

Aus der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Aufbau, Optimierung und Charakterisierung eines 3D-humanen Atemwegmodells als Infektionsmodell

D i s s e r t a t i o n

Zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

An der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

| | |
|----------------|---------------|
| Vorgelegt von: | Julian Maurer |
| Aus: | Forchheim |
| Magdeburg | 2024 |

Bibliographische Beschreibung:

Maurer, Julian:

Aufbau, Optimierung und Charakterisierung eines 3D-humanen Atemwegmodells als Infektionsmodell. - 2024. - 94 Bl., 49 Abb., 13 Tab., 0 Anl.

Kurzreferat

Der Aufbau von *in vitro*-Atemwegsmodellen wird sowohl für pathomechanistische Analysen von Atemwegserkrankungen als auch für die Tierversuchsfreie Testung neuer Wirkstoffe immer wichtiger. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 3D-humane Atemwegsmodelle aufgebaut. Primäre, humane Bronchialepithelzellen und Fibroblasten wurden aus Bronchusgewebe isoliert und die Epithelzellen in zwei verschiedenen Medien (AECG oder PC Ex+) kultiviert und mittels Immunfluoreszenz charakterisiert. Zum Aufbau der 3D-Modelle wurden die Epithelzellen auf einer biologischen Kollagenmatrix mit Fibroblasten unter Air-Lift-Bedingungen und in zwei verschiedenen Kulturmedien (AECG oder PC ALI) über 21 Tage kultiviert. Die 3D-Modelle wurden mittels Histologie, Immunfluoreszenzfärbung und TEER-Messungen charakterisiert. Kinozilien wurden durch Western Blots und durch Mikroskopie mit einer Hochgeschwindigkeitskamera charakterisiert. In 2D-Kulturen mit PC ALI wurden vermehrt Ki-67-positive Zellen und eine geringere Anzahl an KRT-14-positiven Zellen festgestellt. In 3D-Modellen führte die Kultivierung mit AECG zu einem hypertrophen Epithelgewebe. Die mit PC ALI kultivierten Modelle entwickelten ein differenziertes Bronchialepithel mit einer höheren Muc5B/AC-Sekretion. TEER-Messungen bestätigten eine stabile Epithelbarriere mit PC ALI. Western Blots zeigten mehr acetyliertes α -Tubulin (Zilienkomponente) mit PC ALI, jedoch bei beiden Medienansätzen eine physiologische Zilienschlagfrequenz. Die mit PC ALI-Medium kultivierten 3D-humanen Atemwegsmodelle zeigten eine hohe *in vivo/in vitro*-Korrelation. Sie schließen eine translationale Lücke zwischen 2D-Kulturen bzw. Modellen mit geringer Komplexität und Tierversuchen.

Schlüsselwörter

Atemwegsmodell, 3D-Kultur, primäre Zellen, Bronchialepithel

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----------|
| Inhaltsverzeichnis | 1 |
| Abkürzungsverzeichnis | 3 |
| Abbildungsverzeichnis | 5 |
| Tabellenverzeichnis..... | 7 |
| 1 Einführung | 8 |
| 1.1 Anatomie und Histologie der Atemwege..... | 8 |
| 1.2 Aufbau und Marker des respiratorischen Flimmerepithels | 9 |
| 1.3 Der Proliferationsmarker Ki-67 | 10 |
| 1.4 <i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> Gewebestudien der Atemwege | 11 |
| 1.5 Methoden zum Nachweis von tumor-spezifischen Eigenschaften | 12 |
| 1.6 Der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) | 13 |
| 1.7 3D-Modellaufbau | 14 |
| 1.8 Ziel der Arbeit | 16 |
| 2 Material | 17 |
| 2.1 Biologisches Material | 17 |
| 2.2 Chemikalien, Lösungen und Puffer | 18 |
| 2.3 Medien, Antibiotika, Inhibitoren und Enzyme..... | 21 |
| 2.4 Antikörper | 23 |
| 2.5 Verbrauchsmaterialien | 24 |
| 2.6 Geräte | 26 |
| 2.7 Software..... | 28 |
| 3 Methoden..... | 29 |
| 3.1 Allgemeine Zellkulturtechniken | 29 |
| 3.2 Aufbau und Kultivierung von 3D-Atemwegsmodellen | 32 |
| 3.3 TEER-Messung | 35 |
| 3.4 Bestimmung der Zilienschlagfrequenz..... | 37 |
| 3.5 Charakterisierung durch Immunfluoreszenz und Histologie..... | 38 |
| 3.6 Proteinbiochemie | 39 |

| | |
|---|----|
| 3.7 WST-1-Assay..... | 42 |
| 3.8 5-ALA-Messung mit MTT-Normalisierung..... | 42 |
| 3.9 Statistische Auswertung | 44 |
| 4 Ergebnisse..... | 45 |
| 4.1 2D-Kultivierung | 45 |
| 4.2 Charakterisierung zum Ausschluss tumoröser Merkmale | 49 |
| 4.3 3D-Modellmorphologie | 53 |
| 4.4 3D-Modelldifferenzierung | 59 |
| 5 Diskussion | 79 |
| 5.1 2D-Kultivierung | 79 |
| 5.2 Charakterisierung zum Ausschluss tumoröser Merkmale | 80 |
| 5.3 3D-Modellmorphologie | 82 |
| 5.4 3D-Modelldifferenzierung | 84 |
| 5.5 Fazit | 86 |
| 6 Zusammenfassung..... | 87 |
| 7 Literaturverzeichnis | 88 |
| Ehrenerklärung..... | 92 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------------------|--|
| 3D | Dreidimensional |
| 5-ALA..... | 5-Aminolävulinsäure |
| ac.- α -Tubulin | Acetyliertes alpha-Tubulin |
| AECG-Medium | Airway epithelial cells growth medium |
| ALI | Air-Lift oder Air-Liquid-Interface |
| APS..... | Adenosinphosphosulfat |
| AVI..... | Audio Video Interleave |
| BSA..... | Bovines Serumalbumin |
| C_c | Kapazität der Lipiddoppelschicht |
| C_e | Kapazität der Elektroden |
| CAFs..... | Krebs-assoziierte Fibroblasten |
| DABCO..... | 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]Octan |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-phenylindol |
| DMEM..... | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DMSO..... | Dimethylsulfoxid |
| ECM..... | Extrazellulärmatrix |
| FGF-2 | Fibroblast growth factor 2 |
| hbEC..... | humane Bronchialepithelzellen |
| hbFb..... | humane bronchiale Fibroblasten |
| HGF | <i>Hepatocyte growth factor</i> |
| HRP | Meerrettichperoxidase (engl: horseradish peroxidase) |
| KRT-14 | Zytokeratin 14 |
| MAP | Mitogen activated protein |
| MCT4 | Monocarboxylattransporter-4 |
| NHBE..... | Normale humane Bronchialepithelzellen |
| p | Signifikantswert |

| | |
|---------------------------|---|
| PC ALI | PneumaCult ALI-Medium |
| PC Ex+ | PneumaCult Ex+-Medium |
| Pen/Strep/Myc | Penicillin, Streptomycin, Antimykotikum |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| PpIX | Protoporphyrin IX, Protoporphyrin IX |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| R^2 | Bestimmtheitsmaß |
| R_{Medium} | Widerstand des Mediums |
| R_{TEER} | Ohmscher Widerstand |
| ROCK | Rho Kinase Inhibitor |
| ROI's | Regions of interest |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS-Page | Sodium dodecylsulfat polyacrylamidgel electrophoresis |
| SIS | Small intestinal submucosa |
| TBST | Tris buffered Saline with Tween20 |
| TEER | Transepithelialer elektrischer Widerstand |
| TEMED | Thermo Scientific Pierce Tetramethylethylendiamin |
| VEGF | Vasucular endothelial growth factor |
| WST-1 | Water soluble tetrazolium 1 |
| ZO-1 | Zonula occludens-Protein 1 |
| α -SMA | Alpha Smooth Muscle Aktin |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Aufbau der Atemwege | 8 |
| Abbildung 2: Das respiratorische Epithel | 9 |
| Abbildung 3: Proliferationsmarker Ki-67 | 11 |
| Abbildung 4: Krebs-assoziierte Fibroblasten | 13 |
| Abbildung 5: Die TEER-Messung | 14 |
| Abbildung 6: Modellaufbau | 15 |
| Abbildung 7: Bronchusgewebe | 29 |
| Abbildung 8: Versuchsablauf | 33 |
| Abbildung 9: Aufbau der Zellkronen mit SIS | 34 |
| Abbildung 10: TEER-Messprinzip | 35 |
| Abbildung 11: Zellmorphologie nach Isolierung | 45 |
| Abbildung 12: Zellausbeute | 46 |
| Abbildung 13: Ki-67-Immunfluoreszenzfärbung in 2D-Kultur..... | 47 |
| Abbildung 14: WST-1-Assay | 47 |
| Abbildung 15: p63-Immunfluoreszenzfärbung in 2D-Kultur..... | 48 |
| Abbildung 16: KRT-14-Immunfluoreszenzfärbung in 2D-Kultur..... | 49 |
| Abbildung 17: Immunfluoreszenzfärbung gegen CAF-Marker in 2D-Kultur..... | 50 |
| Abbildung 18: Immunfluoreszenz gegen CAF-Marker in 3D-Kultur..... | 51 |
| Abbildung 19: 5-ALA-Messung | 52 |
| Abbildung 20: Alcianblau-Färbung an AECG-Modellen..... | 54 |
| Abbildung 21: Alcianblau-Färbung an PC ALI-Modellen..... | 55 |
| Abbildung 22: Alcianblau-Färbung am nativen Bronchus..... | 55 |
| Abbildung 23: Messung der Epitheldicke | 56 |
| Abbildung 24: Vimentin-Immunfluoreszenzfärbung in 3D-Kultur..... | 57 |
| Abbildung 25: Vimentin-Immunfluoreszenzfärbung am nativen Bronchus..... | 58 |
| Abbildung 26: Auswertung der Vimentin-Immunfluoreszenzfärbung..... | 58 |
| Abbildung 27: Muc5B-Immunfluoreszenzfärbung in 3D-Kultur..... | 59 |
| Abbildung 28: Muc5B-Immunfluoreszenzfärbung am nativen Bronchus..... | 60 |
| Abbildung 29: Auswertung der Muc5B-Immunfluoreszenzfärbung..... | 61 |
| Abbildung 30: Muc5AC-Immunfluoreszenzfärbung in 3D-Kultur..... | 61 |
| Abbildung 31: Muc5AC-Immunfluoreszenzfärbung am nativen Bronchus..... | 62 |
| Abbildung 32: Auswertung der Muc5AC-Immunfluoreszenzfärbung..... | 63 |
| Abbildung 33: E-Cadherin-Immunfluoreszenzfärbung in 3D-Kultur..... | 64 |
| Abbildung 34: E-Cadherin-Immunfluoreszenzfärbung am nativen Bronchus..... | 64 |
| Abbildung 35: Auswertung der E-Cadherin-Immunfluoreszenzfärbung..... | 65 |
| Abbildung 36: p63-Immunfluoreszenzfärbung in 3D-Kultur..... | 66 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 37: p63-Immunfluoreszenzfärbung am nativen Bronchus..... | 66 |
| Abbildung 38: Auswertung der p63-Immunfluoreszenzfärbung..... | 67 |
| Abbildung 39: Ac.- α -Tubulin-Immunfluoreszenzfärbung in 3D-Kultur..... | 68 |
| Abbildung 40: Ac.- α -Tubulin-Immunfluoreszenzfärbung am nativen Bronchus..... | 68 |
| Abbildung 41: Auswertung der ac.- α -Tubulin-Immunfluoreszenzfärbung..... | 69 |
| Abbildung 42: Western Blot gegen ac.- α -Tubulin..... | 70 |
| Abbildung 43: Prinzip der Zilienschlagfrequenzmessung | 72 |
| Abbildung 44: Auswertung der Zilienschlagfrequenzen | 72 |
| Abbildung 45: Barriereigenschaften in 3D-Kultur..... | 75 |
| Abbildung 46: ZO-1-Immunfluoreszenzfärbung am nativen Bronchus..... | 76 |
| Abbildung 47: Barrierefunktion der Kontrollmodelle | 76 |
| Abbildung 48: Auswertung der ZO-1-Immunfluoreszenzfärbung..... | 77 |
| Abbildung 49: Zusammenfassung der TEER-Werte | 78 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Übersicht verwendeter Probanden | 17 |
| Tabelle 2: Chemikalien..... | 18 |
| Tabelle 3: Lösungen und Puffer | 20 |
| Tabelle 4: Weitere Reagenzien..... | 21 |
| Tabelle 5: Kits..... | 21 |
| Tabelle 6: Medien und Antibiotika | 21 |
| Tabelle 7: Inhibitoren und Enzyme | 22 |
| Tabelle 8: Primäre Antikörper | 23 |
| Tabelle 9: Sekundäre Antikörper | 24 |
| Tabelle 10: Einmalartikel und sonstige Materialien | 24 |
| Tabelle 11: Laborgeräte | 26 |
| Tabelle 12: Software | 28 |
| Tabelle 13: Übersicht über erzielte Versuchszahlen der TEER-Messung..... | 73 |

1 Einführung

1.1 Anatomie und Histologie der Atemwege

Die Lunge hat die Aufgabe des Gasaustauschs, bei dem durch den Stoffwechsel anfallendes Kohlenstoffdioxid (CO_2) abgegeben und für die Zellatmung benötigter Sauerstoff (O_2) aufgenommen wird. Die Atemwege bilden das konduktive (=luftleitende) System, welches nicht am Gasaustausch teilnimmt. Die Nasenhöhle, der Rachen, der Kehlkopf, die Trachea und die Hauptbronchien bilden die extrapulmonalen Anteile, die Bronchien und Bronchiolen die intrapulmonalen. Die Trachea teilt sich an der *Bifurcatio tracheae* in zwei Hauptbronchien. Diese teilen sich wiederum in drei (rechts) und zwei (links) Lappenbronchien, die sich wiederum in zwei bis fünf Segmentbronchien aufteilen. Der Bronchialbaum wird im Verlauf über die Subsegmentbronchien und die Bronchioli immer feiner. Der rein luftleitende Teil endet im *Bronchiolus terminalis*, während die *Bronchioli respiratorii* bereits dem Gasaustausch dienen (Lippert 2011, Lüllmann-Rauch and Asan 2015).

