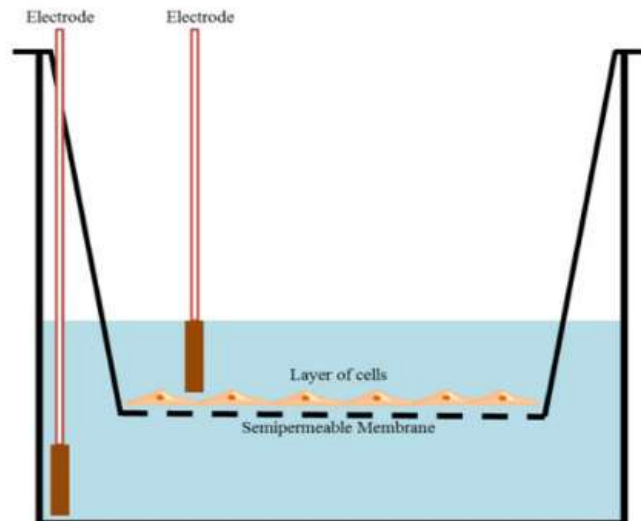
Täglich wurde ab Versuchstag 1 (Aussaat an Tag 0) bei allen kultivierten Zellen der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) mittels eines Voltohmmessgeräts gemessen, um die Differenzierung der Zellen zu messen und zu dokumentieren. Dieser Wert ist ein Marker für die Integrität zellulärer Barrieren [59]. Die Epithelien der Atemwege und der Alveolen bilden eine physikalische und auch immunologische Barriere zwischen den luftleitenden und den übrigen Abschnitten der Lunge [46,73]. Diese Barriere wird gebildet durch interzelluläre Proteinkomplexe, den apikalen Tight Junctions, Adherens Junctions und den Desmosomen [13]. Tight Junctions ermöglichen unter Aufrechterhaltung der Barrierefunktion eine Diffusion und Stofftransporte zwischen apikalen und basolateralen Kompartimenten [59]. Mithilfe eines Voltohmmeters kann eine quantitative Bestimmung der Entwicklung und Differenzierung der Barrierefunktion erfolgen ohne die kultivierten Zellen zu beschädigen [59].

Zunächst wurde apikal und basolateral das Medium abgesaugt und 800 µl warme PBS-Lösung basolateral, sowie 200 µl warme PBS-Lösung apikal dazugegeben. Dann wurde vorsichtig, um das Alveolarepithel nicht zu verletzen, mittels zweier stabförmiger Elektroden der elektrische Widerstand bestimmt (Abbildung 5). Aus dem gemessenen Wert  $R_{TOTAL}$  lässt sich unter Berücksichtigung der Fläche des Inserts ( $M_{AREA}$ ) und dem sogenannten  $R_{BLANK}$ , also dem gemessenen Widerstand in einem nicht mit Zellen kultivierten Well, der TEER Wert wie folgt berechnen:

$$\text{TEER } [\Omega\text{cm}^2] = (R_{\text{TOTAL}} - R_{\text{BLANK}}) [\Omega] * M_{\text{AREA}} [\text{cm}^2]$$

Dabei gilt  $R_{\text{BLANK}} = 120 \Omega$  und  $M_{\text{AREA}} = 0,33\text{cm} * 0,33\text{cm} * \pi \approx 0.342\text{cm}^2$

Nach Abschluss der Messungen wurde das apikale und basale PBS vorsichtig abgesaugt und die Zellen wieder mit Nährmedium versorgt. Apikal wurde, je nach Ablauf und Zeitpunkt des aktuell durchgeführten Versuchs, erneut mit NTHi stimuliert.



**Abbildung 5: Durchführung der TEER Messung [59]**

Für die Durchführung der TEER Messung wird das Medium entfernt und PBS-Lösung in die ALI Kultur gegeben. Eine Messelektrode wird apikal, die zweite Messelektrode wird in das basale Kompartiment verbracht. Nach Durchführung der Messung wird die PBS-Lösung entfernt und die Zellen wieder mit Nährmedium versorgt.

### 5.2.5. RNA-Isolation und Umschreibung

Zur Gewinnung der RNA aus den kultivierten Zellen wurden zunächst  $\beta$ -Mercaptoethanol und Lysepuffer im Verhältnis 1:100 auf die Zellen gegeben. Nach kurzer Einwirkzeit erfolgte die Isolation der RNA anhand des NucleoSpin RNA Kits, dabei wurden die Herstellerangaben zur Vorgehensweise befolgt. Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde eine spektralphotometrische Messung mit dem NanoDrop 8000 durchgeführt. Dabei wird die Abschwächung der Strahlungsintensität registriert und mittels Lambert-Beer'schem-Gesetz die Konzentration der RNA berechnet. Die Umschreibung der RNA in cDNA wurde mithilfe des RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit durchgeführt.

Das zugehörige Protokoll des T100 Thermal Cyclers lautet wie folgt:

- 65°C für 5 min
- 4°C für 5 min
- 42°C für 60 min
- 70°C für 5 min
- 4°C Infinite Hold

Die synthetisierte cDNA wurde in RNase-freiem Wasser verdünnt und im nächsten Schritt mittels quantitativer Real Time PCR analysiert.

### 5.2.6. Quantitative Real Time PCR

Zur Messung der Genexpression wurde eine quantitative Real Time PCR durchgeführt. Dabei wird die cDNA zunächst bei 95°C denaturiert, anschließend kommt es bei 60°C zur Primerbindung und Elongation der DNA. Dieser Schritt wird mehrfach wiederholt und dabei mittels Fluoreszenzmessung die Menge der entstandenen doppelsträngigen DNA quantifiziert. Der Reaktionsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

12,5 µl	SensiMix SYBR Green
0,1 µl	Forward Primer
0,1 µl	Reverse Primer
7,3 µl	PCR-H <sub>2</sub> O
5 µl	cDNA

Die verwendeten Primer sind in Abschnitt 5.1.4 Primer für PCR aufgeführt. Das verwendete Protokoll des CFX96 Touch Real Time Systems lautet:

- 95°C für 10:00 min
- 95°C für 00:15 min
- 60°C für 0:30 min + Plate Read
- Wiederholung 40x
- Melt Curve 65°C bis 95°C, + 0,5°C/Zyklus + Plate Read
- 5°C Infinite Hold

### **5.2.7.ELISA**

Zur Quantifizierung der Zytokinkonzentration wurde aus Zellkulturüberständen ein ELISA durchgeführt. Verwendet wurde hierfür das DuoSet Elisa. 96-Well Platten wurden mit Antikörpern beschichtet und mit ELISA Diluent geblockt. Anschließend erfolgte die Hinzugabe der, mit ELISA Diluent verdünnten, Proben und es erfolgte eine Inkubation der Platte über Nacht bei 4°C. Das weitere Vorgehen ist dem Herstellerprotokoll zu entnehmen.

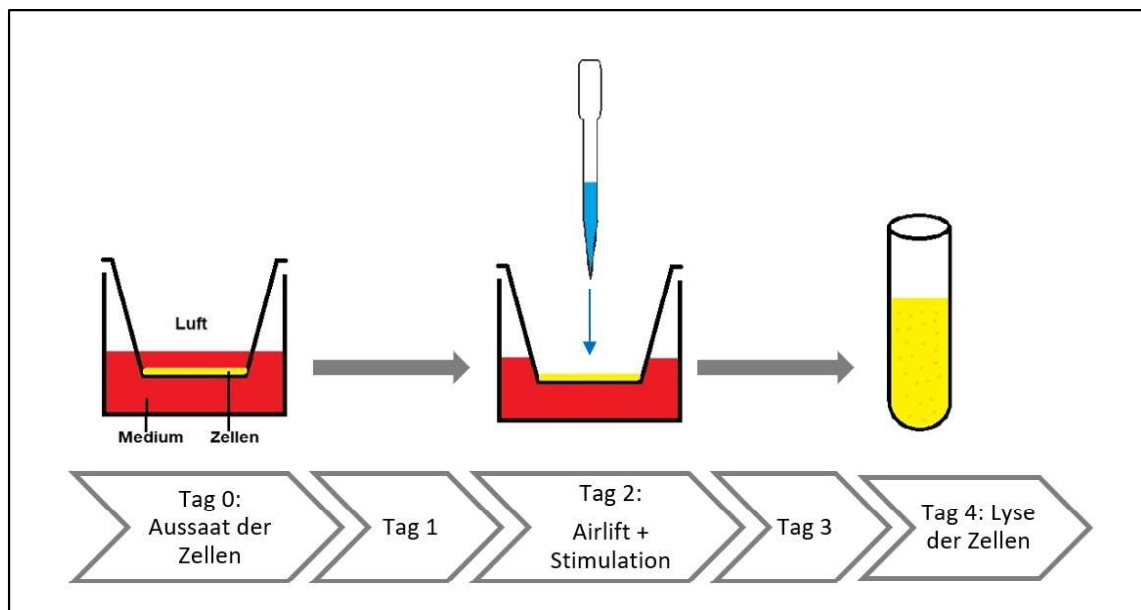
### **5.2.8. Statistik**

Für die statistische Auswertung der Experimente wurde die Software GraphPad Prism (San Diego, Kalifornien, USA) verwendet. Ein p-Wert  $<0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen. Für die Berechnung der Signifikanz zweier Gruppen wurde der Student's Test verwendet. Die Analyse zwischen mehreren Gruppen erfolgte mittels Varianzanalysen (analysis of variance, ANOVA) mit anschließendem post-hoc Turkey Test. Die verwendeten statistischen Verfahren sind in den Legenden der Abbildungen angegeben. Die Abbildungen wurden mithilfe der Software Sketchbook erstellt.

## 6. Ergebnisse

### 6.1. Stimulation mit NTHi führt zu einer verminderten Expression von Pneumozyten-Markern

Akute und chronische Lungenerkrankungen, wie virale Pneumonien und die COPD, sind häufig mit einer Schädigung bis hin zum Verlust von Lungenparenchym verbunden. Proliferierende Typ 2 Pneumozyten, aber auch Club-Zellen tragen entscheidend zur Homöostase und Regeneration der Lunge bei. Um zu prüfen, inwiefern Bakterien, die gerade auch bei der COPD häufig die Lunge besiedeln, sich auf die Regeneration von Pneumozyten auswirken, wurden Lungenepithelzellen aus WT-, sowie *Tlr2/4<sup>-/-</sup>*-Mäusen isoliert und in Transwells als ALI kultiviert (Abbildung 6). Nach 48 Stunden wurde ein Airlift durchgeführt, indem das apikale Medium abgesaugt wurde. Folgend wurden die Kulturen mit NTHi oder Kontrollmedium apikal stimuliert. Der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) wurde 24-stündig gemessen. Das basolaterale Medium wurde 24-stündig gewechselt. 48 Stunden nach der Stimulation mit NTHi wurde das basolaterale Medium abgenommen und bei -80°C verwahrt. Die Zellen wurden für die Isolation von mRNA und folgende RT-PCR Analysen in einen Lysepuffer aufgenommen.