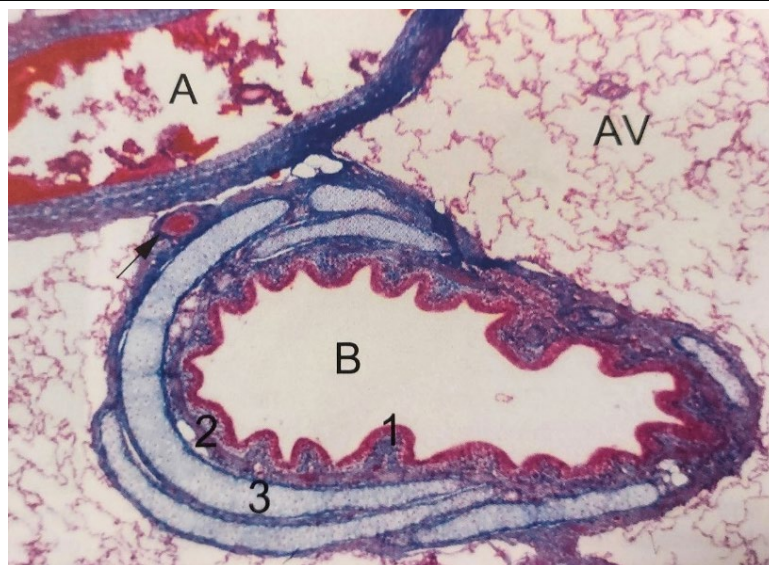


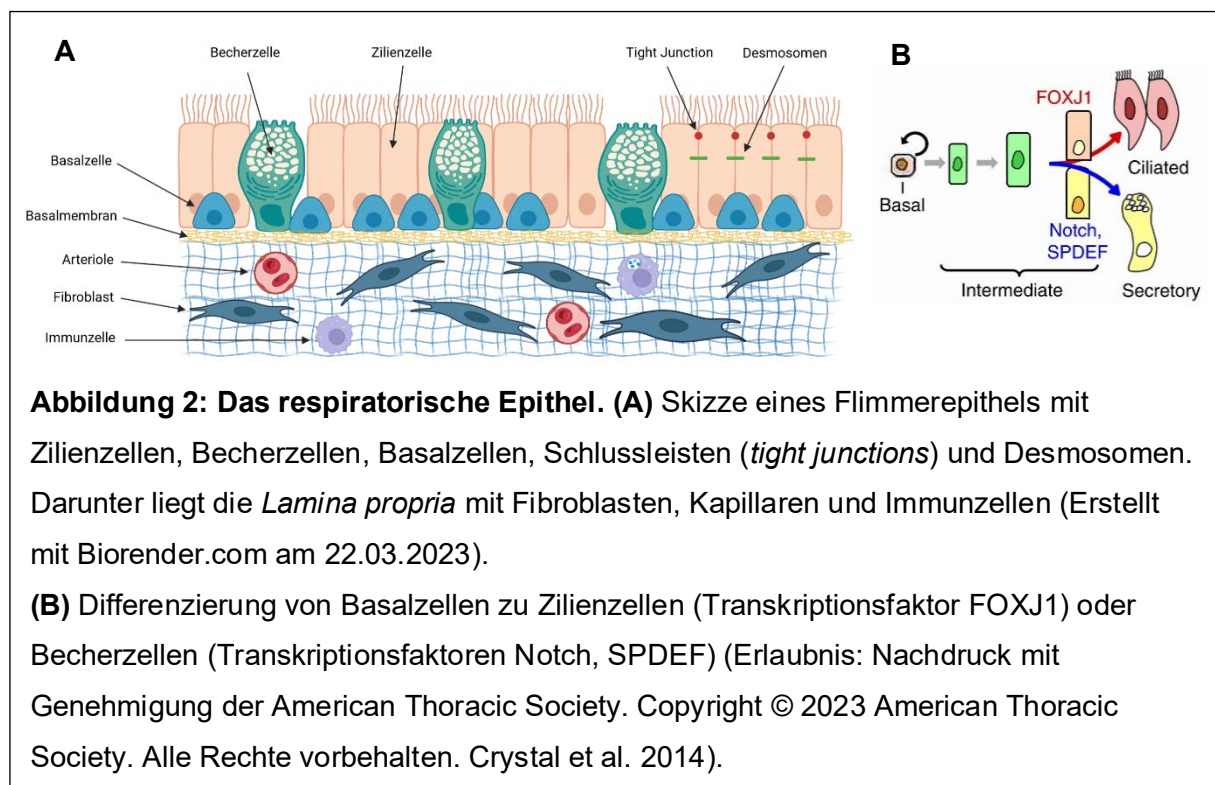
Abbildung 1: Aufbau der Atemwege. Histologie des Bronchus. A: Ast der Arteria pulmonalis (Bronchialarterie). B: Bronchus. 1: Schleimhaut. 2: Lamina propria und glatte Muskelschicht. 3: Knorpelspange. AV: Alveolen (Erlaubnis: Welsch, Lehrbuch Histologie, 6. Auflage 2022 © Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München).

Der konduktive Abschnitt ist mit einem respiratorischen Epithel ausgekleidet, welches im Verlauf immer flacher wird (Abbildung 1). Auch die Bronchuswand wird im Verlauf immer dünner. Unter dem Epithel befindet sich die Lamina propria, die reich an elastischen Fasern ist. Diese wird von einem Mantel aus glatter Muskulatur umschlossen, welcher den Lumendurchmesser regulieren kann. Die Knorpelspangen aus hyalinem Knorpel bilden das

Stützgerüst. Seromuköse Drüsen sezernieren Muzine und antibakterielle Stoffe wie Lysozym und IgA-Antikörper. Ab dem Bereich der *Bronchioli* fehlen die Knorpelplatten und Drüsen. Hier kommen hauptsächlich glatte Muskulatur und elastische Fasern vor, die mit dem peribronchialen Bindegewebe verbunden sind und so das Lumen offenhalten (Lüllmann-Rauch and Asan 2015).

1.2 Aufbau und Marker des respiratorischen Flimmerepithels

Das respiratorische Epithel besteht hauptsächlich aus Zilienzellen, Becherzellen und Basalzellen (Abbildung 2A). Es handelt sich um ein mehrreihiges (engl: *pseudostratified*) Epithel, in welchem jede Zelle Kontakt zur Basalmembran hat. Zilienzellen machen mit 60-80% den Großteil der Zellen aus und besitzen pro Zelle bis zu 300 Zilien von ungefähr 6 µm Länge (Feriani et al. 2017). Acetyliertes alpha-Tubulin ist ein Protein, welches sich als Bestandteil von Kinozilien im Inneren der Mikrotubuli befindet und unter anderem für deren Bildung und Stabilität verantwortlich ist (Soppina et al. 2012). Dieses Protein kann so zur Detektion von Kinozilien genutzt werden.



Becherzellen speichern stark glykosilierte Muzine in Granula, die sie bei Stimulation sezernieren können. Die wichtigsten Mukusproteine in den Atemwegen sind die Muzine Muc5B und Muc5AC (Okuda et al. 2019), welche in dieser Arbeit als muzinäre Marker verwendet werden. Basalzellen können proliferieren und sich in Zilien- oder Becherzellen differenzieren (Abbildung 2B), wobei während der Differenzierung zunächst Zwischenstufen

(Intermediärzellen) entstehen. Des Weiteren sezernieren sie Wachstumsfaktoren wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und besitzen wiederum selber Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, sodass sie eine zentrale Rolle in der Homöostase des Epithels spielen (Crystal 2014). Basalzellen bilden das Protein p63, ein Transkriptionsfaktor aus der p53-Familie, welches zur Bildung und zum Erhalt von mehrreihigen Epithelien beiträgt (Arason et al. 2014).

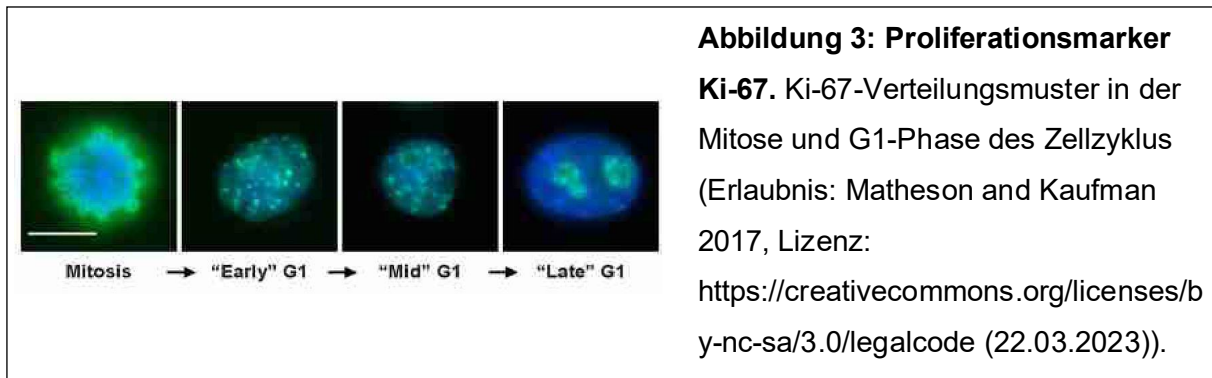
Ein allgemeingültiges Merkmal für Epithelien ist die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten wie Desmosomen und *Tight Junctions*. Desmosomen sind Kontakte, die für die mechanische Stabilität des Epithels verantwortlich sind und deren Hauptbestandteil E-Cadherin ist. E-Cadherin ist ein Ca^{2+} -abhängiges Adhäsionsmolekül, welches reißverschlussartig homophile Bindungen mit weiteren auf benachbarten Epithelzellen vorhandenen E-Cadherinen ausbildet. Ein komplexes und ständig reguliertes System aus Catenin, EPLIN (*epithelial protein lost in neoplasm*) und Aktin verankert die E-Cadherine an der Zellmembran und mit dem Zytoskelett (van Roy and Berx 2008).

Tight Junctions (*Zonulae occludentes*) dagegen sind apikale Schlussleisten, die eine Grenze zwischen externer Umwelt und Organismus bilden und im Sinne der Polarität die apikale von der basolateralen Zellmembran trennen. Das ZO-1 Protein (*Zonula occludens-1*) ist ein cytoplasmatisch gelegener Bestandteil von *Tight Junctions*, welches an andere *Tight Junction*-Proteine (vor allem Claudine und ZO-2) bindet und *Tight Junctions* mit dem Zytoskelett verbindet (Lynn et al. 2020).

1.3 Der Proliferationsmarker Ki-67

Ki-67 ist ein nukleäres Protein, welches in allen proliferierenden Wirbeltierzellen vorkommt. Die Expression dieses Proteins ist von der Zellzyklusphase der Zelle abhängig. Die höchste Konzentration erreicht Ki-67 in der G2-Phase des Zellzyklus und der Mitose. Ki-67 ist aber in allen Phasen des Zellzyklus vorhanden. Zellen, die den Zellzyklus verlassen haben (G0) oder seneszent sind, sind Ki-67-negativ (Sobecki et al. 2017, Sun and Kaufman 2018). So lässt sich mit diesem Marker bestimmen, wie viele teilungsfähige Zellen sich in einer Zellkultur befinden. Durch die Verteilung des Ki-67-Signals im Zellkern können genauere Aussagen über die Zellzyklusphase getroffen werden, in der sich eine Zelle befindet (Abbildung 3).

Kleine Ki-67-Granula im Zellkern weisen auf ein direktes Verlassen der Mitose hin. Ki-67-Signale, die die Nucleoli überdecken, sprechen für das Befinden der Zelle in der späten G1-Phase bzw. Interphase des Zellzyklus.



1.4 *In vitro* und *in vivo* Gewebestudien der Atemwege

Es gibt eine Vielzahl von Möglichkeiten zur Untersuchung von Geweben, die von einer klassischen zweidimensionalen (2D) Kultur über verschiedenste dreidimensionale (3D) Kultivierungsansätze *in vitro* bis zu *in vivo* Tierversuchen reichen. Dabei hat jedes Vorgehen gewisse Vorteile, aber auch Nachteile. Im Bereich der *in vitro*-Forschung ist die 2D-Kultivierung die einfachste Form der Kultivierung, in der Zellen in Zellkulturplatten oder -flaschen kultiviert werden und einen Monolayer bilden. Sie polarisieren nur wenig und proliferieren unphysiologisch schnell (Edmondson et al. 2014). 3D-Kulturen beschreiben *in vitro*-Ansätze, bei denen verschiedene Zelltypen auf einem Trägergerüst oder in einem Trägermedium kultiviert werden und sich in den 3D-Raum ausbreiten können. 3D-Kulturen bieten viele Vorteile gegenüber der 2D-Kultivierung. Es können komplexere Modelle aufgebaut werden, die über einen Monolayer hinausgehen. Die Zellen differenzieren besser und das entstandene Gewebe hat eine höhere *in vivo/in vitro*-Korrelation (He et al. 2016). Typische 3D-Modelle sind beispielsweise Organoide, die durch Trägergerüst-abhängige (biologische oder synthetische Hydrogele) oder unabhängige Kultivierungsansätze aufgebaut werden (Kultivierung auf nicht-bindenden Platten (Langhans 2018)). Die Differenzierung von Organoiden ist zum einen kostenintensiv und schwierig zu reproduzieren, zum anderen sind keine Aussagen über die Barriereigenschaften des Modells möglich (Wiese-Rischke et al. 2021). Weitere 3D-Ansätze sind auf einem Trägergerüst basierte *Air-Lift*-Zellkulturen, welche im Rahmen dieser Arbeit genutzt wurden. Diese Modelle werden oft auch zwischen 2D und 3D angesiedelt, da sie keine selbstorganisierenden Organoide bilden, sondern einer synthetischen oder biologischen Matrix aufliegen, aber dennoch ein komplexer und differenzierter Aufbau möglich ist (Langhans 2018).

Tierversuche sind sehr aufwendig, teuer, ethisch kritisch und nicht ohne Einschränkungen auf den Menschen übertragbar. Beispielsweise ist das einzige Reservoir des Bakteriums *Bordetella pertussis* der Mensch und somit sind Tierstudien in diesem Fall nicht möglich (He et al. 2016). 3D-Kulturen schließen die Lücke zwischen 2D-Kulturen und Tierversuchen, da

mit primären menschlichen Zellen komplexe Gewebe aufgebaut werden können, die der *in-vivo* Situation sehr nahe kommen (He et al. 2016, Jensen and Teng 2020).

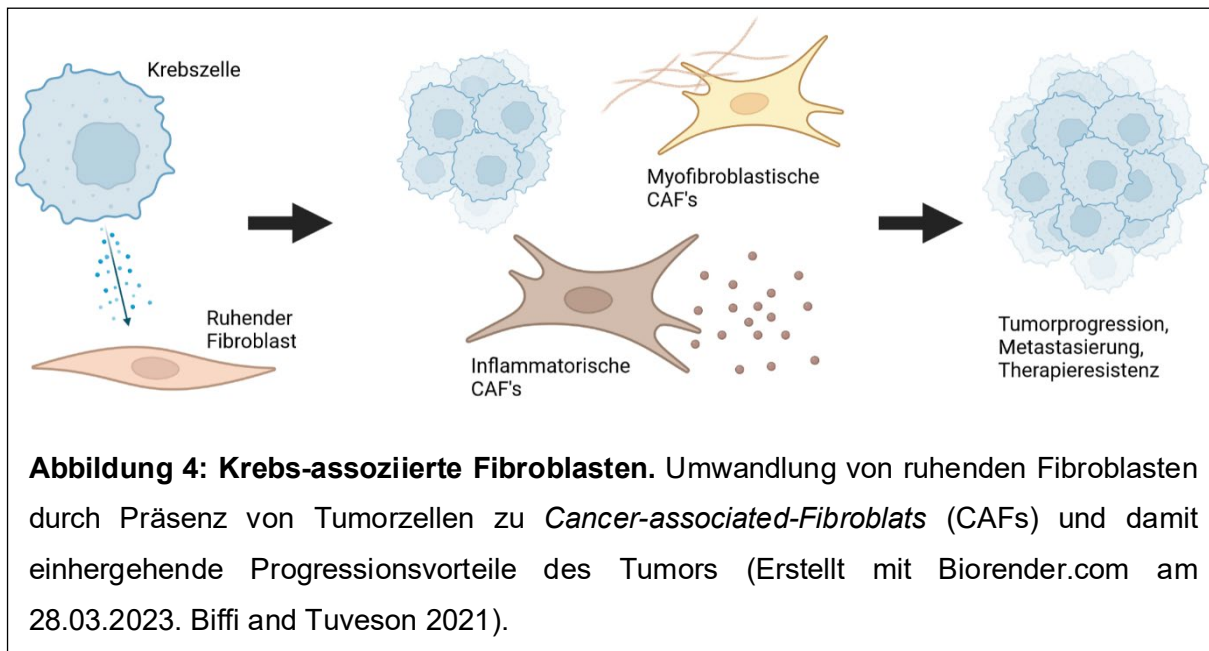
Neben den verschiedenen Kultivierungsansätzen stellt sich auch die Frage nach den kultivierten Zelltypen. Hier wird vor allem die Kultivierung von Zelllinien und primären Zellen unterschieden. Zelllinien sind immortalisierte Zellen, die eine unbegrenzte Zellquelle darstellen, aber teils Limitationen in der Zellfunktion aufweisen. So produziert die humane Bronchialepithel-Zelllinie 16HBE14o keine Muzine (Zscheppang et al. 2018) und die Zelllinie Calu-3 bildet Kinozilien nur rudimentär aus (Wiese-Rischke et al. 2021). Primäre Zellen umfassen normale humane Bronchialepithelzellen (NHBE) und Alveolarepithelzellen (AEC), während induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC) aufgrund verschiedener Programmierungsprotokolle nicht mehr zu den primären Zellen gezählt werden. Neben den komplexen Differenzierungsprotokollen von Stammzellen ist unklar, ob daraus vollständig differenzierte Bronchialepithelzellen entstehen, weswegen sie nur teilweise zum Aufbau von Atemwegsmodellen geeignet sind (Wiese-Rischke et al. 2021, Zscheppang et al. 2018).

Aufgrund der Einschränkungen von Zelllinien und Stammzellen wurden im Rahmen dieser Arbeit isolierte primäre humane Bronchialepithelzellen genutzt.

1.5 Methoden zum Nachweis von tumor-spezifischen Eigenschaften

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden primäre Bronchialepithelzellen und Fibroblasten von Probanden isoliert, die in der Regel an einem Bronchialkarzinom erkrankt waren. Da für den Aufbau eines physiologischen Atemwegsmodells das Vorhandensein von gesunden Zellen Voraussetzung ist, wurden die Epithelzellen und Fibroblasten charakterisiert, um tumoröse Merkmale auszuschließen. Eine Möglichkeit ist der Nachweis von Krebs-assoziierten Fibroblasten (*Cancer-associated fibroblasts* [CAF's]). Fibroblasten können in der Mikroumgebung des Tumors in CAFs umgewandelt werden (Abbildung 4). CAFs fördern die Tumorphiliferation, die Therapieresistenz und schützen die Tumorzellen vor dem Immunsystem, indem sie Wachstumsfaktoren, Entzündungsliganden und Extrazellulärmatrix (ECM) sezernieren (Biffi and Tuveson 2021). Zusätzlich könnten sie einen negativen Einfluss auf den 3D-Modellaufbau haben. CAFs können durch Nachweis spezifischer Marker, wie α -Smooth-Muscle-Actin (α -SMA) oder den Monocarboxylattransporter-4 (MCT4), identifiziert werden. α -SMA gehört zur Gruppe der Aktine, die eine wichtige Rolle in der Struktur und Beweglichkeit von Zellen spielen. Das Protein ist vermehrt in Myofibroblasten zu finden, die für die Kontraktion und Reifung von Granulationsgewebe bei der Wundheilung verantwortlich sind. In ähnlicher Funktion lassen sie sich aber auch in gehäufter Zahl in der Tumormikroumgebung nachweisen (Nurmik et al. 2020). MCT4 ist ein

Monocarboxylattransporter, der in glykolytischen Zellen zu finden ist, um das in der Glykolyse entstehende Laktat aus der Zelle heraus zu aeroben Zellen zu transportieren. So haben glykolytische CAFs über die Bereitstellung von energiereichen Substraten wie Laktat Einfluss auf den Stoffwechsel der aeroben Tumorzellen (Whitaker-Menezes et al. 2011). Ein weiterer Marker ist Vimentin, ein Typ III-Intermediärfilament, welches ein wichtiger Bestandteil des Zytoskeletts vor allem von mesenchymalen Zellen ist und in nahezu allen Fibroblastenarten vorkommt. In CAFs kann Vimentin herunterreguliert sein (Nurmik et al. 2020).

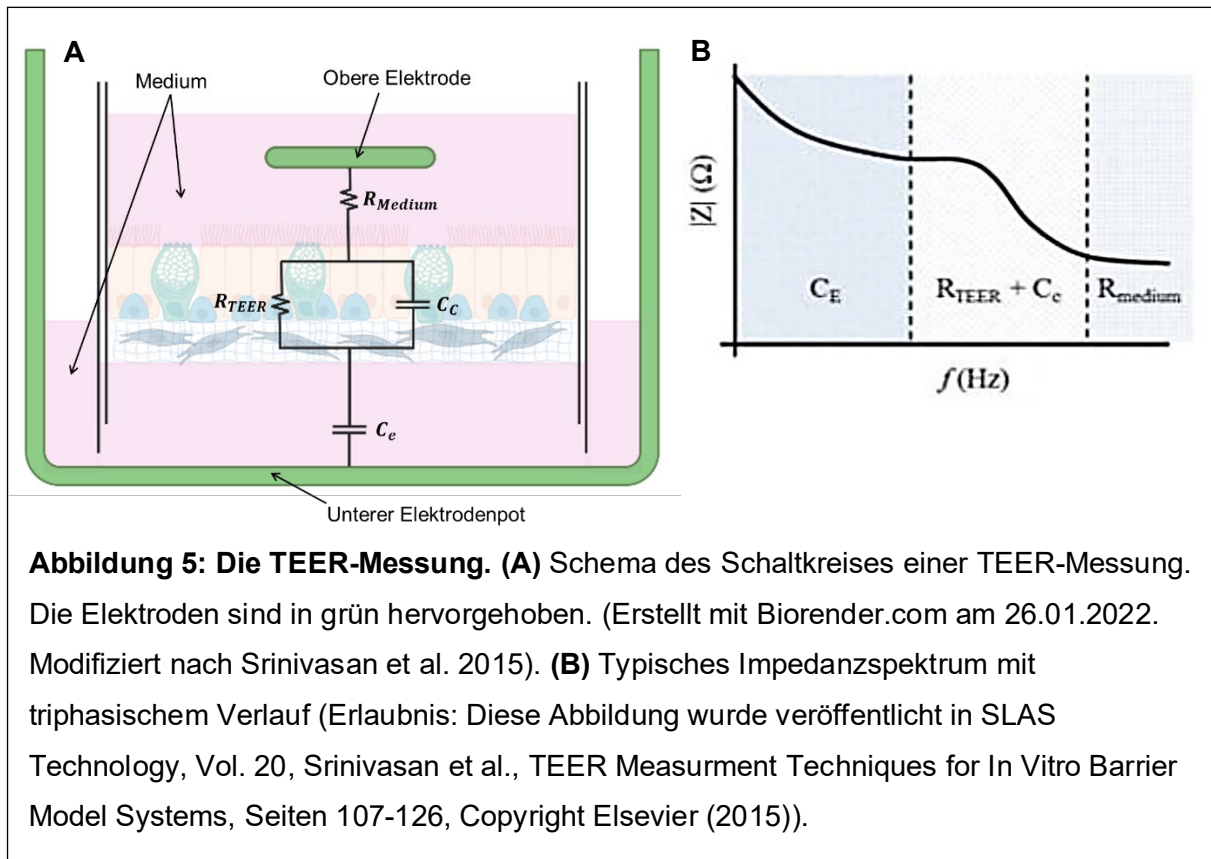


Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis tumoröser Merkmale ist die sogenannte 5-ALA-Messung. Das Prinzip der 5-ALA-Messung basiert auf der Akkumulation von Protoporphyrin IX (PpIX) nach exogener Gabe von 5-Aminolävulinsäure (5-ALA), vor allem bei tumorösen Zellen. Die Fluoreszenz von PpIX kann photodynamisch gemessen werden. 5-ALA ist der Ausgangspunkt der Häm-Biosynthese, in der PpIX im letzten Schritt durch die Ferrochelatase in Häm umgewandelt wird. In Krebszellen ist dieses Enzym herunterreguliert, wodurch es zur Akkumulation von PpIX kommt (Landes et al. 2018, Nakayama et al. 2016).

1.6 Der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER)

Mit der TEER-Messung kann der transepitheliale, elektrische Widerstand gemessen und so eine Aussage über die Barriere des Epithels getroffen werden, die vor allem abhängig von vorhandenen *Tight Junctions* ist. Hier wurde eine Impedanz-TEER-Spektroskopie angewandt, bei der eine Wechselspannung unterschiedlicher Frequenz genutzt wird. Diese generiert einen Strom, bei dem die resultierende Amplitude und Phasenverzögerung Aussagen über die Barrierefunktion des Epithels zulässt (Srinivasan et al. 2015). Dieser Strom hat die Möglichkeit

parazellulär (durch *Tight Junctions*) oder transzellulär zu fließen (Amini et al. 2018). Ein vereinfachtes Schema des Schaltkreises wird in Abbildung 5A dargestellt. Der Widerstand des Zellkulturmediums (R_{Medium}) und die Kapazität der Messelektroden (C_e) muss beachtet und konstant gehalten werden, um reproduzierbare Daten zu erhalten.

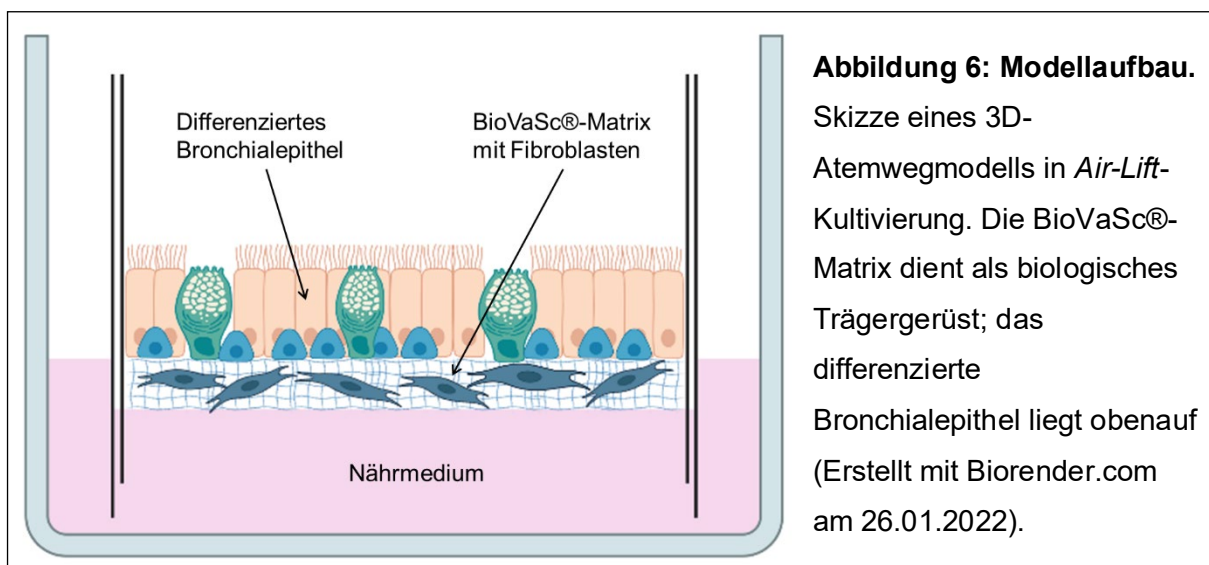


Die *Tight Junction*-Proteine entwickeln einen ohmschen Widerstand (R_{TEER}). Jede Lipiddoppelschicht, die auf der transzellulären Route durchbrochen werden muss, baut einen Widerstand und eine Kapazität (C_C) auf. Aufgrund dieses Widerstandes läuft der Strom hauptsächlich parazellulär, daher kann die Lipiddoppelschicht vereinfacht nur als C_C dargestellt werden (Srinivasan et al. 2015). In Abbildung 5B ist ein typisches Impedanzspektrum dargestellt. Bei niedrigen Frequenzen dominiert C_e . Bei hohen Frequenzen dominiert R_{Medium} durch die erhöhte Leitfähigkeit von C_C und C_e , da die hohen Frequenzen Zellen durchdringen können. Bei mittleren Frequenzen dominieren die zellabhängigen R_{TEER} und C_C (Benson et al. 2013, Srinivasan et al. 2015).