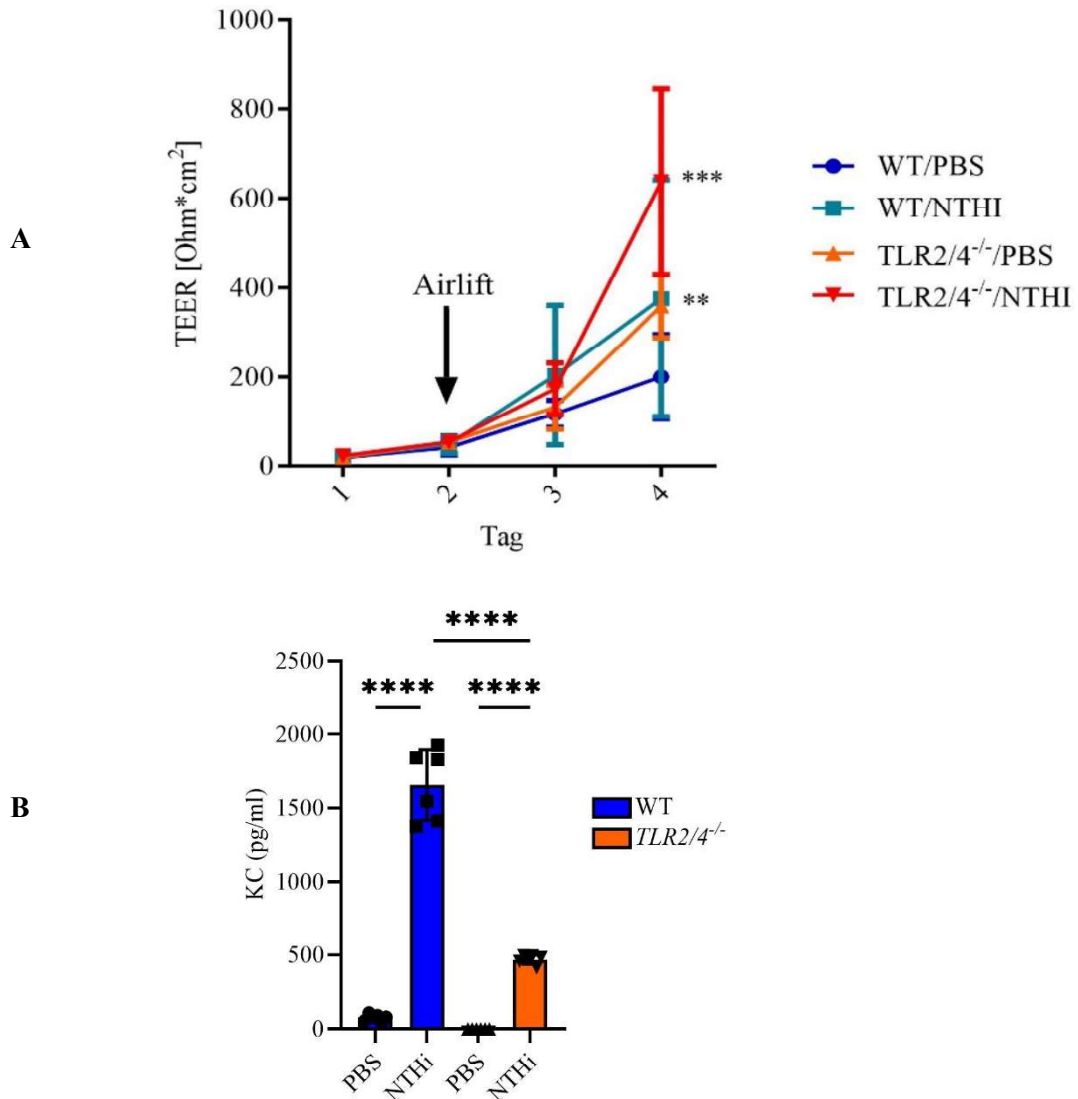


**Abbildung 6: Versuchsaufbau**

Isolierung der murinen alveolaren Epithelzellen aus WT und *TLR2/4<sup>-/-</sup>* Mäusen und Aussaat in ALI Kulturen (Tag 0); 48 Stunden später Absaugen des apikalen Mediums und Stimulation mit NTHi oder Kontrollmedium (Tag 2); 48 Stunden später Aufnahme der Zellen in Lyse-Puffer zur RT-PCR Analyse und Einfrieren des basolateralen Mediums bei -80°C (Tag 4).

Abbildung 7 zeigt die Entwicklung des TEER kultivierter alveolarer Epithelzellen aus WT- und *Tlr2/4<sup>-/-</sup>*-Mäusen. An Tag 4 war der TEER bei NTHi-behandelten ALI Kulturen verglichen mit Kontrollmedium behandelten ALI Kulturen signifikant erhöht. Dieser Unterschied war jedoch

unabhängig vom Toll-Like-Rezeptorstatus der kultivierten Zellen. Die Ausschüttung von Zytokin KC, gemessen aus den Überständen an Tag 4, zeigte sich signifikant höher in den mit NTHi stimulierten Kulturen.

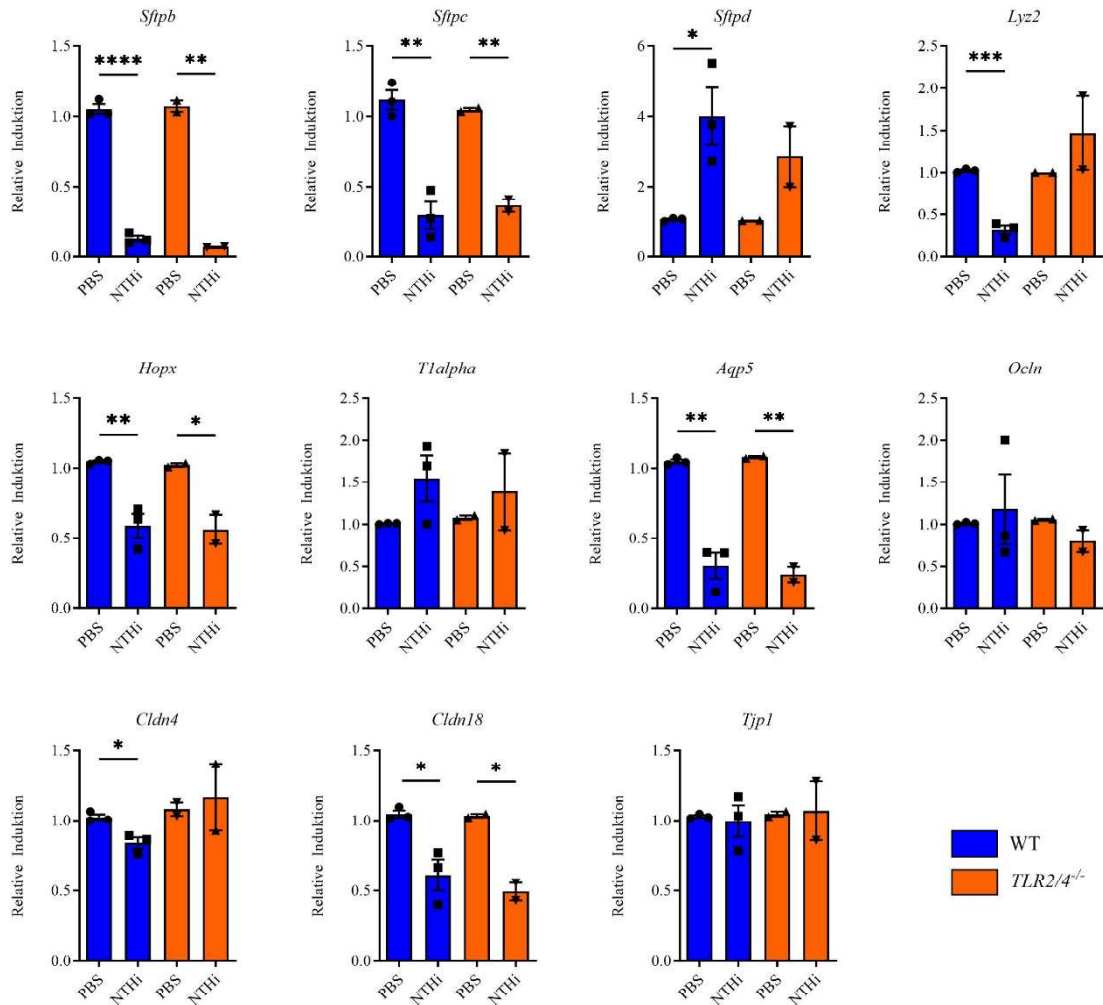


**Abbildung 7: (A) Entwicklung des TEER in kultivierten alveolaren Epithelzellen aus WT und TLR2/4<sup>-/-</sup> Mäusen und (B) Quantifizierung der Zytokin KC Ausschüttung**

Aus WT und TLR2/4<sup>-/-</sup> Mäusen wurden alveolare Epithelzellen isoliert und in ALI Kulturen ausgesät. Die Kulturen wurden ab dem Tag des Airlift mit NTHi oder PBS apikal stimuliert. Während der Kultivierungsphase von 4 Tagen wurde täglich der TEER bestimmt. Aus dem basolateralen Medium wurde mittels ELISA die Ausschüttung des Zytokins KC gemessen. Statistik: (A) Two-Way-Anova; MW±SD; (B) One-Way-Anova; MW±SD; Zusammengefasste Daten aus drei (WT) und zwei (TLR2/4<sup>-/-</sup>) unabhängigen Experimenten; Signifikanzniveau: \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001

Weiterhin wurde mittels semi-quantitativer RT-PCR die Expression verschiedener, zelltypspezifischer Gene gemessen (Abbildung 8). Die Expression der Typ-2-Zell Marker *Sftpb* und *Sftpc* fiel nach Stimulation mit NTHi signifikant ab, wohingegen *Sftpd* vermehrt exprimiert wurde. Außerdem vermindert die Behandlung mit NTHi die Expression des Typ-1-Zell Markers *Hopx*,

sowie die Expression von *Aqp5* und *Cldn18*. *Cldn18* kodiert ein integrales Membranprotein, das entscheidend ist zur Ausbildung von Tight Junctions bei Pneumozyten Typ 1. In der Wildtyp-Gruppe zeigte sich außerdem ein signifikanter Abfall der Expression von *Lyz2* (Typ-2-Zellen oder Makrophagen). Die gemessenen Unterschiede bei *Cldn4*, *Ocln*, *Tl-alpha*, sowie *Tjp1* (*Zo-1*) waren nicht signifikant.