1.7 3D-Modellaufbau

Das Trägergerüst spielt in der Entwicklung des Epithels eine entscheidende Rolle. Das Ziel ist die Imitation der Extrazellulärmatrix *in-vitro*. Es können synthetische Matrices, Kollagen-

Hydrogele und biologische Trägergerüste unterschieden werden. Dabei spiegeln biologische Matrices die physiologische Situation am besten wieder. Die hier verwendete, auf dem BioVaSc-TERM® basierende Matrix SIS (*small intestinal submucosa* ohne Mukosaschicht, Abbildung 6), basiert auf dezellularisiertem Schweinejejunum. Sie besteht hauptsächlich aus Kollagen I und III, weist vaskuläre tubuläre Strukturen auf, besitzt im Gegensatz zur SIS-muc (mit Mukosaschicht) keine Basalmembran und weist eine eher plane Oberfläche auf (Schweinlin et al. 2017). Aus SIS wurde der Wachstumsfaktor *fibroblast growth factor 2* (FGF-2) extrahiert, welcher einen großen Einfluss auf Gewebeumbau und -differenzierung hat (Voytik-Harbin et al. 1997).



Um der *in vivo* Situation näher zu kommen, können Bronchialepithelzellen mit weiteren Zelltypen wie Fibroblasten oder Immunzellen co-kultiviert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Co-Kultur aus Bronchialepithelzellen mit bronchialen Fibroblasten durchgeführt. Fibroblasten verbessern durch Ausschütten von HGF (*hepatocyte growth factor*) und weiteren Wachstumsfaktoren in der Co-Kultur die Proliferation von Bronchialepithelzellen um das 1,85-fache (Skibinski et al. 2007). Eine Co-Kultur mit Fibroblasten in 3D-Modellen sorgt für eine physiologische Mikroumgebung, die günstig ist für die Differenzierung von Bronchialepithelzellen in einen polarisierten Phänotyp. Die Ziliogenese wird gefördert, auch durch die Sekretion von HGF. Ohne die Co-Kultur differenzieren Bronchialepithelzellen eher in ein mehrschichtiges Epithel und es kommt frühzeitig zu einem Wachstumsstopp (Myerburg et al. 2007, Steinke et al. 2014). In der Differenzierung des Epithels spielt auch die biomechanische Umgebung eine große Rolle. Hier unterscheidet man i) statische Mediumbedeckte, ii) statische *Air-Lift* oder *Air-Liquid-Interface* (ALI)-Kulturansätze von iii) dynamischer Kultivierung. Statische Mediumbedeckte Kultivierung beschreibt die sowohl apikale als auch basolaterale Versorgung des Zellrasens durch Nährmedium, wodurch der Zellrasen von

beiden Seiten von Medium umspült wird. Diese Kultivierung führt zwar zur Ausbildung von *Tight Junctions*, aber allgemein nur zu geringer Differenzierung und Ziliogenese. In statischen ALI-Kulturen wird das apikale Medium entfernt, so dass der Zellrasen apikalen Kontakt zur Luft hat. Durch diesen Ansatz ist das Epithel in der Lage, zu polarisieren und zu differenzieren (Hasan et al. 2018). Die bessere Differenzierungsfähigkeit könnte am erhöhten Sauerstoffvorkommen liegen, welche zu einer erhöhten Natrium-Leitfähigkeit des Epithels führt und die Zellen in einen eher oxidativen Metabolismus überführt. Dies bedarf noch weiterer Untersuchungen (Grainger et al. 2006). Bei dynamischen Kultivierungsansätzen wird der Zellrasen durch eine Pumpvorrichtung kontinuierlich mit Nährmedium umspült. Auch hier kann das Epithel von beiden Seiten, oder analog zur statischen ALI-Kultivierung nur von einer Seite mit Medium versorgt werden, was eine bessere Differenzierung zur Folge hat. Solche dynamischen ALI-Ansätze sind jedoch durch die Notwendigkeit eines kontinuierlichen Luftstrom-generierenden Bioreaktors kostenintensiv und komplex (Chandorkar et al. 2017).

1.8 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein Atemwegsmodell aus primären, humanen Bronchialepithelzellen und probanden-eigenen bronchialen Fibroblasten aufzubauen (Abbildung 6), welches der *in vivo* Situation möglichst nahe kommt, vollständig differenziert und eine physiologische Barriere aufweist. Eine vollständige Differenzierung sollte morphologisch mit einem mehrreihigen Epithel mit physiologischer Epitheldicke einhergehen. Ebenso sollte das Epithel eine physiologische Mukussekretion aufweisen und sowohl mit Desmosomen und *Adhaerens Junctions*, als auch mit *Tight Junctions* ausgebildete Zell-Zell-Kontakte besitzen. Das 3D-Modell sollte eine vorhandene Basalzellschicht und einen Kinozilienteppich aufweisen, der aktiv in physiologischer Frequenz schlägt.

In Erweiterung zu anderen Studien sollte eine biologische Matrix zur Gewährleistung der Co-Kultur verwendet werden, um die *Lamina propria* der Bronchuswand zu imitieren. Es sollten weiterführend zwei verschiedene Zellkulturmedien auf ihre Differenzierungspotenz untersucht und verglichen werden, zum einen AECG-Medium (*airway epithelial cell growth medium*) als reines Expansionsmedium, zum anderen PneumaCult 'Ex Plus' (PC Ex+) als Expansions- und PneumaCult-ALI-Medium (PC ALI) als Differenzierungsmedium.

Zusätzlich zu den Untersuchungen in der 3D-Kultur sollten die isolierten Zellen in der 2D-Kultur untersucht werden. Hier galt es festzustellen, welches Medium zum einen eine bessere Expansion ermöglichte und zum anderen eine geeignetere Grundlage für die folgende 3D-Differenzierung schafft.

2 Material

2.1 Biologisches Material

2.1.1 Humane Bronchialepithelzellen und Fibroblasten

Es wurden primäre humane Bronchialepithelzellen und Fibroblasten von neun Probanden verwendet, die aus klinischen Biopsien isoliert wurden (Nomenklatur nach laborinterner Nummerierung, Tabelle 1). Die Proben wurden während thoraxchirurgischer Eingriffe (Keilresektion, Segmentresektion, Lobektomie, Pneumektomie, Tracheateilresektion) aus makroskopisch tumorfreiem Gewebe entnommen. Die Operationen wurden am Universitätsklinikum Magdeburg in der Abteilung Thoraxchirurgie durchgeführt. Die Gewebeentnahme erfolgte ausschließlich aufgrund klinischer Indikation, während Alter, Geschlecht, Vorerkrankungen, Medikamenteneinnahme oder Rauchverhalten nicht als Ausschlusskriterium galten. Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität hat diesem Vorgehen mit dem Votum 163/17 am 16.10.2017 zur Verwendung der Proben zu Forschungszwecken zugestimmt. Die Einverständniserklärung der Spender und Spenderinnen lag vor.

Als Kontrollzellen dienten käuflich erworbene NHBE-Zellen der Firma Lonza, die von einem 44 Jahre alten männlichen Probanden isoliert wurden (Materialnummer CC-2540). Zudem wurden bronchiale Fibroblasten der Firma PromoCell genutzt, die von einem 59 Jahre alten männlichen Probanden isoliert wurden (Materialnummer C-12360).

Tabelle 1: Übersicht verwendeter Probanden

| Probandennummer | Alter (Jahre) | Geschlecht |
|-----------------|---------------|------------|
| #31 | 83 | männlich |
| #38 | 65 | männlich |
| #39 | 76 | männlich |
| #44 | 55 | männlich |
| #45 | 81 | weiblich |
| #46 | 59 | männlich |
| #59 | 31 | weiblich |
| #60 | 76 | männlich |
| #61 | 73 | männlich |

2.1.2 SIS (small intestinal submucosa)

Als Trägergerüst wurde BioVaSc-TERM® verwendet, welches aus dezellularisiertem Schweinejejunum besteht und vom Fraunhofer Institut für Silicatforschung (ISC) in Würzburg hergestellt wurde. Bei der Herstellung dieser Matrix wurde die mukosale und muskuläre Seite des Darms entfernt, so dass ausschließlich Extrazellulärmatrix überblieb (SIS – *small intestinal submucosa*). Das Jejunum stammte von 17 bis 20 kg schweren Schweinen der Deutschen Landrasse (Schweinlin et al. 2017, Hoppensack et al. 2014).

2.2 Chemikalien, Lösungen und Puffer

Tabelle 2: Chemikalien

| Bezeichnung | Spezifikation | Hersteller | Artikel-nummer |
|--------------------------------------|---|---------------|----------------|
| Acrylamid | Acrylamid/Bis-Lösung | Serva | 10688.01 |
| APS | Ammoniumpersulfat | Bio-Rad | 161-0700 |
| Aqua B. Braun Ecotainer | Steriles Aqua. dest. für die Zellkultur | B.Braun | 0082479E |
| β-Mercaptoethanol | 2-Hydroxyethylmercaptan HSCH ₂ CH ₂ OH | Sigma-Aldrich | M6250-100ML |
| Bromophenol Blau | 3,3',5,5'-Tetrabromphenolsulfonphthalein | Sigma-Aldrich | BO126-225G |
| BSA | Bovines Serumalbumin | Sigma-Aldrich | A2153-50G |
| DABCO | 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan, Antibleichmittel | C. Roth | 0718.2 |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-phenylindole-dihydrochlorid | Sigma-Aldrich | D9542-10mg |
| Dinatriumhydrogenphosphat - Dihydrat | Na ₂ HPO ₄ *H ₂ O | C. Roth | 4984.1 |
| DMSO | Dimethylsulfoxid | C. Roth | A994.2 |
| Ethanol 96 % | 96% Ethanol vergällt | Th. Geyer | 2206 |
| Glycerin | | C. Roth | 7530.1 |

| Bezeichnung | Spezifikation | Hersteller | Artikel-nummer |
|-----------------------------------|---|---------------|----------------|
| Glycin | | AppliChem | A1067,5000 |
| Isopropanol | 2-Propanol | C. Roth | 9866.1 |
| Kaliumchlorid | KCl | C. Roth | 6781.3 |
| Kaliumdihydrogenphosphat | KH ₂ PO ₄ | C. Roth | 3904.2 |
| Methanol | Methanol ≥ 99,9 %, Blotting-Grade | C. Roth | 0082.2 |
| Milchpulver | | C. Roth | T145.3 |
| Mowiol 4-88 | Einbettmedium | C. Roth | 0713.2 |
| Natriumchlorid | NaCl | C. Roth | 9265.2 |
| Normal Donkey Serum (NDS) | Eselserum | Bio-Rad | C06SB |
| Normal Goat Serum (NGS) | Ziegenserum | Sigma-Aldrich | S26-100ML |
| PBS ⁻ 10x konzentriert | Waschpuffer für die Zellkultur (ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺) | Gibco | 70011036 |
| PFA | Paraformaldehyd | C. Roth | 0335.1 |
| Phenolrot | Phenolsulfonphthalein (C ₆ H ₄ OH) ₂ C ₇ H ₄ SO ₃ | Sigma-Aldrich | P3532-5G |
| Ponceau S-Lösung | | AppliChem | A2935,0500 |
| ProClin 150 | Biozid (5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one Lösung) | Sigma-Aldrich | 49376-U |
| SDS | Sodium Dodecyl Sulfate | Bio-Rad | 1610302 |
| TEMED | Tetramethylethylenediamine | Bio-Rad | 161-0801 |
| Tris Base | Tris(hydroxymethyl)amino-methan NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃ | C. Roth | 5429.3 |
| Tx100 | Triton™ X-100 | Sigma-Aldrich | X100-500ML |
| Trypanblaulösung | 0,4%ig | Sigma-Aldrich | T8154 |
| Tween-20 | Tween® 20 für die Biochemie | AppliChem | A4974,0250 |

Tabelle 3: Lösungen und Puffer

| Puffer/Lösung | Zusammensetzung |
|--|--|
| Zellkultur | |
| Trypanblaulösung (50 ml) | 5 ml 0,4%ige Trypanblaulösung + 45 ml PBS ⁻ |
| Immunfluoreszenz | |
| DAPI in PBS ⁻ (50 ml) | 1:10.000, 5 µl DAPI in 50 ml PBS ⁻ |
| Mowiol 4-88 mit DABCO | 6,0 g Glycerin + 2,4 g Mowiol 4-88 + 6,0 ml Aqua dest. + 12,0 ml 0,2 M Tris-HCl + 25 mg/ml DABCO |
| NDS in PBS ⁻ + Proclin + Tx-100 (50 ml) | 1,5 ml Normales Esel Serum (=3%) + 48,5 ml PBS ⁻ + 5 µl Proclin (=0,01%) + 5 µl Tx100 (=0,01%) |
| NGS in PBS ⁻ + Proclin + Tx-100 (50 ml) | 1,5 ml Normales Ziegen Serum (=3%) + 48,5 ml PBS ⁻ + 5 µl Proclin (=0,01%) + 5 µl Tx100 (=0,01%) |
| 10x PBS ⁻ (1 l) | 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O, 2,4 g KH ₂ PO ₄ In 1l sterilem Aqua dest. |
| Proteinbiochemie | |
| APS-Lösung | 1 g APS auf 10 ml ddH ₂ O |
| Laufpuffer (10x; 1l) | 144 g Glycin (192 mM), 30 g TRIS Base (25 mM), 10 g SDS, 1 l A. dest. |
| Reduzierender Probenpuffer | 5 ml dH ₂ O, 6,25 ml 1 M TRIS pH 7,0, 20 ml 10 % SDS, 5,75 ml 0,4 % Bromphenolblau, 19,5 ml Glycerin, frisch dazu: β-Mercaptoethanol (1:23,6) |
| TBS-Puffer (10x; 1l) | 80 g NaCl, 2 g KCl, 30 g TRIS Base, 1 l A. dest.; pH auf 7,4 eingestellt |
| TBST (TBS mit 0,05%) (1 l) | 1:10- Verdünnung von 10x TBS mit Aqua dest. Zugabe von 500 µl Tween-20 |
| Transferpuffer (10x; 2 l) | 288 g Glycin (192 mM), 60,4 g TRIS Base (25 mM), 2 l Aqua dest. |
| Transferpuffer mit Methanol (2 l) | 200 ml 10x Transferpuffer, 400 ml Methanol, 1400 ml Aqua dest. |
| TRIS-Puffer für Sammelgel (0,5 l) | 30,3 g TRIS Base, 2 g SDS, pH auf 6,8 einstellen, 0,5 l ddH ₂ O |
| TRIS-Puffer für Trenngel (1 l) | 181,7 g TRIS Base, 4 g SDS, pH auf 8,8 einstellen, 1 l ddH ₂ O |

Tabelle 4: Weitere Reagenzien

| Bezeichnung | Spezifikation | Hersteller | Artikelnummer |
|---------------------------------------|---|----------------------------|---------------|
| Alcianblau 8GS | 1% in 3% Essigsäure | C. Roth | 3082.1 |
| ECL | Pierce™ ECL Western Blotting- Substrat | ThermoFisher Scientific | 32106 |
| Kernechtrot | 0,1% in 5% Aluminumsulfat | C. Roth | 7728.1 |
| Proteinmarker | PageRuler™ Unstained High Range Protein Ladder | ThermoFisher Scientific | 26637 |
| Rat Tail Collagen Coating Solution | Rattenschwanz- Kollagen für Beschichtung | Merck | 122-20 |
| Roti®-Histokitt | Einbettmedium | C. Roth | 6638.1 |
| WST-1-Assay | Cell Proliferation Reagent WST-1 | Sigma-Aldrich | 11644807001 |
| Zelllysepuffer | 2X Cell Lysis Buffer (Item J) | Sigma-Aldrich | RABLYSIS1-5ML |

Tabelle 5: Kits

| Bezeichnung | Spezifikation | Hersteller | Artikelnummer |
|-------------------|---------------------------------|----------------------------|---------------|
| Protein Assay Kit | Pierce BCA Protein Assay Kit | ThermoFisher Scientific | 23225 |

2.3 Medien, Antibiotika, Inhibitoren und Enzyme

Tabelle 6: Medien und Antibiotika

| Bezeichnung | Spezifikation | Hersteller | Artikelnummer |
|-------------|---|------------|---------------|
| AECG | Airway epithelial cell growth medium (ready-to-use) | Promo Cell | C-21060 |

| | | | |
|--|---|--------------------------|-------------|
| Antibiotika-/ Antimykotikum- Lösung | Penicillin, Streptomycin + Antimykotikum | Sigma-Aldrich | A5955-100ml |
| DMEM, high glucose, GlutaMAX™ | Zellmedium zur Fibroblastenisolierung | Gibco | 31966-021 |
| Fibroblast Growth Medium 2 (Ready- to-use) (PromoF) | Zellmedium für Fibroblasten- Kultivierung | Promo Cell | C-23020 |
| Heparin-Lösung | für PC ALI-Medium | STEMCELL Technologies | 07980 |
| Hydrocortison Stock-Lösung | für PC ALI-Medium | STEMCELL Technologies | 07925 |
| PneumaCult™-Ex Plus Medium | Epithelzellmedium | STEMCELL Technologies | 5040 |
| PneumaCult™-ALI Medium | Epithelzellmedium | STEMCELL Technologies | 05001 |

Tabelle 7: Inhibitoren und Enzyme

| Bezeichnung | Spezifikation | Konzentration | Hersteller | Artikelnummer |
|---|---|-------------------------|--------------------------------|---------------|
| Accutase® Cell Detachment- Lösung | Lösung zum Passagieren von Zellen | 1x | Biozol/ Biolegend | 423201 |
| Kollagenase IV | | 1:100 | Thermo Fisher Scientific | 17104-019 |
| Phosphatase- Hemmer | PhosSTOP™ | 1 Tablette auf 10 ml | Sigma- Aldrich | 4906837001 |
| PMSF | Phenylmethylsulfo- nylfluorid | 1:10 in Ethanol | Sigma- Aldrich | 93482-50ml-F |
| Protease- Hemmer | cOmplete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail | 1 Tablette auf 10 ml | Sigma- Aldrich | 11836170001 |
| Soja-Trypsin- Inhibitor, Pulver | Trypsin-Inhibitor für Accutase-Hemmung | 1x | Gibco | 17075029 |

2.4 Antikörper

Tabelle 8: Primäre Antikörper

| Antigen | Klonalität Spezies | Verdünnung | Isotyp | Hersteller | Artikelnummer |
|---------------------------------|------------------------------------|---|---------------|-------------------|---------------|
| Acetyliertes- α -Tubulin | monoklonal (6-11B-1) Maus | IF: 1:100 (+0,1% Tx100) WB: 1:500 | IgG2b | Thermo scientific | 32-2700 |
| α -Smooth-Muscle-Aktin | polyklonal Kaninchen | IF: 1:100 (+0,1% Tx100) | IgG | Abcam | ab5694 |
| β -Aktin | monoklonal (2D4H5) Maus | WB: 1:1000 | IgG2b | Proteintech | 66009-1-Ig |
| Cytokeratin 14 | polyklonal Kaninchen | IF: 1:500 (+0,1% Tx100) | IgG | BioLegend | 905304 |
| E-Cadherin | monoklonal (24E10) Kaninchen | IF: 1:100 (+0,1% Tx100) | IgG | CellSignaling | 3195 |
| Ki-67 | monoklonal (MIB-1) Maus | IF: 1:30 (+0,1% Tx100) | IgG1 κ | Agilent | M724029-2 |
| SLC16A3 (MCT4) | polyklonal Kaninchen | IF: 1:100 (+0,1% Tx100) | IgG | Novus Biological | NBP1-81251 |
| Muc5ac | monoklonal (45M1) Maus | IF: 1:100 (+0,1% Tx100) | IgG1 κ | Thermo scientific | MA5-12178 |
| Muc5b | polyklonal Kaninchen | IF: 1:100 (+0,1% Tx100) | IgG | Sigma | HPA008246 |
| p63 | polyklonal Maus | IF: 1:300 (+0,1% Tx100) | IgG | GeneTex | GT1179 |
| Vimentin | monoklonal (EPR3776) Maus | IF: 1:100 (+0,1% Tx100) | IgG | GeneTex | GT7812 |
| ZO-1 | polyklonal Kaninchen | IF: 1:100 (+0,1% Tx100) | IgG | GeneTex | GTX108613 |

Tabelle 9: Sekundäre Antikörper

| Bezeichnung | Verdünnung | Isotyp | Hersteller | Artikelnummer |
|---|------------|-----------|---------------------------|---------------|
| Alexa Fluor® 488-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG | 1:500 | IgG (H+L) | Jackson ImmunoResearch | 711-547-003 |
| Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody | 1:10000 | IgG (H+L) | Jackson ImmunoResearch | 115-035-003 |
| Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody | 1:10000 | IgG | Cell Signaling Technology | 7074S |
| Cy™3-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG | 1:500 | IgG (H+L) | Jackson ImmunoResearch | 715-167-003 |
| Cy™3-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG | 1:500 | IgG (H+L) | Jackson ImmunoResearch | 111-165-045 |

2.5 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 10: Einmalartikel und sonstige Materialien

| Bezeichnung | Spezifikation | Hersteller | Artikelnummer |
|-----------------|---------------------------------|-------------------------|--------------------------------------|
| µ-Dish | Behältnis für Zilienmikroskopie | Ibidi | 81156 |
| Bechergläser | 600 ml 1000 ml | Simax | DI60743538121711 DI60743528122051 |
| Deckgläser | 24*50 mm aus D263M | Epredia | 16348841 |
| Einmal-Skalpell | | Roth | T997.1 |
| Einmal-Spritze | 20 ml BD Discardit II | BD | 300296 |
| Gefrierbehälter | Mr. Frosty™ Einfrierhilfe | ThermoFisher Scientific | 5100-0001 |
| Glasflaschen | 1000 ml | Duran | SD-0808 |
| Handzähler | | Infactory | 4022107175012 |

| | | | |
|---|--|--------------------------------|---------------------------------------|
| Kryoröhrchen | Kryoröhrchen Greiner Bio-One™ 2 ml | ThermoFisher Scientific | 122279 |
| Objektträger | Superfrost Plus Adhesion Microscope Slides | Epredia | J1800AMNZ |
| Parafilm | Verschlussfolie | Bemis | PM-996 |
| Pasteurpipetten | 3 ml | Carl Roth | EA65.1 |
| Pinzetten | | Knipex | 92 38 75 ESD |
| Pipettenspitzen | 0,5-10 µl 10-200 µl 100-1.000 µl | Th. Geyer VWR Th. Geyer | 5409410 0030000.870 0030000.919 |
| PVDF-Blotting- Membran | Blotting-Membranen, Amersham™ Hybond™ 0.2 PVDF | VWR | 10600021 |
| Reaktionsgefäße | 0,5 ml 1,5 ml 2,0 ml | Sarstedt OMNILAB OMNILAB | 72.704 5409331 5409341 |
| Schmalband- Einwegklinge, Typ 819 | Kryostatklinge | Leica | 14035838382 |
| Serologische Pipetten | 5 ml 10 ml 25 ml | Corning Corning Greiner | 4487 4488 760160 |
| Sterilfilter | Syringe-Filter 0,22 µm | TPP | 99722 |
| Sterilisiercontainer (für TEER- Messdeckel) mit Teflon Dauerfilter | Größe S (211x154x51 mm) Größe S | Euronda Euronda | 282021 282043 |
| Tissue-Tek | Gewebekleber | Sakura Finetek | 4583 |
| Tissue-Tek Cryo-Mold | 25x20x5 mm | Sakura | 4557 |
| Western-Blot- Filterpapier | | Pierce | 88600 |
| Zählkammer | Hämozytometer (Neubauer) | Marienfeld | 640110 |

| | | | |
|-------------------------------------|---|---|--|
| Zellkronen | Durchmesser innen:außen 12:17mm Material: Surgical Guide Resin | FabLab OvGU formlabs | Eigenherstellung (3D-Druck) RS-F2-SGAM-01 |
| Zellkulturflaschen | T75 (75 cm ²) T25 (25 cm ²) | VWR VWR | TPPA90076 TPPA90026 |
| Zellkulturplatten (Petrischalen) | 15 cm Ø 10 cm Ø 6 cm Ø | Sarstedt VWR VWR | 83.3903 TPPA93100 TPPA93060 |
| Zellkulturplatten (Well-Platten) | 96-Well-Platte 96-Well-Platte mit transparentem Boden 48-Well-Platte 12-Well-Platte 6-Well-Platte | Corning Thermo Scientific Nunc Greiner ThermoFisher Scientific ThermoFisher Scientific | 3995 167314 677180 150628 140675 |
| Zellschaber | Für Proteinisolierung | TPP | 99002 |
| Zentrifugenröhrchen | 50 ml 15 ml | Greiner Greiner | 227261 188271 |

2.6 Geräte

Tabelle 11: Laborgeräte

| Laborgerät | Hersteller |
|--|-----------------------------|
| Absaugsystem: VACUBOY 155 500 | Integra |
| Abzug | Wesemann Laboreinrichtungen |
| Autoklav: Laboklav 55-195 | SHP Steriltechnik AG |
| TEER Messgerät: cellZscope E | Nanoanalytics |
| CO ₂ -Inkubator: MCO-19AICUV-PE | Panasonic |
| ECL- und Fluorescence Imager ChemoStar | Intas Science Imaging |
| Eismaschine: 105587 | ZIEGRA Eismaschinen GmbH |
| Heißluftsterilisator: Heraeus Oven | Thermo Scientific |

| | |
|--|--|
| Gefrierschränke: -20 °C -30 °C (Biomedical Freezer MDF-U5312) -80 °C (Ultra-Low Temperature Freezer KM-DU73Y1) -150 °C (Ultra-Low Temperature Freezer MDF-C2156VAN-PE) | Liebherr Panasonic Panasonic Panasonic |
| Kryostat: CM 1950 | Leica |
| Laborspülmaschine: G7835 CD | Miele Professional |
| Magnetrührer: RCT standard safety control | IKA |
| Mehrkanalpipette VB-0964 10-100 µl | Eppendorf |
| Mikroskop: Evos Auto FL 2 AMAFD2000 Objektiv: Evos 3.1 AMEP4682 (20x/0.4) Evos 1.6 AMEP4683 (40x/0.65) Olympus Luc 2.7 AMEP4764 (Plan FL N 40x/0.6) Mikroskop: Evos XL Core AMEX1000 Objektiv: Evos AMEP4633 (LPlan PH2 10x/0.25) Mikroskop: Nikon Eclipse 80i Objektiv: Nikon NIR Apo (40x/0.8) Hochgeschwindigkeitskamera: Genie HM640 | Thermo Fisher Scientific Thermo Fisher Scientific Thermo Fisher Scientific Thermo Fisher Scientific Thermo Fisher Scientific Thermo Fisher Scientific Nikon Nikon Teledyne Dalsa |
| Schüttler: KS 501 digital | IKA |
| pH-Meter: Education Line EL20 | Mettler Toledo |
| Pipetten Research Plus 0,1-2,5 µl 0,5-10 µl 2,0-20 µl 10-100 µl 100-1000 µl | Eppendorf Eppendorf Eppendorf Eppendorf Eppendorf |
| Pipettierhilfe: Pipetus 9907200 | Hirschmann |
| Platten-Reader: Infinite® M Plex | Tecan Trading AG |
| Reinstwasser- Wasseraufbereitungssystem: Millipore Milli-Q™ Z00QSV01 | Merck |
| Roller: SU 1402 | SunLab |
| Schüttelwasserbad: 1083 | GFL |

| | |
|--|---|
| Sicherheitswerkbank: Herasafe KS | Thermo Scientific |
| Western Blot-System: Gelgießstand: Mini-Protean System Casting Stand Gelelektrophoresekammer + Gellaufmodul: Mini-PROTEAN Tetra cell Stromversorgungsgerät: PowerPac™ Basic Power Supply Transfersystem + Kühlakku: Mini Trans-Blot cell | Bio-Rad |
| Vortexer: lab dancer S040 | VWR |
| Zentrifugen: Zentrifuge Allegra X-12R Zentrifuge Heraeus Fresco 21 Microzentrifuge | Beckman Coulter Thermo Fisher Scientific |