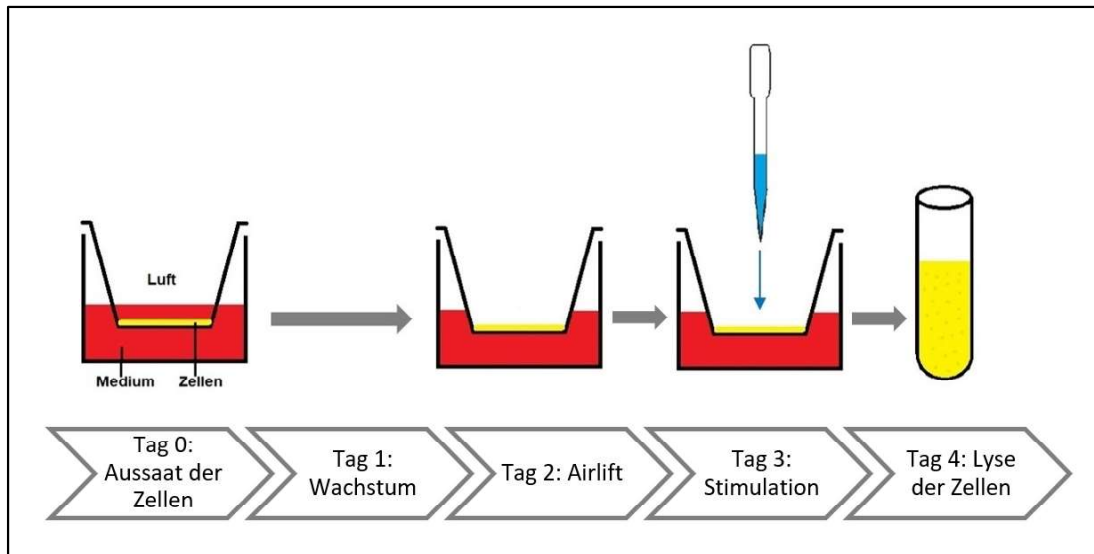
**Abbildung 8: Stimulation mit NTHi vermindert die Expression von *Sfpb* und *Sftp***

Bei alveolaren Epithelzellen von WT und *TLR2/4<sup>-/-</sup>* Mäusen wurde 48 Stunden nach der Aussaat in ALI Kulturen ein Airlift durchgeführt und mit NTHi stimuliert. Weitere 48 Stunden später wurden die Zellen lysiert und quantitative RT-PCR durchgeführt. Statistik: unpaired t-Test, Zusammengefasste Daten aus drei (WT) und zwei (*TLR2/4<sup>-/-</sup>*) unabhängigen Experimenten; MW±SEM; Signifikanzniveau:  $p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,001$ ;  $****p < 0,0001$ . Jeder Datenpunkt repräsentiert ein unabhängiges Experiment.

Folgend wurde betrachtet, wie sich die Stimulation mit NTHi auf die Expression von Pneumozyten-Markern auswirkt, nachdem sich eine dichte Barriere ausgebildet hat. Hierfür wurden alveolare Epithelzellen aus WT-Mäusen isoliert und in ALI Kulturen kultiviert (Abbildung 9). Nach 48 Stunden wurde ein Airlift durchgeführt. Weitere 24 Stunden später wurden 20  $\mu$ l NTHi oder Kontrollmedium apikal auf die Zelloberfläche aufgebracht. Das basolaterale Medium wurde 24-stündig gewechselt. 24 Stunden nach der Stimulation mit NTHi wurde das basolaterale Medium



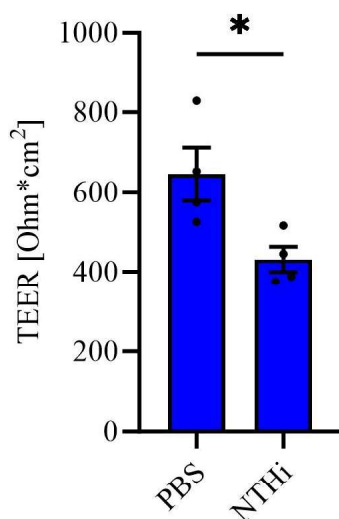
abgenommen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  verwahrt. Die Zellen wurden für die Isolation von mRNA und folgende RT-PCR Analysen in einen Lysepuffer aufgenommen.



**Abbildung 9: Versuchsaufbau**

Isolierung der murinen alveolaren Epithelzellen aus WT und *TLR2*<sup>-/-</sup> Mäusen und Aussaat in ALI Kulturen (Tag 0); 48 Stunden später Absaugen des apikalen Mediums (Tag 2); 24 Stunden später Stimulation mit NTHi oder Kontrollmedium (Tag 3); weitere 24 Stunden später Aufnahme der Zellen in Lyse-Puffer zur RT-PCR Analyse und Einfrieren des basolateralen Mediums bei  $-80^{\circ}\text{C}$  (Tag 4).

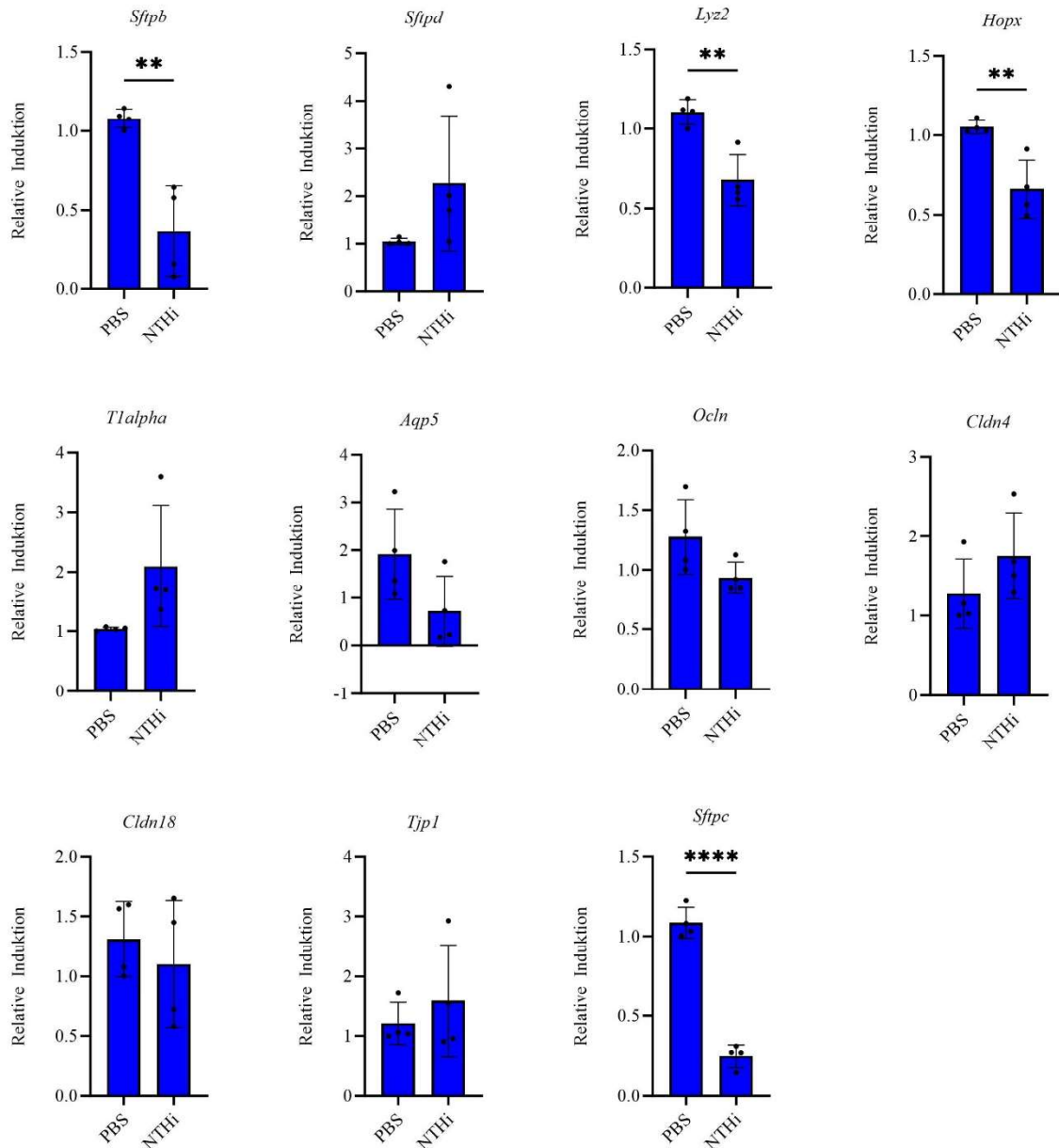
Der an Tag 4 gemessene TEER ist in Abbildung 10 dargestellt. Verglichen werden kultivierte alveolare Epithelzellen, welche mit NTHi behandelt wurden, mit Kontrollmedium behandelten Kulturen. Die behandelten Kulturen zeigten dabei einen signifikant verminderten TEER.



**Abbildung 10: Messung des TEER an Tag 4**

Alveolare Epithelzellen wurden aus WT Mäusen isoliert und in ALI Kulturen ausgesät (Tag 0). An Tag 2 erfolgte der Airlift, an Tag 3 Stimulation mit NTHi. Dargestellt ist die TEER-Messung an Tag 4. Statistik: t-Test, Zusammengefasste Daten aus vier unabhängigen Experimenten; MW $\pm$ SEM; Signifikanzniveau: \* $p < 0,05$ ; \*\*. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein unabhängiges Experiment.

Mittels RT-PCR wurde außerdem die Expression einiger zelltypspezifischer Gene gemessen (Abbildung 11). Es zeigte sich ein signifikanter Abfall der Expression von *Sftpb* und *Sftpc* nach Stimulation mit NTHi. Weiterhin war die Expression der Gene *Lyz2* und *Hopx* in den behandelten Kulturen gehemmt. Die Marker *Sftpd*, *Tl-alpha*, *Aqp5*, *Ocln*, *Cldn 4* und *Cldn 18* zeigten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der mit NTHi und Kontrollmedium behandelten Kulturen.



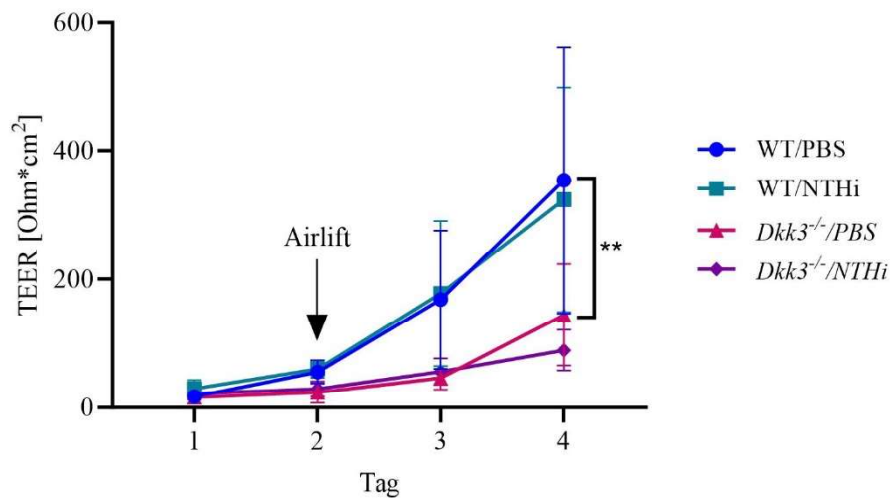
**Abbildung 11: Stimulation mit NTHi hemmt die Expression von *Sftpb* und *Sftpc***

Bei alveolaren Epithelzellen von WT Mäusen wurde 48 Stunden nach der Aussaat in ALI Kulturen ein Airlift durchgeführt. 24 Stunden später wurde mit NTHi stimuliert. Weitere 24 Stunden später wurden die Zellen lysiert und quantitative RT-PCR durchgeführt. Statistik: t-Test, Zusammengefasste Daten aus vier unabhängigen Experimenten; MW±SEM; Signifikanzniveau: \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein unabhängiges Experiment.