2.7 Software

Tabelle 12: Software

| Software | Beschreibung | Entwickler/Vertrieb |
|---|---|---|
| Citavi 6 | Zitierprogramm | Swiss Academic Software |
| ImageJ-Launcher | Abbildungsauswertung | Wayne Rasband |
| InStat | Statistikprogramm | GraphPad Software |
| i-Tan Control | Fluoreszenz-/Absorptionsmessung | TECAN |
| LabImage 1D | Quantifizierungssoftware für Western Blot | Intas Science Imaging |
| MatLab mit Ciliary Beat Frequency Analysis | Berechnungsplattform Zilienschlaganalyse | MathWorks Universität zu Lübeck, Insitut für Anatomie (Prof. P. König) |
| Microsoft Excel | Tabellenkalkulation | Microsoft |
| Microsoft Power Point | Abbildungsverarbeitung | Microsoft |
| Microsoft Word | Textverarbeitung | Microsoft |
| Motion Traveller | Zilienschlagmikroskopie | Imaging Solutions GmbH |
| Origin | Datenanalyse | OriginLabNormal |
| Windows 10 | Computersoftware | Microsoft |

3 Methoden

3.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Alle Zellkultur-Arbeiten fanden unter einer Sicherheitswerkbank Klasse II statt. Die Arbeitsfläche wurde vor und nach jedem Arbeiten großzügig mit 70 %igen Ethanol besprüht. Die Zellen wurden in einem CO₂-Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von ~95 % kultiviert. Vor der Verwendung wurden alle genutzten Medien im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

Metall- und Glasmaterialien wurden für mindestens drei Stunden bei 180 °C trocken sterilisiert. Andere Materialien mit einem Kunststoffanteil wurden für 20 Minuten bei 121 °C feucht sterilisiert. Nicht-autoklavierbare Lösungen wurden mithilfe eines 0,22 µm-Sterilfilters sterilisiert.

3.1.1 Zellisolierung

Die primären humanen Epithelzellen und Fibroblasten wurden jeweils aus demselben Bronchusgewebe isoliert (Abbildung 7). Das Gewebe wurde durch die Abteilung Thoraxchirurgie der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Magdeburg entnommen und in AECG-Medium vom Operationssaal in das Labor transportiert. Im Medium konnte es bei 4 °C bis zu 48 Stunden gelagert werden.

Bei ausreichender Größe des Gewebes wurde das Material halbiert und die Zellen parallel isoliert. Wenn dies nicht möglich war, wurden die Fibroblasten nach dem Auswachsen der Epithelzellen nach zehn Tagen isoliert. Der Bronchus wurde möglichst am gleichen Tag der Probenentnahme präpariert.

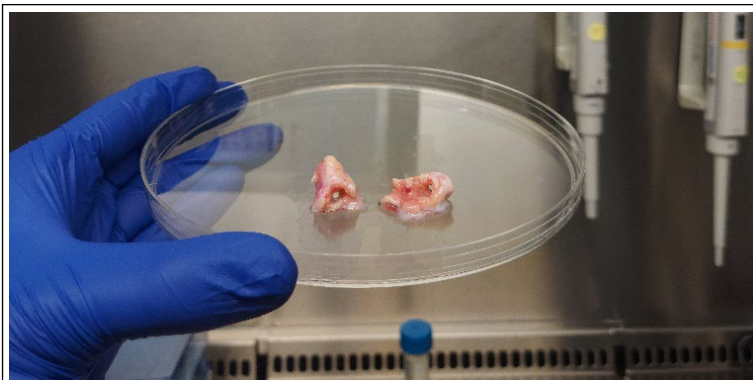


Abbildung 7:

Bronchusgewebe.

Bronchusgewebe, bereitgestellt für die Isolierung humaner, primärer Bronchialepithelzellen und Fibroblasten.

Für die Isolierung und später für die weitere Kultivierung wurden zwei verschiedene Epithelzellmedien genutzt. Zum einen wurde das reine Expansionsmedium AECG verwendet, zum anderen das Expansionsmedium PneumaCult Ex+. Beide Zelltypen wurden in Passage 0 in Gegenwart von 1 % Antibiotika-/ Antimykotika-Lösung kultiviert. Es wurden von sieben

Probanden Bronchialepithelzellen und Fibroblasten in beiden Medienansätzen isoliert, von zwei Probanden lediglich in AECG-Medium.

3.1.1.1 Isolierung primärer, humaner Epithelzellen aus Bronchusgewebe

Umliegende Gewebereste wurden mit einem Skalpell vom Bronchusstück entfernt. Das Bronchusgewebe wurde zweimal intensiv mit PBS⁻ gewaschen. Das Gewebe wurde in wenige Millimeter große Stücke geschnitten und mit der Mukosaseite nach unten in eine 10 cm-Zellkultur-Petrischale gelegt. Die Stücke wurden für mindestens 30 Minuten angetrocknet, um späteres Abschwemmen durch Mediumzugabe zu verhindern. Das Gewebe wurde erstmalig mit 6 bis 7 ml Medium und 1 % Antibiotika-/Antimykotika-Lösung bedeckt und bei 37°C inkubiert. Die Bronchusstücke wurden dreimal in der Woche mit 10 ml frischem Medium versorgt. Nicht adhärentes Gewebe wurde entnommen und verworfen. Nach drei bis sieben Tagen konnte ein erstes Auswachsen der Bronchialepithelzellen beobachtet werden. Nach zehn Tagen konnten die Gewebestücke entfernt und gegebenenfalls für die Fibroblastenisolierung genutzt werden. Die Epithelzellen wurden nach ungefähr 15 Tagen bei 80 %iger Konfluenz passagiert oder in Passage 0 eingefroren.

3.1.1.2 Isolierung primärer, humaner Fibroblasten aus Bronchusgewebe

Der Bronchus wurde in ein bis zwei Millimeter große Stücke geschnitten und in ein 50 ml-Falcon mit 4,5 ml DMEM, 500 µl Kollagenase IV und 50 µl Antibiotika-/ Antimykotika-Lösung gegeben. Das Gewebe wurde über Nacht im schüttelnden Wasserbad bei 37 °C verdaut. Am nächsten Tag wurde der Verdau mit 5 ml DMEM gestoppt. Der Inhalt des Falcons wurde mithilfe des Stempels einer sterilen 20 ml-Spritze über einen 100 µm-Filter in eine 10 cm-Petrischale gefiltert. Die Suspension wurde aufgenommen und durch einen 40 µm-Filter in ein 50 ml-Falcon überführt. Das Falcon wurde bei 200 g und 21 °C drei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine leere T25-Zellkulturflasche überführt. Das Pellet wurde in 500 µl resuspendiert und in eine mit 5 ml Fibroblastenmedium und 0,1 % Antibiotika-/Antimykotika-Lösung gefüllte T25-Zellkulturflasche überführt. Es wurde drei Mal in der Woche ein Mediumwechsel durchgeführt. Beim ersten Mediumwechsel wurde zusätzlich vorher mit 5 ml PBS⁻ gewaschen, um Gewebereste und Zelltrümmer zu entfernen. In Passage 0 entstand eine Co-Kultur aus Fibroblasten und Epithelzellen, welche beim ersten Passagieren durch die schnellere Ablösung der Fibroblasten in eine reine Fibroblastenkultur überführt wurde.

3.1.2 Mediumwechsel von 2D-Kulturen

Vor dem Mediumwechsel wurde das Wachstum der Zellen lichtmikroskopisch kontrolliert. Das alte Medium wurde aus der Zellkulturflasche abgesaugt und die gleiche Menge neues Medium hinzugefügt. Eine T25-Zellkulturflasche wurde mit 5 ml, eine T75-Zellkulturflasche mit 10 ml Medium versorgt.

3.1.3 Passagieren von primären Zellen

Bei ungefähr 80 %iger Konfluenz wurden die Zellen passagiert, um sie weiter zu kultivieren oder in ein 3D-Modell zu überführen. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen einmal mit der gleichen Menge PBS⁻ gewaschen. Das PBS⁻ wurde abgesaugt und 3 ml (T25-Flasche) oder 5 ml (T75-Flasche) Accutase hinzugefügt. Die Zellen wurden unter wiederholter lichtmikroskopischer Kontrolle im Inkubator abgelöst. Fibroblasten lösten sich nach ungefähr zwei Minuten, Epithelzellen nach vier Minuten ab. Nach vollständiger Ablösung wurde die gleiche Menge Trypsin-Inhibitor hinzugefügt, der Boden der Flasche einige Male gespült, das ganze Volumen aufgenommen und in ein 15 ml-Falcon überführt. Das Falcon wurde bei 200 g und 21 °C drei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Pellet mit Medium resuspendiert.

3.1.4 Zellzählung von primären Zellen

Zur Zellzählung wurden nach dem Passagieren 10 µl der Zellsuspension in ein mit 90 µl 0,4 %ige Trypanblaulösung gefülltes 1 ml-Reaktionsgefäß überführt und vollständig resuspendiert. Die Suspension wurde in eine Neubauer-Zählkammer überführt und die Lebend-Zellzahl bestimmt. Dafür wurden in 4 Quadranten die Zellen gezählt, die kein Trypanblau aufgenommen hatten und somit nicht abgestorben oder perforiert waren. Der Mittelwert wurde gebildet und die Zellzahl mit folgender Formel ermittelt:

$$\bar{X} * F * 10^4 = \text{Zellzahl} * \frac{10^4 * F}{\text{ml}}$$

Mit: \bar{X} = Mittelwert der 4 Quadranten

F = Verdünnungsfaktor, meist F=10

3.1.5 Kollagenbeschichtung einer 48-Well-Platte

Das Rattenschwanzkollagen wurde 1:10 mit PBS⁻ verdünnt, 150 µl dieser Verdünnung in jedes Well pipettiert und für mindestens eine halbe Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Wells wurden anschließend mit jeweils 100 µl PBS⁻ gewaschen. Die beschichtete Well-Platte konnte sofort verwendet oder nach Trocknung der Wells bei 4 °C für maximal zwei Wochen gelagert werden.

3.1.6 Einfrieren und Auftauen von Zellen

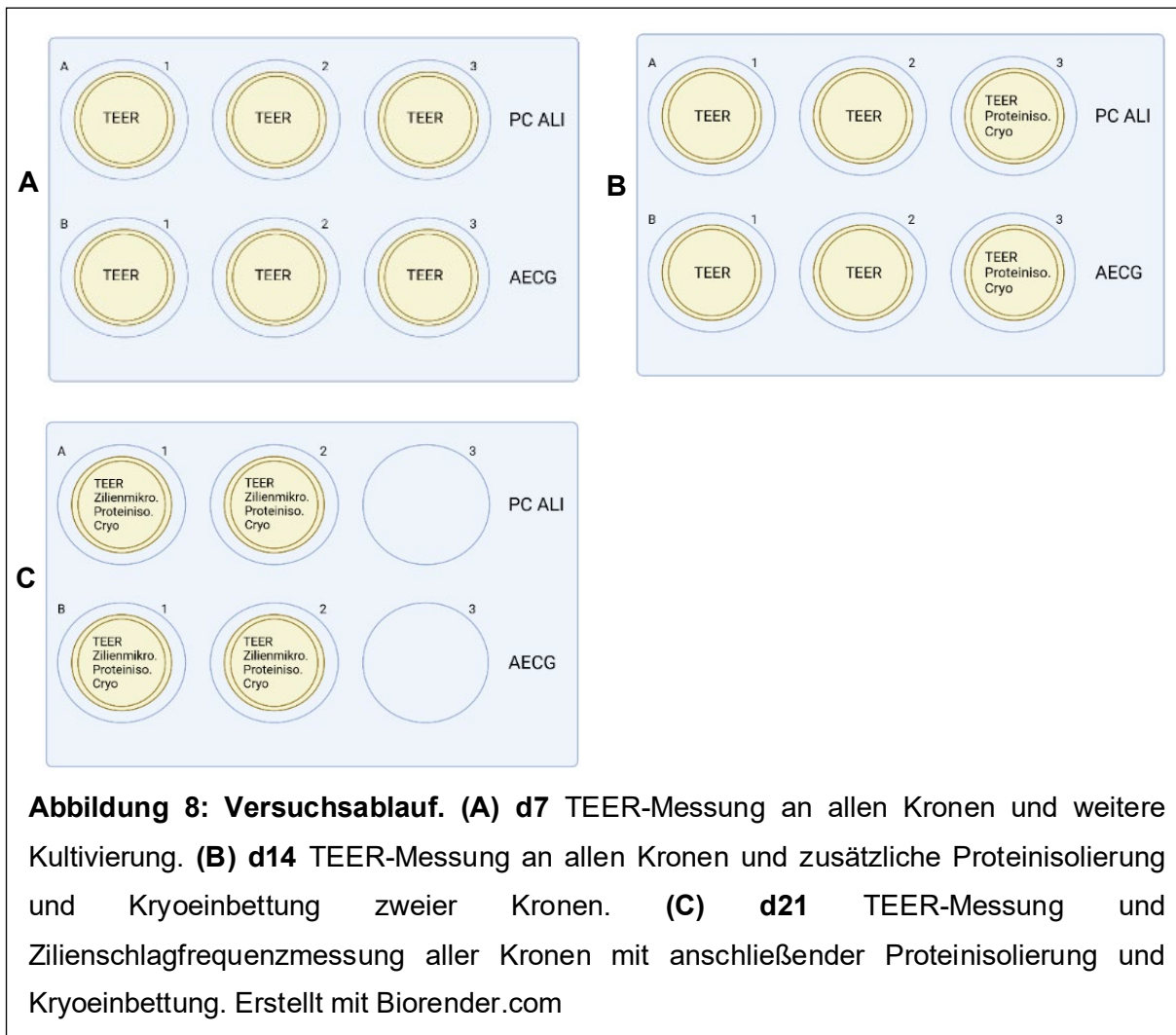
Zum Einfrieren von Zellen wurden die Zellen wie beschrieben mit Accutase abgelöst und gezählt. In der Regel wurden 5 bis $6 \cdot 10^5$ Zellen pro Kryoröhrchen eingefroren. Dafür wurde die Zellsuspension pro Kryoröhrchen auf 900 µl mit entsprechendem Zellkulturmedium verdünnt und in ein mit 100 µl DMSO gefülltes Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden in einen Cryo-Gefrierbehälter (Mr. Frosty) gestellt und zügig in den $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -Schrank gestellt. Ab dem darauffolgenden Tag wurden die Zellen bei $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen vorsichtig manuell im Wasserbad geschwenkt, bis die Suspension leicht angetaut war. Ein schnelles Vorgehen verminderte das Zellabsterben. Die 1 ml-Suspension wurde in ein mit 9 ml Medium gefülltes 15 ml-Falcon überführt und bei 200 g und $21\text{ }^{\circ}\text{C}$ drei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, die Zellen resuspendiert und gezählt oder direkt ausgesät.