## 6.2. Die Defizienz von DKK3 führt zu einer verminderten epithelialen Barriere

DKK3 reguliert Wnt-Signalwege, die die Differenzierung von Pneumozyten regulieren [20,55]. Nicht-publizierte Experimente der Arbeitsgruppe zeigten, dass die Defizienz von DKK3 sich in Krankheitsmodellen auf die Lungenfunktion auswirkt. Alveolare Epithelzellen wurden aus WT-, sowie *Dkk3*<sup>-/-</sup>-Mäusen isoliert und in Transwell-Air-Liquid-Interface-Platten kultiviert (Abbildung 9). Nach 48 Stunden wurde ein Airlift durchgeführt. Weitere 24 Stunden später wurden 20 µl einer NTHi-Lösung oder Kontrollmedium apikal auf die Zelloberfläche aufgebracht. Der TEER wurde 24-stündig gemessen. Das basolaterale Medium wurde 24-stündig gewechselt. 24 Stunden nach der Stimulation mit NTHi wurde das basolaterale Medium abgenommen und bei -80°C verwahrt. Die Zellen wurden für die Isolation von mRNA und folgende RT-PCR Analysen in einen Lysepuffer aufgenommen.

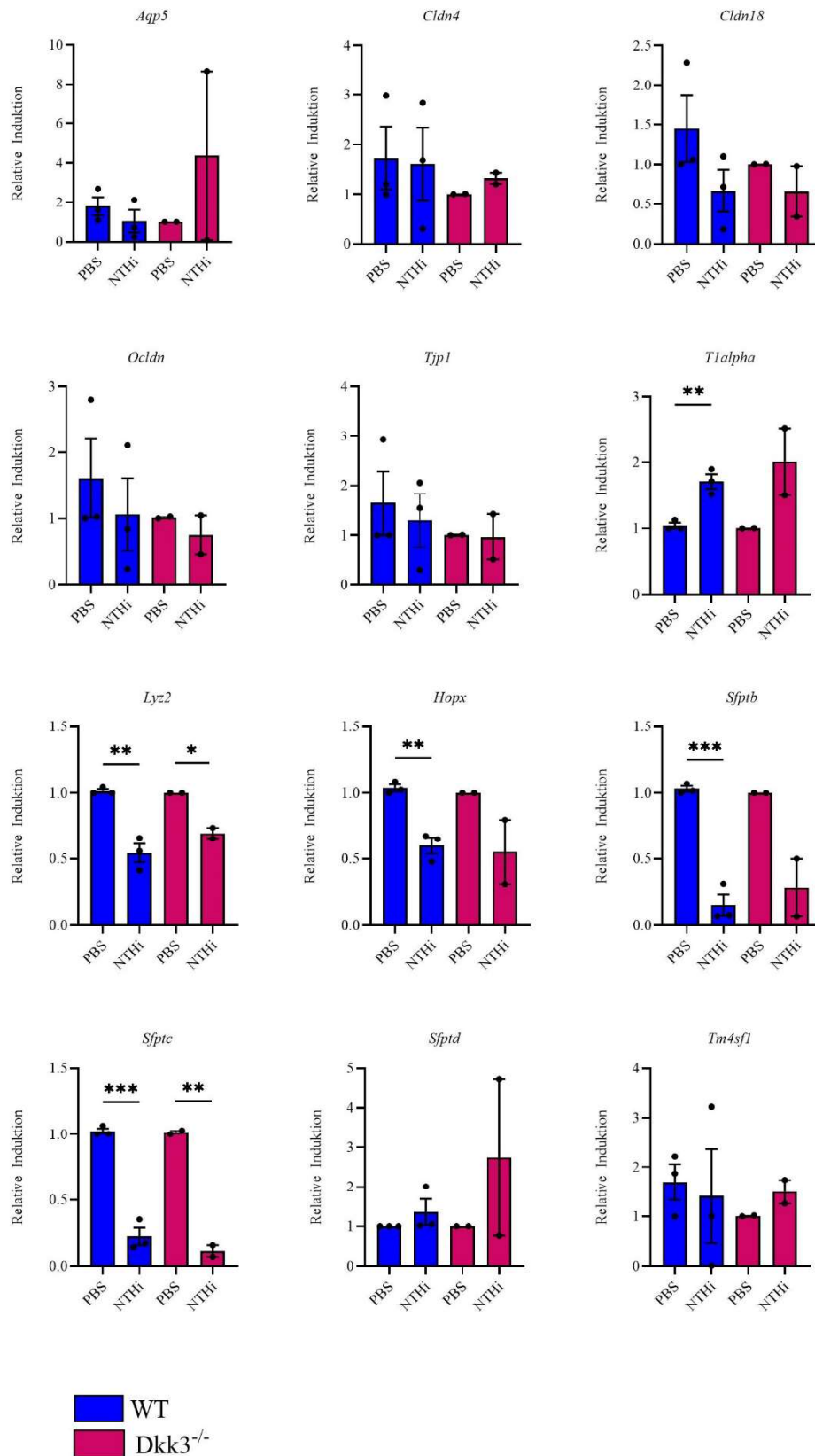
Abbildung 12 zeigt die Entwicklung des TEER in kultivierten alveolaren Epithelzellen aus WT- und *Dkk3*<sup>-/-</sup>-Mäusen. Dabei zeigte sich an Tag 4 ein signifikant niedrigerer TEER in den ALI Kulturen der *Dkk3* defizienten Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen.



**Abbildung 12: Entwicklung des TEER in kultivierten alveolaren Epithelzellen aus WT und *Dkk3*<sup>-/-</sup> Mäusen**

Aus WT und *Dkk3*<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden alveolare Epithelzellen isoliert und in ALI Kulturen ausgesät. Während der Kultivierungsphase von 4 Tagen wurde täglich der TEER bestimmt. Statistik: Two-Way-Anova; Zusammengefasste Daten aus drei (WT) und zwei (*DKK3*<sup>-/-</sup>) unabhängigen Experimenten; MW±SD; Signifikanzniveau: \*\*p<0,01.

Zudem wurde mittels RT-PCR die Expression verschiedener zelltypischer Gene gemessen (Abbildung 13). Bei den ALI Kulturen aus Wildtyp-Mäusen zeigte sich bei der Stimulation mit NTHi, verglichen mit Kontroll-Medium, eine signifikant niedrigere Expression der Gene *Lyz2*, *Hopx*, *Sftpb* und *Sftpc*. Eine verstärkte Expression nach Stimulation mit NTHi zeigte *Tl-alpha*. Kein Unterschied konnte bei der Expression von *Aqp5*, *Cldn4*, *Cldn18*, *Ocln*, *Tjp1*, *Tm4sf1-2*, *Dkk3* und *Sftpd* in Wildtyp-Mäusen gemessen werden.



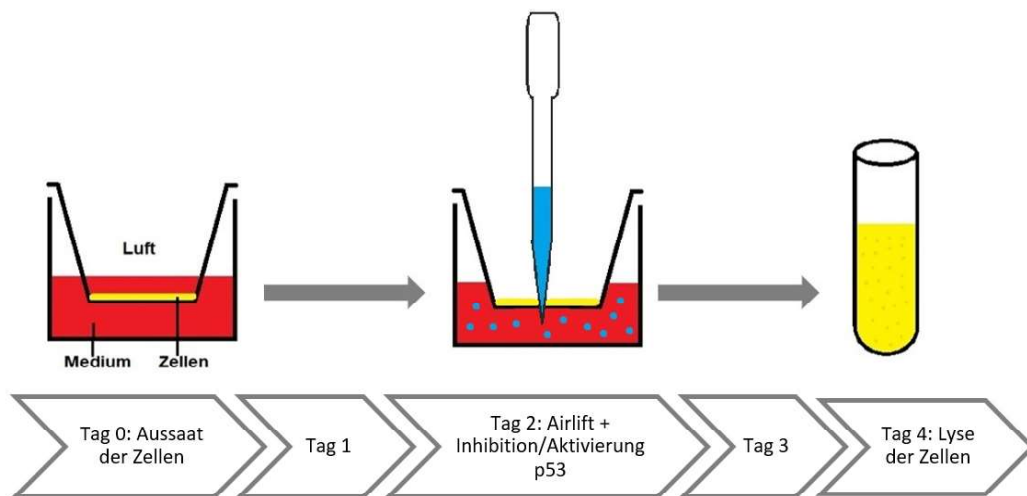
**Abbildung 13: Relative Induktion nach Stimulation mit NTHi in WT und *DKK3*<sup>-/-</sup>-Mäusen**

Bei alveolaren Epithelzellen wurde 48 Stunden nach Aussaat ein Airlift durchgeführt. 24 Stunden später wurde mit NTHi stimuliert. Weitere 24 Stunden später wurden die Zellen lysiert und quantitative RT-PCR durchgeführt. Statistik: unpaired t-test; Zusammengefasste Daten aus drei (WT) und zwei (*DKK3*<sup>-/-</sup>) unabhängigen Experimenten; MW±SEM; Signifikanzniveau: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein unabhängiges Experiment.

Die kultivierten alveolaren Epithelzellen aus *Dkk3<sup>-/-</sup>*-Mäusen zeigten eine signifikant verminderte Expression von *Sftpc*, sowie *Lyz2* in der mit NTHi stimulierten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die übrigen gemessenen Unterschiede waren nicht signifikant.

### 6.3. Einfluss von p53-Aktivator und p53-Inhibitor auf Lungenepithelzellen

Das Tumorsuppressorgen p53 reguliert eine Vielzahl von Signalwegen in der Zelle, beispielsweise den Zellzyklus, die Apoptose und die Reparatur von geschädigter DNA [70]. Es fungiert als Transkriptionsfaktor und kann die Proliferation geschädigter Zellen verhindern und den programmierten Zelltod einleiten [65]. Aktuelle Studien deuten darauf hin, dass p53 bei der Differenzierung von Pneumozyten eine Rolle spielt [62]. Um die Rolle von p53 bei der Differenzierung von Pneumozyten näher zu betrachten, wurden in das Kulturmedium ab dem Tag des Airlifts ein Inhibitor (10  $\mu\text{mol/l}$ ) bzw. Aktivator (1,5  $\mu\text{mol/l}$ ) von p53 gegeben (Abbildung 14).



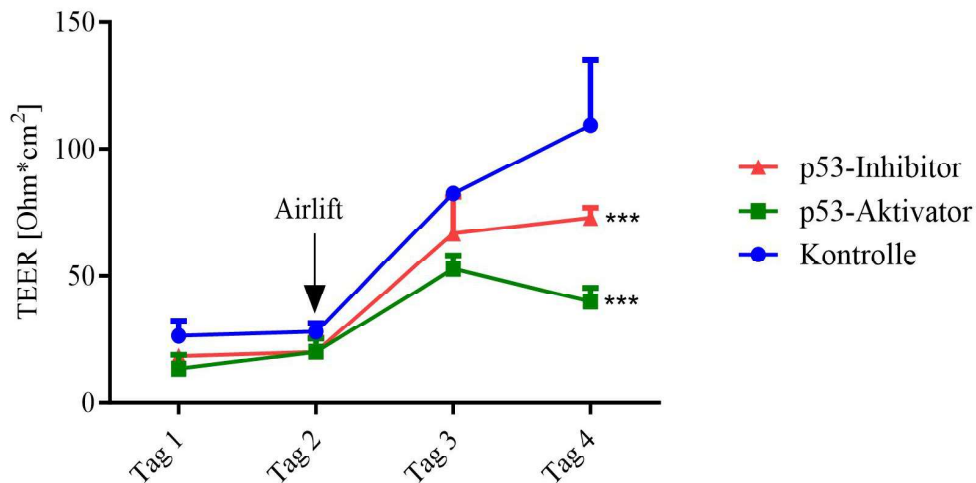
#### Abbildung 14: Versuchsaufbau

Isolierung der murinen alveolaren Epithelzellen aus WT-Mäusen und Aussaat in ALI Kulturen (Tag 0); 48 Stunden später Absaugen des apikalen Mediums und Stimulation mit p53-Aktivator, p53-Inhibitor oder Kontrollmedium (Tag 2); weitere 48 Stunden später Aufnahme der Zellen in Lyse-Puffer zur RT-PCR Analyse und Einfrieren des basolateralen Mediums bei -80 °C (Tag 4).