3.2 Aufbau und Kultivierung von 3D-Atemwegsmodellen

3.2.1 Versuchsablauf

Je Versuch wurden jeweils 3 Kronen mit PC Ex+/ALI- bzw. AECG-Medium kultiviert (Abbildung 8). An Tag 7 wurde an allen Kronen eine TEER-Messung durchgeführt und die Kronen anschließend weiter kultiviert. Bei je einer Krone, die mit PC ALI bzw. AECG-Medium kultiviert wurde, wurde an Tag 14 eine Hälfte des Modells zur Proteinisolierung verwendet und die andere Hälfte für die Histologie und Immunfluoreszenzfärbung eingebettet. An Tag 21 wurde an den verbleibenden 4 Kronen eine TEER-Messung durchgeführt. Anschließend wurde bei allen Kronen die Zilienschlagfrequenz mikroskopisch als Endpunktmessung bestimmt. Die Modelle wurden wiederum halbiert. Bei einer Hälfte wurden die Proteine isoliert und die andere Hälfte für die Histologie und Immunfluoreszenzfärbung eingebettet.



3.2.2 Aufbau Zellkronen mit SIS

Zum Aufbau des Atemwegsmodells wurde SIS (*small intestinal submucosa*) verwendet (Abbildung 9). Der dezellularisierte Darmabschnitt wurde in eine 15 cm-Petrischale gelegt und ausgebreitet. An einer Längsseite wurde mit dem Skalpell über die gesamte Länge 1 mm der Matrix entfernt. Der Darm wurde eröffnet und die Serosa vorsichtig abpräpariert (Abbildung 9A). Die innere Krone wurde auf den Darm gelegt und die Matrix um die Krone herum kreisförmig abgeschnitten, so dass ein einige Millimeter breiter Rand vorhanden war (Abbildung 9B). Dieser Rand wurde am Rand der Krone hochgeschoben, die Krone umgedreht und die Matrix durch leichtes Ziehen gestrafft (Abbildung 9C). Die äußere Krone wurde von oben auf die innere gesetzt (Abbildung 9D) und umgedreht in eine 12-Well-Platte gestellt. Die Krone wurde außen mit 1,5 ml und innen mit 1 ml Medium versorgt. Vor der ersten Zellaussaat wurden die Kronen mindestens drei Stunden mit Medium equilibriert.

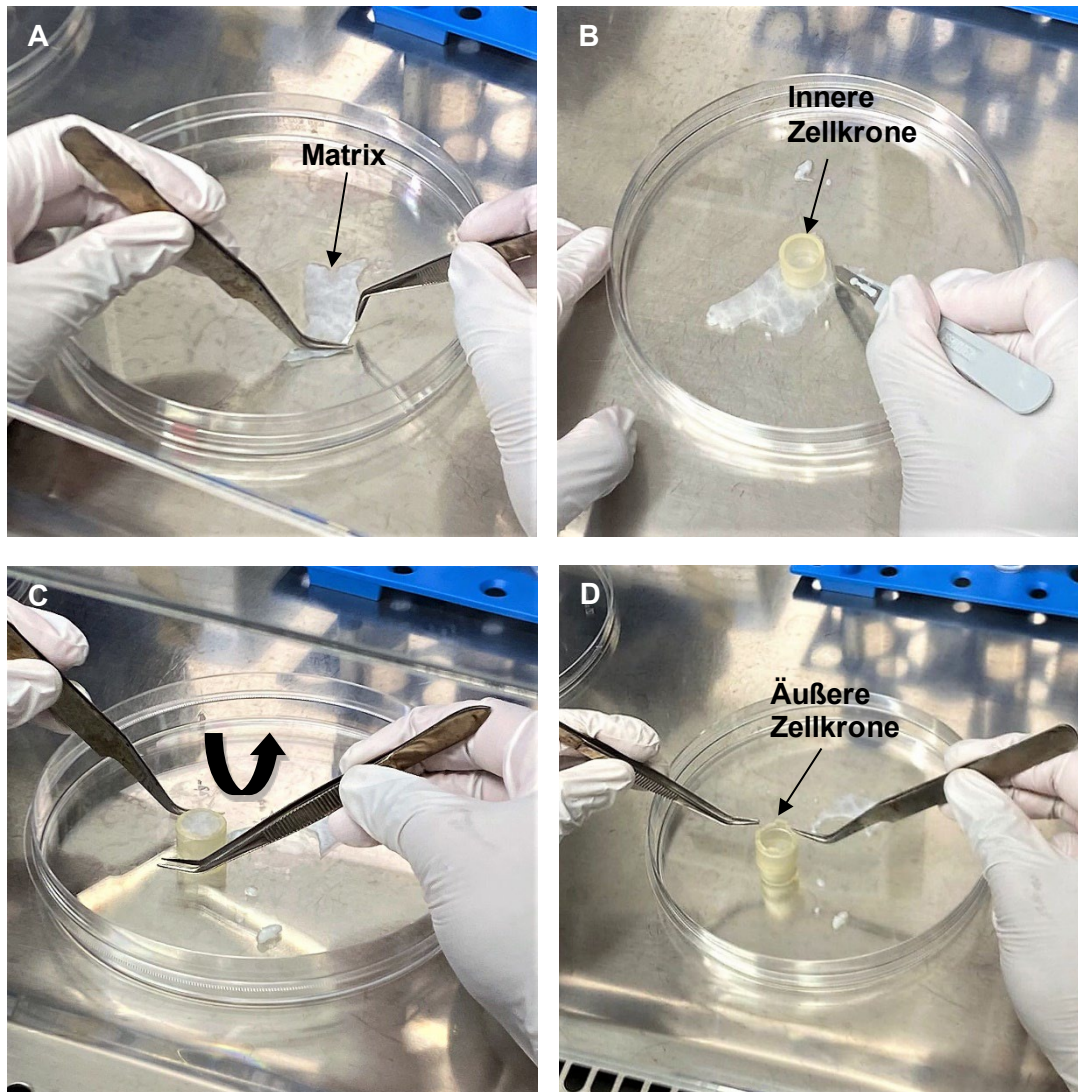


Abbildung 9: Aufbau der Zellkronen mit SIS. (A) Ausbreitung der Matrix und Entfernung der Serosa. **(B)** Schneiden der Matrix um die innere Zellkrone. **(C)** Umdrehen der Zellkrone und Straffung der Matrix. **(D)** Fixierung der Matrix durch äußere Zellkrone.

3.2.3 Aufbau der 3D-Modelle

Am ersten Tag wurden humane primäre Fibroblasten ausgesät und am darauffolgenden Tag humane primäre Epithelzellen. Dafür wurden die Zellen abgelöst und gezählt. Pro Krone wurden je $1 \cdot 10^5$ Zellen ausgesät. Dazu wurde vorher basolateral das Medium gewechselt. Für die Fibroblastenaussaat wurde Fibroblastenmedium, für die Epithelzellaussaat 1:1 gemischtes Fibroblasten- mit Epithelzellmedium (AECG oder PC Ex+-Medium) verwendet. Für die Aussaat wurde das apikale Medium entfernt und 1 ml Zellsuspension dazugegeben.

Zur Überführung in das statische Air-Lift-System wurden die Kronen vier Tage nach Aussaat der Epithelzellen in eine 6-Well-Platte überführt und nur basolateral mit 3 ml Medium (AECG

oder PC ALI-Medium) versorgt, während der apikale Bereich trocken gehalten wurde. Während der Kultivierung wurden mechanische Störungen vermieden.

3.2.4 Mediumwechsel von 3D-Modellen

Das Medium wurde dreimal in der Woche gewechselt. Das basolateral versorgende Medium wurde abgesaugt und 3 ml neues Medium hinzugefügt. Vorsichtiges Abpipettieren des Mediums im apikalen Bereich stellte den Kontakt des Epithels zur Luft sicher.

3.2.5 Einbettung der 3D-Modelle für Kryoschnitte

Nach 14 und 21 Tagen wurde je ein Modell eingebettet. Dazu wurde eine Krone aus der Wellplatte auf eine Petrischale gestellt: Die äußere Krone wurde vorsichtig von der inneren abgezogen, die Matrix wieder straffgezogen und mit der Matrixseite nach unten kurz auf ein Zellstofftuch gelegt, um übrig gebliebenes Medium zu entfernen. Die Krone wurde auf eine Präparierschale gelegt und die Matrix vorsichtig ausgebreitet. In der Regel wurde die Matrix mit einem Skalpell halbiert, eine Hälfte wurde für die Proteinisolierung genutzt (siehe Kapitel 3.6.1), die andere Hälfte wurde eingebettet. Dazu wurde die Matrix in eines zur Hälfte mit TissueTek gefülltes Cryomold-Behältnis überführt und mit weiterem TissueTek vollständig bedeckt. Das Behältnis wurde auf Trockeneis gelegt, bis das Einbettmedium ausgehärtet war und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zum Kryoschneiden gelagert.

3.3 TEER-Messung

Mit der TEER-Messung kann eine Aussage über die Barriereigenschaften des Epithels getroffen werden, in dem der elektrische Widerstand gemessen wird. Da die unbesiedelte Matrix einen eigenen Widerstand aufwies, musste dieser Leerwert vorher gemessen und vom zellabhängigen R_{TEER} -Wert abgezogen werden. Das Messprinzip ist in Abbildung 10 dargestellt.



Da die Modelle nach der Messung weiter kultiviert wurden, musste die Messung steril ablaufen. Dazu wurden die unteren Elektrodenpots bei 180°C sterilisiert. Der Messdeckel mit den oberen Elektroden wurde aufgrund enthaltener Dichtungsringe in einem Sterilisiercontainer autoklaviert. Das schwarze Messmodul wurde unsteril verwendet.

3.3.1 TEER-Referenzmessung mit unbesiedelter Matrix

Für jede Zellkrone wurde eine Referenzmessung durchgeführt, um den Leer-Widerstand der Matrix zu bestimmen. Eine Messung von sechs Kronen wurde zu einem Referenzwert zusammengefasst.

Zu Beginn wurde die Messstation aufgebaut, indem der Computer mit dem Controller durch ein Kabel verbunden und beide Geräte an das Stromnetz angeschlossen wurden.

Die sterilen unteren Elektrodenpots, sterile Pinzetten und das unsterile Messmodul wurden unter der Sterilbank platziert. Mit einer Pinzette wurde jeweils ein Pot aus dem Becherglas genommen und mit der Unterseite auf ein Zellstofftuch gestellt, um eventuelle Flüssigkeit zu entfernen. Mit der Hand wurden die Pots auf das Messmodul geschraubt, ohne die sterile Innenseite zu berühren. Die Wellplatte mit Kronen wurde aus dem Inkubator genommen, unter die Sterilbank gestellt und das Medium entfernt. Die Kronen wurden einzeln mit einer Pinzette in die Elektrodenpots überführt. Es wurde basolateral 1,5 ml und apikal 1 ml Medium hinzugegeben. Entstandene Luftblasen wurden entfernt. Der Messdeckel wurde aus dem Sterilisiercontainer gehoben und mithilfe der Kontaktblöcke auf das Messmodul gesteckt. Die oberen Elektroden mussten vollständig mit Medium bedeckt sein. Durch die Öffnung des Messdeckels konnte noch Medium hinzugefügt oder Luftblasen abpipettiert werden. Der Deckel der Wellplatte wurde auf die Öffnung des Messdeckels gesetzt. Das gesamte Messmodul wurde in den Inkubator gestellt, über ein Kabel mit dem Controller verbunden und die Tür geschlossen. Im cellZscope E-Programm wurde der Controller für die Messung ausgewählt und alle Wells beschriftet. Vor jeder Messung wurde ein Elektrodentest durchgeführt, um zu garantieren, dass alle Elektroden mit Medium bedeckt und keine Luftblasen vorhanden waren. Nach erfolgreichem Test konnte eine neue Insert-Referenz hinzugefügt und die Messung über Nacht durchgeführt werden. Nach Beenden der Messung wurde der Mittelwert der sechs Messungen bestimmt und gespeichert. Der Referenzwert konnte jetzt für die Messung mit einem besiedelten Modell genutzt werden.

Die Pots wurden nach der Messung mit geschlossenem TEER-Deckel erst wenige Minuten mit destilliertem Wasser und anschließend mit 70 %igen Ethanol gewaschen und dann getrocknet.