Das basolaterale Medium wurde 24-stündig gewechselt. Der TEER wurde alle 24 Stunden gemessen. Weitere 48 Stunden nach dem Airlift wurde das basolaterale Medium abgenommen und bei -80°C eingefroren. Die Zellen wurden zur Isolation von mRNA und zur weiteren Analyse mittels RT-PCR in Lyse-Puffer aufgenommen.

In Abbildung 15 ist die Entwicklung des gemessenen TEER über die Zeit dargestellt. Die mit Aktivator-Lösung stimulierten ALI Kulturen zeigten im Vergleich zu den Kontroll-Kulturen eine

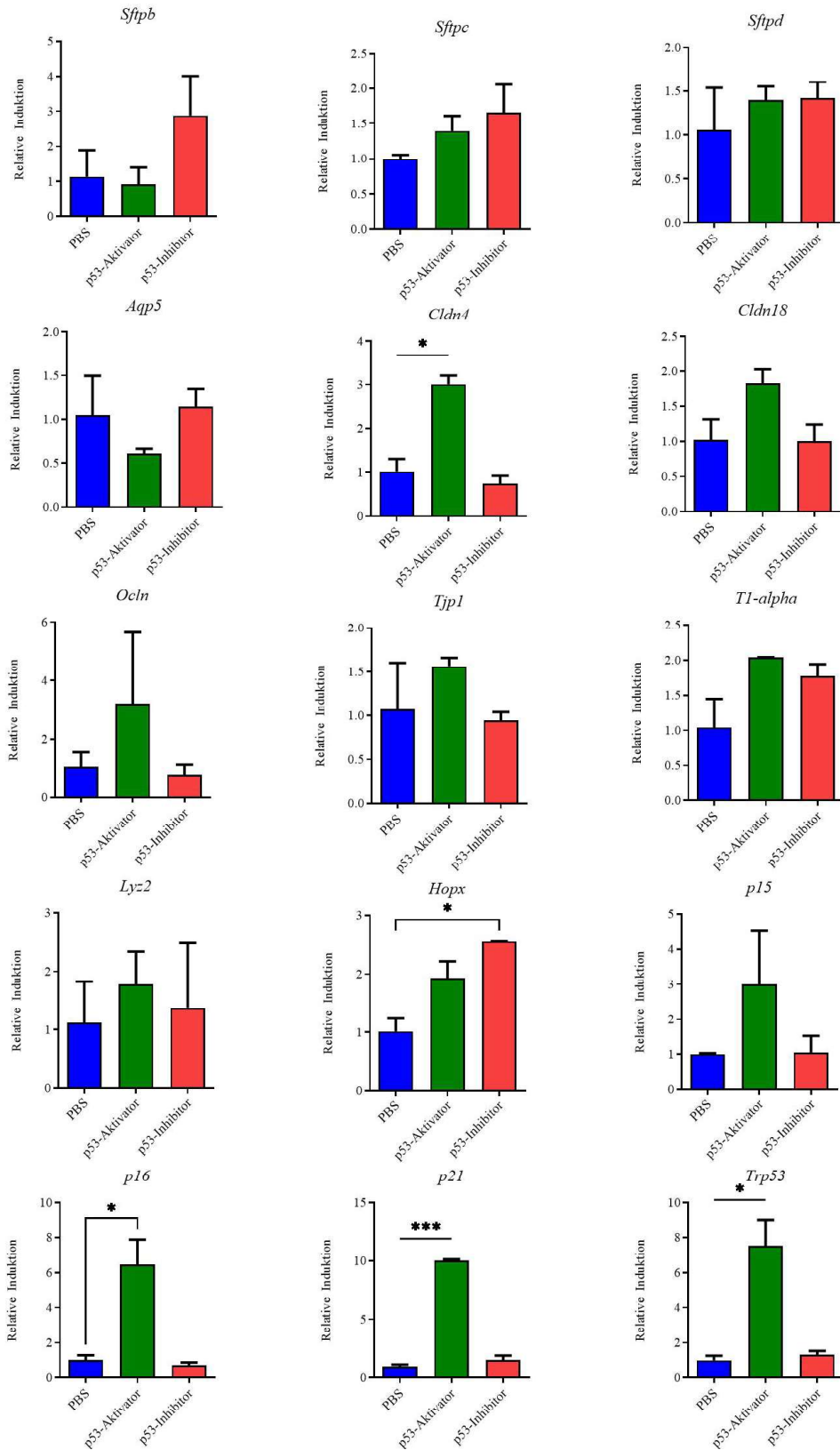
signifikante Verringerung an Tag 3 und Tag 4. Der TEER kultivierter alveolare Epithelzellen, die mit Inhibitor-Lösung behandelt wurden, war an Tag 4 signifikant niedriger als in der nicht stimulierten Gruppe, jedoch signifikant höher als in der Gruppe der mit Aktivator stimulierten ALI Kulturen.



**Abbildung 15: Entwicklung des TEER in kultivierten alveolaren Epithelzellen aus WT-Mäusen**

Aus WT-Mäusen wurden alveolare Epithelzellen isoliert und in ALI Kulturen ausgesät. Während der Kultivierungsphase von 4 Tagen wurde täglich der TEER bestimmt. 48 Stunden nach der Aussaat wurde ein Airlift durchgeführt und mit p53-Aktivator oder p53-Inhibitor stimuliert. Statistik: Daten aus einem Experiment. Two-Way-Anova; MW±SD; Signifikanzniveau: \*\*\*p<0,001.

Weiterhin wurden RT-PCR-Analysen aus der isolierten mRNA durchgeführt (Abbildung 16). Die Expression der Gene *Cldn4*, *p16 (CDKN2A)*, *p21 (Cdkn1a)* und *Trp53* war in den Kulturen, welche mit Aktivator-Lösung behandelt wurden, im Vergleich zu den unbehandelten Kulturen signifikant erhöht. Bei den mit Inhibitor-Lösung stimulierten alveolaren Epithelzellen war die Expression des Gens *Hopx* signifikant erhöht im Vergleich zur nicht stimulierten Kultur. Die übrigen gemessenen Unterschiede waren nicht signifikant.



**Abbildung 16: Relative Induktion nach Stimulation mit p53-Aktivator oder Inhibitor in WT-Mäusen**

Bei alveolaren Epithelzellen wurde 48h nach Aussaat ein Airlift durchgeführt mit p53-Aktivator oder Inhibitor stimuliert. 48 Stunden später wurden die Zellen lysiert und quantitative RT-PCR durchgeführt. Statistik: Daten aus einem Experiment, t-test; MW±SD; Signifikanzniveau: \*p<0,05; \*\*\*p<0,001.

## 7. Diskussion

Bei akuten Lungenerkrankungen wie der Pneumonie und dem Acute Respiratory Distress Syndrom (ARDS) kommt es häufig zu einer massiven Schädigung der Lunge. Hiervon sind besonders die Alveolen bzw. die Pneumozyten betroffen. Auch chronische Lungenerkrankungen sind mit einem Verlust an Lungenstruktur und epithelialen Schäden verbunden. Für ein tieferes Verständnis solcher Erkrankungen ist es wichtig zu verstehen, auf welche Weise das Lungenepithel regeneriert und welche zellulären Mechanismen zu seiner Schädigung beitragen. Die vorliegende Arbeit untersuchte im ALI-Modell, inwiefern das Pathogen NTHi die Regeneration der epithelialen Barriere beeinflusst. Dies ist von Interesse, da chronische Lungenerkrankungen wie die COPD oft mit chronischen Infektionen der Lunge einhergehen und der Kontakt von Pneumozyten mit Bakterien oder bakteriellen Faktoren potentiell die Regenerationsfähigkeit von Pneumozyten beeinflusst.

### 7.1. Exposition mit NTHi beeinflusst die Ausbildung der epithelialen Barriere

Alveolarepithelzellen Typ 2 (AT2-Zellen) haben eine wichtige Funktion bei der Regeneration des Lungenparenchyms nach Schädigung, beispielsweise durch Infektion [66]. In dieser Arbeit wurde ein ALI-Modell verwendet, in dem isolierte Typ 2 Zellen eine epitheliale Barriere aufbauen. Wolf et al. zeigten, dass sich in diesem Modell innerhalb von 5 Tagen eine epitheliale Barriere aufbaut und dies mit einer verminderten Expression von Typ 2 Markern wie Surfactant C und einer gesteigerten Expression von Markern einhergeht, die von Typ 1 Zellen exprimiert werden, z.B. Aquaporin 5 und Claudin 18. Es kommt also zu einer Differenzierung von Typ 2 zu Typ 1 Zellen [74,75]. Dies wird auch von mittels Single-cell sequencing erhobenen Daten der Arbeitsgruppe bestätigt [78]. Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich innerhalb von 48 Stunden nach dem Airlift eine epitheliale Barriere mit einem Widerstand von über  $300 \Omega\text{cm}^2$  aufbaut. Dies ist im Einklang mit der Arbeit von Wolf et. al und den erwähnten Single-cell Analysen mit einer robusten Expression von Typ 1 und Typ 2 Pneumozyten-Markern. Die Single-cell Analysen zeigten zudem, dass am Aufbau der epithelialen Barriere auch Keulenzellen beteiligt sind und diese sich in Richtung Typ 2 Zellen differenzieren [78]. Dies ist im Einklang mit Studien, die zeigten, dass Keulenzellen in der Maus Stammzellen für Pneumozyten sein können. Dies wurde auch in ex vivo Organoid-Modellen gezeigt [12,34].

Ein präliminäres Experiment mit einem Aktivator von p53 unterstreicht, dass das Modell gut genutzt werden kann, um den Einfluss von Wirkstoffen auf die Differenzierung von Lungenepithelzellen bzw. die Ausbildung einer epithelialen Barriere zu testen. Der p53-Aktivator führte zu einer verminderten Barriere und einer gesteigerten Expression p53-regulierter Gene wie p21 und p16.

Lungen von Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen wie der COPD oder der Mukoviszidose sind stark mit Bakterien bzw. bakteriellen PAMPs besiedelt [18,56]. Um zu prüfen,



inwiefern Bakterien in diesem Modell die Bildung der Barriere beeinflussen, wurden am Tag des Airlift inaktivierte NTHi apikal auf die ALI Kulturen gegeben. In einer Serie von Experimenten zeigte sich, dass die Stimulation mit NTHi während der Ausbildung der Barriere zu einem signifikant erhöhten transepithelialen Widerstand führte. Dies weist darauf hin, dass Pneumozyten Bakterien detektieren und dadurch die Regeneration der epithelialen Barriere beschleunigt wird. Möglicherweise führt der Kontakt mit Bakterien bei Lungenepithelzellen zu einer verstärkten Proliferation, was den Aufbau bzw. die Regeneration der epithelialen Barriere beschleunigt. RT-PCR Analysen ergaben, dass die Ausbildung der epithelialen Barriere in Anwesenheit von Bakterien mit einer stark verminderten Expression des Typ 2 Markers Surfactant C einherging. Die Expression des Typ 1 Markers *T1alpha* zeigte sich hingegen hier leicht gesteigert. Dies könnte darauf hindeuten, dass Bakterien in der Regenerationsphase die Differenzierung von Typ 2 Zellen Richtung Typ 1 Zellen verstärken. Weitergehende Analysen wie zum Beispiel Single-cell sequencing könnten in weiteren Studien Aufschluss geben, auf welche Weise Bakterien die Differenzierung von Typ 2 Zellen im Ali-Modell beeinflussen und inwiefern Stammzellfunktionen von Typ 2 Zellen durch Bakterien beeinflusst werden und dies bei Erkrankungen eine Rolle spielt. Hier wäre es interessant zu prüfen, ob akute und chronische bakterielle Belastung dazu führt, dass Typ 2 Zellen zu „pathogenen“ Pneumozyten differenzieren, die den Verlauf der COPD negativ beeinflussen. Solche fehlgeleiteten Pneumozyten wurden bereits für die idiopathischen Lungenfibrose beschrieben [17,24].

Verschiedene Studien zeigten, dass NTHi in der Lunge besonders über TLR2 und TLR4 detektiert werden [27]. Es wurden daher Pneumozyten aus TLR2/4-defizienten Mäusen isoliert und im ALI-Modell mit Pneumozyten aus Wildtyp-Mäusen verglichen. Überraschenderweise zeigte sich in der Ausbildung der epithelialen Barriere zwischen TLR2/4-defizienten Pneumozyten und Wildtyp-Pneumozyten kein signifikanter Unterschied. Auch in der Wirkung von NTHi auf die Expression der Typ 2 (Surfactant C) und Typ 1 (T1alpha) Marker war kein Unterschied nachweisbar. Die durch NTHi induzierte Abgabe des Zytokins KC war bei TLR2/4-Pneumozyten jedoch stark vermindert. Dies zeigt, dass TLR2/4 die NTHi-induzierte Entzündungsreaktion von Pneumozyten vermittelt. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Arbeiten von Jungnickel et al., in denen gezeigt wird, dass die durch inaktivierte NTHi hervorgerufene pulmonale Entzündung in TLR2/4 defizienten Mäusen extrem vermindert ist [27,28]. Diese Ergebnisse legen nahe, dass der durch Bakterien erhöhte transepitheliale Widerstand und die verminderte Expression von Typ 2 Markern unabhängig von TLR2/4 verläuft. Es ist denkbar, dass weitere Rezeptoren und Signalkaskaden wie NOD-abhängige Signalwege durch NTHi aktiviert werden und die Differenzierung von Typ 2 Pneumozyten beeinflussen [84]. Dies scheint plausibel, da auch die Expression von Surfactant C in TLR2/4-defizienten Mäusen stark vermindert ist. Es ist auch denkbar, dass bakterielle Bestandteile post-translational tight junctions und somit den epithelialen Widerstand beeinflussen.

## **7.2. Exposition mit NTHi vermindert die epitheliale Barriere und Expression von Typ 2 Markern in differenzierten Epithelzellen**

Es stellte sich des Weiteren die Frage, inwiefern die Exposition mit NTHi epitheliale Eigenschaften beeinflusst, nachdem sich eine epitheliale Barriere aufgebaut hat. Es zeigte sich, dass NTHi eine Abnahme an epithelialer Barriere induziert. Ähnliches wurde auch schon für Atemwegsepithelzellen gezeigt. Chun et al. zeigten, dass bakterielle Faktoren, über TLR2, die Ausschüttung von  $\text{Ca}^{2+}$  in Atemwegsepithelzellen Signale induzieren [16]. Dies führt über den Protease-abhängigen Abbau von Occludin und E-Cadherin zu einer Verminderung der epithelialen Barriere und ermöglicht die Rekrutierung bzw. den Übertritt von Leukozyten an die epitheliale Oberfläche. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Bakterien über TLR2 sowie p38 MAPK und TGF- $\beta$  abhängige Signalwege Bestandteile der Tight Junctions herunterregulieren und dies zu einem Verlust an epithelialer Barriere führt [11]. Da in dieser Arbeit die Stimulation mit NTHi keinen Einfluss auf die Expression von Tight Junction Faktoren wie Occludin hatte, ist es denkbar, dass die verminderte Barriere post-transkriptionell, z.B. über Proteasen, vermittelt wird, ähnlich, wie in der Arbeit von Chun et al.. Inwieweit die in dieser Arbeit beobachteten Effekte über TLR2 vermittelt werden – Studien zeigten, dass das Gram-negative Bakterium NTHi auch TLR2 aktivieren kann – oder über andere Rezeptoren wie TLR4, die ähnliche Signalkaskaden aktivieren, ist allerdings unklar [27]. Neben dem Verlust epithelialer Barriere führte die Stimulation mit NTHi zu einer starken Verminderung der Expression von Typ 2 Markern wie *Sftpb* und *Sftpc*. Der zugrunde liegende Mechanismus hierfür ist unklar. Es ist denkbar, dass die Verminderung der Barriere bei akuter Stimulation mit Bakterien wie bei Atemwegsepithelzellen die Rekrutierung von Leukozyten wie neutrophilen Granulozyten unterstützt [16]. Dies könnte mit einer Aktivierung von Stammzeleigenschaften in Typ 2 Zellen einhergehen, um Gewebeschäden auszugleichen. Außerdem könnte es auch zu einer vorübergehenden verminderten Expression von *Sftpc* führen. Weitere Studien, die moderne Methoden wie Single-cell sequencing nutzen, könnten hier Aufschluss geben, inwiefern die Stimulation mit NTHi zu einer De- bzw. transienten Umdifferenzierung von Typ 2 Zellen führt.

## **7.3. Aus DKK3-defizienten Mäusen isolierte epitheliale Zellen bilden eine verminderte epitheliale Barriere aus**

Verschiedene Studien zeigten, dass DKK3 auf die Aktivierung von Wnt-abhängigen Signalwegen wirkt und dass Wnt Stammzellfunktionen von Pneumozyten reguliert [20,55]. Um Hinweise auf die Funktion von DKK3 bei der Ausbildung der epithelialen Barriere zu erlangen, wurden epitheliale Zellen aus DKK3-defizienten Mäusen isoliert. Es zeigte sich, dass DKK3-defiziente

Lungenepithelzellen eine stark verminderte Barriere ausbildeten. Dies ging mit einer verminderten Expression von Pneumozyten-Markern einher. Diese Daten legten zunächst nahe, dass DKK3-defiziente Pneumozyten eine verminderte Differenzierung aufweisen. Single-cell Analysen der Arbeitsgruppe zeigten jedoch, dass sich kein Unterschied in der Ausprägung der Pneumozyten bzw. der Differenzierung der Typ 2 zu Typ 1 Pneumozyten zwischen WT und DKK-3-defizienten Zellen zeigte. Vielmehr war der Anteil an Keulenzellen bei aus DKK3-defizienten Mäusen isolierten Epithelzellen nach vier Tagen auf Transwells erhöht (Daten in Vorbereitung zur Publikation). Die verminderte epitheliale Barriere und Expression von Pneumozyten Markern scheint daher eher ein Resultat der unterschiedlichen Verhältnisse zwischen Pneumozyten und Keulenzellen zu sein. Inwiefern DKK3 zur Differenzierung von Keulenzellen in Richtung Pneumozyten beiträgt, bedarf weiterer Studien.

## 8. Ausblick

Die koordinierte Differenzierung verschiedener Zelltypen mit Stammzellkapazität ist für die Lungenhomöostase und -regeneration von wesentlicher Bedeutung. Im Alveolarbereich sind sich selbst erneuernde AT2-Zellen Vorläuferzellen von Alveolarepithelzellen Typ 1 (AT1-Zellen). AT2-Zellen haben aus diesem Grund eine wichtige Funktion bei der Homöostase und Regeneration des Lungenparenchyms nach Schäden, beispielsweise durch eine Infektion. Es wird vermutet, dass bei chronischen Lungenerkrankungen wie der COPD, der Mukoviszidose und Asthma die Differenzierungsfähigkeit der Stammzellen in der gesamten Lunge nachhaltig abnimmt, was zu abnormalen Zelltypen und daher sehr wahrscheinlich zum Verlust an Lungenfunktion führt. Es stellt sich daher die Frage, inwiefern eine bakterielle Exposition die Stammzeleigenschaften von AT2 Zellen beeinflusst. Dies könnte in weiteren Experimenten im ALI-Modell mittels Single-cell sequencing analysiert werden, da diese Methodik eine tiefgehende Analyse von Differenzierungswegen und den zugrundeliegenden Signalwegen erlaubt. Ergänzend hierzu könnten Proben aus Patienten analysiert werden. Die erzielten Ergebnisse sind gerade vor dem Hintergrund von Stammzelltherapien, die auch im Bereich der chronischen Lungenerkrankungen entwickelt werden, von Interesse.

## 9. Literaturverzeichnis

1. Alysandratos KD, Herriges MJ, Kotton DN (2021) Epithelial Stem and Progenitor Cells in Lung Repair and Regeneration. *Annu Rev Physiol* 83:529–550
2. Antunes MB, Woodworth BA, Bhargava G, Xiong G, Aguilar JL, Ratner AJ, Kreindler JL, Rubenstein RC, Cohen NA (2007) Murine nasal septa for respiratory epithelial air-liquid interface cultures. *Biotechniques* 43:195–204
3. Arezina R, Chen T, Wang D (2023) Conventional, Complementary and Alternative Medicines: Mechanistic Insights into Therapeutic Landscape of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Int J COPD* 18:447–457
4. Baarsma H, Skronska-Wasek W, Mutze K, Ciolek F, John-Schuster G, Smits R, Yildirim AÖ, Königshoff M (2016) Non-canonical WNT-5A signaling attenuates endogenous lung repair in COPD. PA4014
5. Bain CC, MacDonald AS (2022) The impact of the lung environment on macrophage development, activation and function: diversity in the face of adversity. *Mucosal Immunol* 15:223–234
6. Baldassi D, Gabold B, Merkel OM (2021) Air–Liquid Interface Cultures of the Healthy and Diseased Human Respiratory Tract: Promises, Challenges, and Future Directions. *Adv NanoBiomed Res* 1:2000111
7. Bals R, Beisswenger C, Blouquit S, Chinet T (2004) Isolation and air-liquid interface culture of human large airway and bronchiolar epithelial cells. *J Cyst Fibros Off J Eur Cyst Fibros Soc* 3 Suppl 2:49–51
8. Barberà JA, Peinado VI, Santos S (2003) Pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 21:892–905
9. Barkauskas CE, Cronce 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. *J Clin Invest* 123:3025–3036
10. Basil MC, Cardenas-Diaz FL, Kathiriya JJ, Morley MP, Carl J, Brumwell AN, Katzen J, Slovik KJ, Babu A, Zhou S, Kremp MM, McCauley KB, Li S, Planer JD, Hussain SS, Liu X, Windmueller R, Ying Y, Stewart KM, Oyster M, Christie JD, Diamond JM, Engelhardt JF, Cantu E, Rowe SM, Kotton DN, Chapman HA, Morrissey EE (2022) Human distal airways contain a multipotent secretory cell that can regenerate alveoli. *Nature* 604:120–126

11. Beisswenger C, Coyne CB, Shchepetov M, Weiser JN (2007) Role of p38 MAP kinase and transforming growth factor- $\beta$  signaling in transepithelial migration of invasive bacterial pathogens. *J Biol Chem* 282:28700–28708
12. Bender Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S, Crowley D, Bronson RT, Jacks T (2005) Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 121:823–835
13. Brune K, Frank J, Schwingshackl A, Finigan J, Sidhaye VK (2015) Pulmonary epithelial barrier function: Some new players and mechanisms. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 308:L731–L745
14. Butler CR, Hynds RE, Gowers KHC, Lee DDH, Brown JM, Crowley C, Teixeira VH, Smith CM, Urbani L, Hamilton NJ, Thakrar RM, Booth HL, Birchall MA, De Coppi P, Giangreco A, O’Callaghan C, Janes SM (2016) Rapid expansion of human epithelial stem cells suitable for airway tissue engineering. *Am J Respir Crit Care Med* 194:156–168
15. Chroneos Z, Sever-Chroneos Z, Shepherd V (2010) Pulmonary surfactant: An immunological perspective. *Cell Physiol Biochem* 25:13–26
16. Chun J, Prince A (2009) Ca<sup>2+</sup> signaling in airway epithelial cells facilitates leukocyte recruitment and transepithelial migration. *J Leukoc Biol* 86:1135–1144
17. Confalonieri P, Volpe MC, Jacob J, Maiocchi S, Salton F, Ruaro B, Confalonieri M, Braga L (2022) Regeneration or Repair? The Role of Alveolar Epithelial Cells in the Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF). *Cells* 11:2095
18. De Rose V, Molloy K, Gohy S, Pilette C, Greene CM (2018) Airway epithelium dysfunction in cystic fibrosis and COPD. *Mediators Inflamm* 2018:1309746
19. Federico G, Meister M, Mathow D, Heine GH, Moldenhauer G, Popovic Z V., Nordström V, Kopp-Schneider A, Hielscher T, Nelson PJ, Schaefer F, Porubsky S, Fliser D, Arnold B, Gröne HJ (2016) Tubular Dickkopf-3 promotes the development of renal atrophy and fibrosis. *JCI Insight* 1:1–15
20. Ferrari N, Ranftl R, Chicherova I, Slaven ND, Moendarbary E, Farrugia AJ, Lam M, Semiannikova M, Westergaard MCW, Tchou J, Magnani L, Calvo F (2019) Dickkopf-3 links HSF1 and YAP/TAZ signalling to control aggressive behaviours in cancer-associated fibroblasts - Supplement. *Nat Commun* 10:1–24
21. Frank DB, Peng T, Zepp JA, Snitow M, Vincent TL, Penkala IJ, Cui Z, Herriges MJ, Morley MP, Zhou S, Lu MM, Morrissey EE (2016) Emergence of a Wave of Wnt Signaling that

- Regulates Lung Alveologenesis by Controlling Epithelial Self-Renewal and Differentiation. *Cell Rep* 17:2312–2325
22. Fujimura T, Enomoto Y, Katsura H, Ogawa T, Baba S, Ogata A, Yamaoka A, Shiroguchi K, Morimoto M (2023) Identifying a Lung Stem Cell Subpopulation by Combining Single-Cell Morphometrics, Organoid Culture, and Transcriptomics. *Stem Cells* 41:809–820
  23. Gibson GJ, Loddenkemper R, Lundbäck B, Sibille Y (2013) Respiratory health and disease in Europe: The new European Lung White Book. *Eur Respir J* 42:559–563
  24. Habermann AC, Gutierrez AJ, Bui LT, Yahn SL, Winters NI, Calvi CL, Peter L, Chung MI, Taylor CJ, Jetter C, Raju L, Roberson J, Ding G, Wood L, Sucre JMS, Richmond BW, Serezani AP, McDonnell WJ, Mallal SB, Bacchetta MJ, Loyd JE, Shaver CM, Ware LB, Bremner R, Walia R, Blackwell TS, Banovich NE, Kropski JA (2020) Single-cell RNA sequencing reveals profibrotic roles of distinct epithelial and mesenchymal lineages in pulmonary fibrosis. *Sci Adv* 6:eaba1972
  25. Herold G (2016) *Innere Medizin*. Gerd Herold, Köln
  26. Jardim JR, Camelier A, Lundgren F (2020) Global strategy for diagnosis, management and prevention of COPD 2020 update. *Glob Initi Chronic Obstr Lung Dis* 1:1–141
  27. Jungnickel C, Schmidt LH, Bittigkoffer L, Wolf L, Wolf A, Ritzmann F, Kamyschnikow A, Herr C, Menger MD, Spieker T, Wiewrodt R, Bals R, Beisswenger C (2017) IL-17C mediates the recruitment of tumor-associated neutrophils and lung tumor growth. *Oncogene* 36:4182–4190
  28. Jungnickel C, Schnabel PA, Bohle R, Wiewrodt R, Herr C, Bals R, Beisswenger C (2017) Nontypeable *Haemophilus influenzae*-Promoted Proliferation of Kras-Induced Early Adenomatous Lesions Is Completely Dependent on Toll-Like Receptor Signaling. *Am J Pathol* 187:973–979
  29. Kathiriya JJ, Brumwell AN, Jackson JR, Tang X, Chapman HA (2020) Distinct Airway Epithelial Stem Cells Hide among Club Cells but Mobilize to Promote Alveolar Regeneration. *Cell Stem Cell* 26:346–358.e4
  30. Ko FW, Chan KP, Hui DS, Goddard JR, Shaw JG, Reid DW, Yang IA (2016) Acute exacerbation of COPD. *Respirology* 21:1152–1165
  31. Kumar H, Kawai T, Akira S (2009) Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun* 388:621–625

32. Lambertsen KL, Østergaard K, Clausen BH, Hansen S, Stenvang J, Thorsen SB, Meldgaard M, Kristensen BW, Hansen PB, Sorensen GL, Finsen B (2014) No effect of ablation of surfactant protein-D on acute cerebral infarction in mice. *J Neuroinflammation* 11:1–13
33. Lee JH, Tammela T, Hofree M, Choi J, Marjanovic ND, Han S, Canner D, Wu K, Paschini M, Bhang DH, Jacks T, Regev A, Kim CF (2017) Anatomically and Functionally Distinct Lung Mesenchymal Populations Marked by Lgr5 and Lgr6. *Cell* 170:1149-1163.e12
34. Lee JH, Tammela T, Hofree M, Choi J, Marjanovic ND, Han S, Canner D, Wu K, Paschini M, Bhang DH, Jacks T, Regev A, Kim CF (2017) Anatomically and Functionally Distinct Lung Mesenchymal Populations Marked by Lgr5 and Lgr6. *Cell* 170:1149-1163.e12
35. Leiby KL, Raredon MSB, Niklason LE (2020) Bioengineering the blood-gas barrier. *Compr Physiol* 10:415–452
36. Leung JM, Tiew PY, Mac Aogáin M, Budden KF, Yong VFL, Thomas SS, Pethe K, Hansbro PM, Chotirmall SH (2017) The role of acute and chronic respiratory colonization and infections in the pathogenesis of COPD. *Respirology* 22:634–650
37. Liu Q, Liu K, Cui G, Huang X, Yao S, Guo W, Qin Z, Li Y, Yang R, Pu W, Zhang L, He L, Zhao H, Yu W, Tang M, Tian X, Cai D, Nie Y, Hu S, Ren T, Qiao Z, Huang H, Zeng YA, Jing N, Peng G, Ji H, Zhou B (2019) Lung regeneration by multipotent stem cells residing at the bronchioalveolar-duct junction. *Nat Genet* 51:728–738
38. Lüllmann-Rauch R (2015) Taschenlehrbuch Histologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
39. Mantovani S, Oliviero B, Varchetta S, Renieri A, Mondelli MU (2023) TLRs: Innate Immune Sentries against SARS-CoV-2 Infection. *Int J Mol Sci* 24:1–21
40. Miyoshi H, Ajima R, Luo CT, Yamaguchi TP, Stappenbeck TS (2013) Regeneration after Tissue Injury. *Science* (80- ) 338:108–113
41. 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, Waghay 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
42. Morrell N (2009) Heart and Lung Disease review series. *Chron Respir Dis* 6:175–175
43. Nakamura REI, Hunter DD, Yi H, Brunken WJ, Hackam AS (2007) Identification of two novel activities of the Wnt signaling regulator Dickkopf 3 and characterization of its expression in the



- mouse retina. *BMC Cell Biol* 8:1–10
44. Oh C, Verma A, Aachoui Y (2020) Caspase-11 Non-canonical Inflammasomes in the Lung. *Front Immunol* 11:1–10
  45. Opitz B, Van Laak V, Eitel J, Suttorp N (2010) Innate immune recognition in infectious and noninfectious diseases of the lung. *Am J Respir Crit Care Med* 181:1294–1309
  46. Overgaard CE, Mitchell LA, Koval M (2012) Roles for claudins in alveolar epithelial barrier function. *Ann N Y Acad Sci* 1257:167–174
  47. Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S (2014) *Physiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
  48. Park JE, Woo SW, Kim MB, Kim C, Hwang JK (2017) Standardized *Kaempferia parviflora* Extract Inhibits Intrinsic Aging Process in Human Dermal Fibroblasts and Hairless Mice by Inhibiting Cellular Senescence and Mitochondrial Dysfunction. *Evidence-based Complement Altern Med* 2017:6861085
  49. Plasschaert LW, Žilionis R, Choo-wing R, Savova V, Knehr J, Roma G, Klein AM, Jaffe AB (2018) the CFTR-rich pulmonary ionocyte. *Nature* 560:377–381
  50. Pouwels SD, Heijink IH, Ten Hacken NHT, Vandenabeele P, Krysko D V., Nawijn MC, Van Oosterhout AJM (2014) DAMPs activating innate and adaptive immune responses in COPD. *Mucosal Immunol* 7:215–226
  51. Rawlins EL, Okubo T, Xue Y, Brass DM, Auten RL, Hasegawa H, Wang F, Hogan BLM (2009) The Role of Scgb1a1+ Clara Cells in the Long-Term Maintenance and Repair of Lung Airway, but Not Alveolar, Epithelium. *Cell Stem Cell* 4:525–534
  52. Ritzmann F (2020) Einfluss der PD-1 / PD-L1-Achse auf den entzündungsinduzierten Lungenschaden in der COPD.
  53. Sandelowsky H, Weinreich UM, Aarli BB, Sundh J, Høines K, Stratelis G, Løkke A, Janson C, Jensen C, Larsson K (2021) COPD – do the right thing. *BMC Fam Pract* 22:1–17
  54. Schneider JL, Rowe JH, Garcia-de-alba C, Kim CF, Sharpe AH, Haigis MC (2021) II The aging lung : Physiology , disease , and immunity. *Cell* 184:1990–2019
  55. Schunk SJ, Floege J, Fliser D, Speer T (2021) WNT– $\beta$ -catenin signalling — a versatile player in kidney injury and repair. *Nat Rev Nephrol* 17:172–184
  56. Sethi S (2010) Infection as a comorbidity of COPD. *Eur Respir J* 35:1209–1215
  57. Short B, Carson S, Devlin AC, Reihill JA, Crilly A, MacKay W, Ramage G, Williams C,

- Lundy FT, McGarvey LP, Thornbury KD, Martin SL (2021) Non-typeable *Haemophilus influenzae* chronic colonization in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Crit Rev Microbiol* 47:192–205
58. Spella M, Lilis I, Pepe MAA, Chen Y, Armaka M, Lamort AS, Zazara DE, Roumelioti F, Vreka M, Kanellakis NI, Wagner DE, Giannou AD, Armenis V, Arendt KAM, Klotz L V., Toumpanakis D, Karavana V, Zakynthinos SG, Giopanou I, Marazioti A, Aidinis V, Sotillo R, Stathopoulos GT (2019) Club cells form lung adenocarcinomas and maintain the alveoli of adult mice. *Elife* 8:1–32
  59. Srinivasan B, Shuler L, Hickman JJ (2015) TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems.
  60. Steimer A, Laue M, Franke H, Haltner-Ukomado E, Lehr CM (2006) Porcine alveolar epithelial cells in primary culture: Morphological, bioelectrical and immunocytochemical characterization. *Pharm Res* 23:2078–2093
  61. Strnad P, McElvaney NG, Lomas DA (2020) Alpha(1)-Antitrypsin Deficiency. *N Engl J Med* 382:1443–1455
  62. Strunz M, Simon LM, Ansari M, Kathiriya JJ, Angelidis I, Mayr CH, Tsidiridis G, Lange M, Mattner LF, Yee M, Ogar P, Sengupta A, Kukhtevich I, Schneider R, Zhao Z, Voss C, Stoeger T, Neumann JHL, Hilgendorff A, Behr J, O'Reilly M, Lehmann M, Burgstaller G, Königshoff M, Chapman HA, Theis FJ, Schiller HB (2020) Alveolar regeneration through a Krt8+ transitional stem cell state that persists in human lung fibrosis. *Nat Commun* 11:3559
  63. Sultan M, Wilson K, Abdulla OA, Busbee PB, Hall A, Carter T, Singh N, Chatterjee S, Nagarkatti P, Nagarkatti M (2021) Endocannabinoid anandamide attenuates acute respiratory distress syndrome through modulation of microbiome in the gut–lung axis. *Cells* 10:3305
  64. Tecele T, Tripathi S, Hartshorn KL (2010) Defensins and cathelicidins in lung immunity. *Innate Immun* 16:151–159
  65. Tonelli C, Morelli MJ, Sabò A, Verrecchia A, Rotta L, Capra T, Bianchi S, Campaner S, Amati B (2017) Genome-wide analysis of p53-regulated transcription in Myc-driven lymphomas. *Oncogene* 36:2921–2929
  66. Toth A, Kannan P, Snowball J, Kofron M, Wayman JA, Bridges JP, Miraldi ER, Swarr D, Zacharias WJ (2023) Alveolar epithelial progenitor cells require Nkx2-1 to maintain progenitor-specific epigenomic state during lung homeostasis and regeneration. *Nat Commun* 14:8452

67. Van Itallie CM, Anderson JM (2014) Architecture of tight junctions and principles of molecular composition. *Semin Cell Dev Biol* 36:157–165
68. Verheyden JM, Sun X (2020) A transitional stem cell state in the lung. *Nat Cell Biol* 19–20
69. Wang H, He L, Liu B, Feng Y, Zhou H, Zhang Z, Wu Y, Wang J, Gan Y, Yuan T, Wu M, Xie X, Feng Z (2018) Establishment and comparison of air-liquid interface culture systems for primary and immortalized swine tracheal epithelial cells. *BMC Cell Biol* 19:1–10
70. Wang H, Guo M, Wei H, Chen Y (2023) Targeting p53 pathways: mechanisms, structures, and advances in therapy. *Signal Transduct Target Ther* 8:1–35
71. Weng JS, Nakamura T, Moriizumi H, Takano H, Yao R, Takekawa M (2019) MCRIP1 promotes the expression of lung-surfactant proteins in mice by disrupting CtBP-mediated epigenetic gene silencing. *Commun Biol* 2:1–11
72. Whitsett JA (2014) Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nat Immunol* 16:339351
73. Wittekindt OH (2017) Tight junctions in pulmonary epithelia during lung inflammation. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 469:135–147
74. Wolf L, Sapich S, Honecker A, Jungnickel C, Seiler F, Bischoff M, Wonenberg B, Herr C, Schneider-Daum N, Lehr CM, Bals R, Beisswenger C (2016) IL-17A-mediated expression of epithelial IL-17C promotes inflammation during acute *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 311:L1015–L1022
75. 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
76. Wolf L (2017) Untersuchung der epithelialen Faktoren IL-17C und RAGE bei bakterieller und rauchinduzierter Entzündung der Lunge.
77. World Health Organization (WHO) Mortality Database Health statistics and information systems.
78. Yao Y, Miethe S, Kattler K, Colakoglu B, Walter J, Schneider-Daum N, Herr C, Garn H, Ritzmann F, Bals R, Beisswenger C (2024) Mutual Regulation of Transcriptomes between Murine Pneumocytes and Fibroblasts Mediates Alveolar Regeneration in Air-Liquid Interface Cultures. *Am J Respir Cell Mol Biol* 70:203–214
79. Yin J, Yang L, Xie Y, Liu Y, Li S, Yang W, Xu B, Ji H, Ding L, Wang K, Li G, Chen L, Hu P

- (2018) Dkk3 dependent transcriptional regulation controls age related skeletal muscle atrophy. *Nat Commun* 9:1752
80. Yu B, Kiechl S, Qi D, Wang X, Song Y, Weger S, Mayr A, Le Bras A, Karamariti E, Zhang Z, Barrantes IDB, Niehrs C, Schett G, Hu Y, Wang W, Willeit J, Qu A, Xu Q (2017) A cytokine-like protein dickkopf-related protein 3 is atheroprotective. *Circulation* 136:1022–1036
  81. 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
  82. Zhao L, Yee M, O'Reilly MA (2013) Transdifferentiation of alveolar epithelial type II to type I cells is controlled by opposing TGF- $\beta$  and BMP signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 305:L409-18
  83. Zhou L, Husted H, Moore T, Lu M, Deng D, Liu Y, Ramachandran V, Arumugam T, Niehrs C, Wang H, Chiao P, Ling J, Curran MA, Maitra A, Hung MC, Lee JE, Logsdon CD, Hwang RF (2018) Suppression of stromal-derived Dickkopf-3 (DKK3) inhibits tumor progression and prolongs survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Sci Transl Med* 10:1–31
  84. Zola TA, Lysenko ES, Weiser JN (2013) Both TLR and Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 1. *181:7909–7916*

## 10. Abkürzungsverzeichnis

ALI	Air-Liquid-Interface
AQP5	Aquaporin 5
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrom
AT1	Alveolarrepithelzelle Typ 1
AT2	Alveolarrepithelzelle Typ 2
BSA	Bovines Serumalbumin
BSSB	Balancierte Salz Lösung B
bzw.	beziehungsweise
Cdkn1a	cyclin-dependent kinase inhibitor 1a/p21
Cdkn2a	cyclin-dependent kinase inhibitor 2a/p16
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CLDN18	Claudin 18
Cldn4	Claudin 4
CMM	Complete Mouse Medium
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
DKK3	Dickkopf-related protein 3
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
etc.	et cetera
FBS	Fetales Kälberserum
HEPES	Hydroxyethyl-piperazinyl-ethansulfonsäure
Hopx	Homeodomain-only protein
ITSS	Insulin-Transferrin-Natriumselenit
KC	Keratinocyte-derived chemokine
KCl	Kaliumchlorid
LRP6	Lipoprotein-receptor-related Protein 6
Lyz2	Lysozym 2
MACS	Magnetische Zell-Isolation
MAPK/MAP-Kinase	mitogenaktivierte Proteinkinase
min	Minute
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid

NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren-Lösung
NF- $\kappa$ B	Nukleärer Faktor Kappa B
NTHi	Nicht-typisierter Haemophilus influenzae
Ocln	Occludin
PAMP	Pathogen assoziierte molekulare Muster
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PRR	Mustererkennungsrezeptor
p-wert	Wahrscheinlichkeitswert
RAGE	receptor for advanced glycation endproducts
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotationen pro Minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion
SD	Standardabweichung
sek	Sekunden
SEM	Standardfehler
Sftpb	Surfactant Protein B
Sftpc	Surfactant Protein C
Sftpd	Surfactant Protein D
TEER	Transepithelialer elektrischer Widerstand
TGF- $\beta$	Transformierender Wachstumsfaktor
TJP1/ZO-1	Tight-Junction Protein 1/Zonula Occludens Protein 1
TLR	Toll-like Rezeptor
Trp53	Tumor Protein 53
usw.	und so weiter
WHO	Weltgesundheitsorganisation
Wnt	wingless und Int1
WT	Wildtyp

## 11. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der Epithelien der Lunge .....	8
Abbildung 2: Pathophysiologie der COPD .....	10
Abbildung 3: Aufbau der ALI Kulturen .....	11
Abbildung 4: Erkennung von PAMPs über den Mustererkennungsrezeptor TLR, nach [39,45].....	13
Abbildung 5: Durchführung der TEER Messung [59] .....	24
Abbildung 6: Versuchsaufbau .....	27
Abbildung 7: (A) Entwicklung des TEER in kultivierten alveolaren Epithelzellen aus WT und TLR2/4 <sup>-/-</sup> Mäusen und (B) Quantifizierung der Zytokin KC Ausschüttung .....	28
Abbildung 8: Stimulation mit NTHi vermindert die Expression von <i>Sftpb</i> und <i>Sftpc</i> .....	29
Abbildung 9: Versuchsaufbau .....	30
Abbildung 10: Messung des TEER an Tag 4 .....	30
Abbildung 11: Stimulation mit NTHi hemmt die Expression von <i>Sftpb</i> und <i>Sftpc</i> .....	31
Abbildung 12: Entwicklung des TEER in kultivierten alveolaren Epithelzellen aus WT und <i>Dkk3</i> <sup>-/-</sup> Mäusen.....	32
Abbildung 13: Relative Induktion nach Stimulation mit NTHi in WT und <i>DKK3</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen .....	33
Abbildung 14: Versuchsaufbau .....	34
Abbildung 15: Entwicklung des TEER in kultivierten alveolaren Epithelzellen aus WT-Mäusen.....	35
Abbildung 16: Relative Induktion nach Stimulation mit p53-Aktivator oder Inhibitor in WT-Mäusen	36

## 12. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte und Materialien.....	17
Tabelle 2: Chemikalien, Reagenzien und Kits .....	18
Tabelle 3: Puffer, Lösungen und Kulturmedien .....	19
Tabelle 4: Primer für PCR.....	21

### **13. Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. Robert Bals für die freundliche Überlassung und Supervision des Themas, sowie die wissenschaftliche Förderung.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Christoph Beisswenger für die kompetente wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit und seine fortwährende hervorragende Unterstützung während der gesamten Bearbeitungsphase.

Außerdem bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Felix Ritzmann für die vielfältige ermutigende Unterstützung in allen erdenklichen Fragen, Anleitung bei praktischen Tätigkeiten im Labor und kompetente Unterstützung bei jedmöglichem Problem.

Bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Bals bedanke ich mich herzlich für die freundliche Aufnahme ins Team und die gute Arbeitsatmosphäre.

Zuletzt gilt mein Dank meiner Familie und insbesondere Nicolas, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.



## **14. Lebenslauf**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

Tag der Promotion: 16.09.2024

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. Christoph Beisswenger

Prof. Dr. Michael Zemlin