3.3.2 TEER-Messung mit besiedeltem Modell

Der Aufbau der Messstation und das Procedere zur Vorbereitung des Messmoduls verliefen analog zur TEER-Referenzmessung (siehe Kapitel 3.3.1). Im cellZscope E-Programm wurde neben der Beschriftung der Wells das Insert und der entsprechende Referenzwert ausgewählt. Nach erfolgreichem Elektrodentest wurde die Messung gestartet. Es wurde drei Stunden lang stündlich gemessen, woraus vier Messpunkte resultieren (0h, 1h, 2h, 3h). Nach drei Stunden wurde die Messung beendet und gespeichert. Die Verrechnung mit dem Referenzwert erfolgte automatisch über das Programm. Zur Auswertung wurde ausschließlich der Messwert nach drei Stunden genutzt.

3.4 Bestimmung der Zilienschlagfrequenz

Der Zilienschlag kann mikroskopisch in Echtzeit mithilfe einer Hochgeschwindigkeitskamera aufgenommen und die Zilienschlagfrequenz bestimmt werden, welche ein Maß für die Funktion der Zilien darstellt. Die Mikroskopie wurde als Endpunktmessung an Tag 21 durchgeführt.

Für die Mikroskopie wurde das Medium der Zellkrone abpipettiert und dreimal apikal mit 1 ml PBS⁻ gespült. Außerhalb der Sterilbank wurde die äußere Krone vorsichtig abgezogen und die innere Krone mit Matrix in ein μ -Dish gestellt. Die Matrix wurde plan ausgebreitet und die innere Krone entfernt. Eine sterile Unterlegscheibe wurde so auf die Matrix gelegt, dass der Zellrasen zentral sichtbar war. In die Mitte der Scheibe wurde bis Zweidrittel der Scheibendicke Medium hinzugegeben. Die überstehende Matrix außerhalb der Scheibe wurde etwas mit Medium befeuchtet. Das μ -Dish wurde unter das Mikroskop gelegt. Das Objektiv wurde vorsichtig in das Medium geführt und der Fokus (Oberfläche des Epithels) gesucht. Mithilfe des Programms Motion Traveller wurden zehn Sekunden lange Videos mit einer Bildrate von 100 F/s aufgenommen. Pro Krone wurden fünf Videos aufgenommen. Die Videos wurden als .AVI-Dateien für die Auswertung gespeichert. Da die Zilienschlagfrequenz temperaturabhängig ist, das Mikroskop aber keine Möglichkeit zur Erwärmung besaß, wurden die Videos standardisiert innerhalb von 10 Minuten nach Entnahme aus dem Inkubator bei Raumtemperatur aufgenommen.

Für die Auswertung der Videos wurde das MatLab-Programm Ciliary Beat Frequency Analysis verwendet, welches von Professor Peter König aus dem Institut für Anatomie der Universität zu Lübeck entwickelt wurde. Für jedes Video wurde zur Übersicht eine Colour Coding Analysis durchgeführt, die jedes Pixel frequenzabhängig in eine Farbe kodierte. Pro Video wurden 4 *regions of interest* (ROI's) mit einer maximalen Größe von 50 mal 50 Pixeln festgelegt, in der die *average dominant frequency*, also die durchschnittliche Zilienschlagfrequenz in diesem

ROI, berechnet wurde. Pro Krone ergaben sich im Maximalfall 20 Messwerte (5 Videos mal 4 Messarealen). Die Daten wurden in Microsoft Excel übertragen und ausgewertet.

3.5 Charakterisierung durch Immunfluoreszenz und Histologie

3.5.1 Herstellung von Cryoschnitten

Zur Herstellung von Kryoschnitten wurden die Kryoproben 20 Minuten im Cryomikrotom bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ equilibriert. Pro Modell wurden 8 Objektträger mit je drei $10\text{ }\mu\text{m}$ -dicken Schnitten gefertigt. Die Objektträger wurden bis zur Färbung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.5.2 Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung

Die Fixierung und Antikörperfärbung der Zellen in der 48-Well-Platte entspricht der Färbung der Kryoschnitte. Dafür wurde das überstehende PBS⁻ entfernt und pro Well 10.000 humane primäre Fibroblasten bzw. 25.000 humane primäre Epithelzellen ausgesät. Nach drei bis vier Tagen konnten die Zellen bei ausreichender Konfluenz fixiert werden. Zur Färbung der Kryoschnitte wurden diese in die feuchte Färbekammer gelegt und 30 Minuten bei RT (Raumtemperatur) gewartet, bis sie aufgetaut waren. Anschließend wurden die Schnitte bzw. das 48-Well mit 4 %igen Paraformaldehyd in PBS⁻ für zehn Minuten bei RT fixiert und dreimal mit PBS⁻ gewaschen.

Nach der Fixierung wurden die Schnitte mindestens 30 Minuten mit $150\text{ }\mu\text{l}$ 3 %igem Esel- oder Ziegen-Serum mit 0,1 % Triton X-100 und 0,1 % Proclin bei RT geblockt. Der Primärantikörper wurde in der jeweiligen Verdünnung (siehe Tabelle 8) mit Blockingserum verdünnt und $150\text{ }\mu\text{l}$ pro Objektträger auf die Schnitte aufgebracht. Die Schnitte wurden mit Parafilmstreifen bedeckt und über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal mit PBS⁻ gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde mit Blockingserum verdünnt (siehe Tabelle 9), $150\text{ }\mu\text{l}$ pro Objektträger auf die Schnitte aufgebracht und für eine Stunde bei RT lichtgeschützt inkubiert. Die Schnitte wurden dreimal mit PBS⁻ gewaschen und anschließend mit DAPI 1:10.000 in PBS⁻ für zehn Minuten inkubiert. Die Schnitte wurden dreimal mit PBS⁻ gewaschen und mit Mowiol-DABCO und Deckgläsern eingedeckt.

3.5.3 Alcianblau-Färbung

Die Objektträger wurden aus dem $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -Schrank genommen und mindestens 30 Minuten aufgetaut. Die Objektträger wurden in Alcianblau-Lösung für 30 Minuten bei RT inkubiert und auf Zellstoff abgetropft. Die Schnitte wurden mit destilliertem Wasser gespült, bis sie farbfrei waren. Die Objektträger wurden 15 Minuten in Kernechtrot-Aluminumsulfatlösung inkubiert, anschließend abgetropft und mit destilliertem Wasser gespült. Die mit Kernechtrot gefärbten

Schnitte wurden einmal kurz in 70 %igem und zweimal kurz in 80 %igem Ethanol unter visueller Kontrolle differenziert. Dann wurden die Schnitte zum Entwässern zweimal zehn Minuten in 96 %igen Ethanol gestellt und anschließend mindestens zehn Minuten vollständig luftgetrocknet. Die Objektträger wurden zweimal zehn Minuten in Xylol gestellt und mit Roti®-Histokitt und Deckgläsern eingedeckt. Die gefärbten Schnitte wurden bei RT gelagert.

3.5.4 Mikroskopie von Immunfärbungen und histologischen Schnitten

Die Färbungen wurden mit dem Evos Auto FL 2-Mikroskop aufgenommen. Sowohl bei den histologischen, als auch bei den Immunfluoreszenz-Färbungen wurden pro Modell drei Bilder mit jeweils 20er und 40er Objektiv aufgenommen (Objektive siehe Tabelle 11). Für die Immunfluoreszenzaufnahmen wurden folgende Filter-Bedingungen verwendet: für DAPI 357/44 nm Exzitation und 447/60 nm Emission, für Alexa Fluor® 488-gekoppelte Antikörper 482/25 nm Exzitation und 524/24 nm Emission und für Cy3-gekoppelte Antikörper 542/20 nm Exzitation und 593/40 nm Emission. Es wurden zufällige Bereiche der Schnitte ausgewählt. Bei Betrachtung der durch Immunfluoreszenz gefärbten 48-Wellen wurden zehn zufällige Bereiche ausgewählt und bei gleichen Filter-Bedingungen mit dem 40er Objektiv aufgenommen.

3.5.5 Auswertung der Epitheldicke

Um weitere Aussagen über die Epithelmorphologie treffen zu können, wurde die Epitheldicke im Vergleich mittels Image J ausgewertet.

In Image J wurde der Maßstab (200 µm) festgelegt und auf alle folgenden Bilder übertragen. Im Bild wurden drei Messpunkte mit gleichmäßigem Abstand über der Bildbreite festgelegt. Durch Auswertung von drei Bildern pro Modell ergaben sich insgesamt neun Messpunkte pro Modell.

3.6 Proteinbiochemie

Acetyliertes α -Tubulin wurde hier mittels Western Blot, welcher der semiquantitativen Bestimmung von Proteinen durch antikörperspezifische Chemilumineszenzbestimmung dient, untersucht.

3.6.1 Proteinisolierung

Die Proteine wurden aus den Zellen von 3D-Modellen mithilfe eines Zelllyse-Puffers isoliert. Für den Zelllysepuffer wurden 5 ml 2x Celllysis Puffer mit 5 ml destilliertem Wasser verdünnt,

mit je einer Tablette Phosphatase-Hemmer und Protease-Hemmer versetzt und daraus 300 µl Aliquots hergestellt. Zur Isolierung wurde die Matrix ausgebreitet und halbiert, wie in Kapitel 3.3.4 beschrieben. Der Zellrasen wurde mit einem Zellschaber abgeschoben, während die Matrix mit zwei Pinzetten fixiert wurde. Der Zellrasen wurde anschließend in ein mit 300 µl Celllyse-Puffer gefülltes Reaktionsgefäß überführt, dem vorher 3 µl 1:10 in Ethanol verdünntes PMSF zugesetzt wurde. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Das Reaktionsgefäß wurde kurz gevortext und weiter schüttelnd für 45 Minuten inkubiert, wobei die Probe alle zehn Minuten gevortext wurde. Die Probe wurde anschließend bei 21.100 g (maximale Geschwindigkeit) und bei 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand, der die isolierten Proteine enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei –20 °C gelagert.

3.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Durch den Vergleich mit einer Eichreihe, die aus Serumalbumin (BSA) hergestellt wurde, konnte der Proteingehalt der Proben errechnet werden (Thermo Fisher Scientific 2020). Hierfür wurde ein BSA-Standard von 125 bis 2000 µg/ml verwendet. Die Proben wurden ständig auf Eis gelagert. Für die Bestimmung wurde eine 96-Well-Platte mit transparentem Boden genutzt, in der 200 µl der Arbeitslösung pro Well vorgelegt wurde. Dazu wurden 25 µl der Probe oder des Standards luftblasenfrei pipettiert, kurz gemischt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde bei RT im Tecan-Reader die Extinktion bei 562 nm gemessen. Die Messwerte wurden gegen einen Leer-Wert verrechnet. Mit den Werten des Standards wurde eine Eichgerade mit Geradengleichung und Bestimmtheitsmaß (R^2) erstellt. Durch Auflösen der Formel nach x konnte der Proteingehalt der Proben errechnet werden.

3.6.3 SDS-PAGE

Mit der SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis*) können Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt werden.

Für die Elektrophorese wurde ein 1 mm dickes 10 %iges Trenngel (Zusammensetzung für 2 Gele: 4 ml H₂O, 2,5 ml 1,5 M Tris-Puffer, 100 µl 10% SDS, 3,4 ml 30% Acrylamid, 100 µl 10% APS, 10 µl TEMED zum Start der Polymerisation) mit aufgelagertem Sammelgel (Zusammensetzung für 2 Gele: 2,4 ml H₂O, 1,0 ml 0,5 M Tris-Puffer, 40 µl 10% SDS, 520 µl 30% Acrylamid, 50 µl 10 % APS, 5 µl TEMED zum Start der Polymerisation) gegossen. 23,6 Anteile 4-fach Probenpuffer wurden mit einem Anteil β-Mercaptoethanol vermengt. Es wurde das Volumen für 15 µg Probe durch die Proteinbestimmung ermittelt und mit dem Probenpuffer und destilliertem Wasser auf 40 µl aufgefüllt. Die Proteine wurden fünf Minuten bei 95 °C denaturiert, kurz abzentrifugiert und auf Eis gelagert. Die Gelkammer wurde mit 1x Laufpuffer befüllt. Die Kammern des Gels wurden anschließend mit 3 µl Größenstandard bzw. 40 µl Probe

beladen. Es wurde eine Spannung von 80 V angelegt, bis die Proben den unteren Rand des Sammelgels erreicht hatten. Die Auftrennung der Proteine erfolgte ungefähr 1,5 Stunden bei 120 V, bis die blaue Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte.

3.6.4 Western Blot

Um die Proteine durch Chemolumineszenz detektieren zu können, müssen die aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran übertragen und fixiert werden. Das erfolgt analog zur Elektrophorese, nur wandern die Proteine aufgrund der jetzt senkrechten Ausrichtung des elektrischen Feldes horizontal Richtung Anodenseite auf die Trägermembran. Die PVDF-Membran wurde 2 Minuten mit Methanol aktiviert, um die Adsorption der Proteine auf die Membran durch hydrophobe Wechselwirkungen zu erhöhen. Das Gel wurde nach der Elektrophorese zweimal mit 1x Transferpuffer mit Methanol gewaschen. Der Blot wurde in einer Wanne mit Transferpuffer aufgebaut. Die Schwämme, die Filterpapiere und die Membran wurden mit Transferpuffer getränkt, um eine optimale Übertragung zu gewährleisten. Von der Kathode beginnend wurde ein schwarzes Gitter, ein Schwamm, ein Filterpapier, das SDS-Gel, die PVDF-Membran, zwei Filterpapiere, ein Schwamm und ein weißes Gitter aufeinander geschichtet. Mit einem kleinen Roller wurden alle Luftblasen zwischen den Schichten entfernt. Der Transfer erfolgte auf Eis mit gekühltem Transferpuffer bei 100 V für 90 Minuten. Anschließend wurde die PVDF-Membran für fünf Minuten mit TBST-Puffer gewaschen.

3.6.5 Blockierung und Immundetektion

Die Membran wurde für 45 Minuten mit 5 %igem Milchpulver in TBST inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern. Anschließend wurde die Membran dreimal fünf Minuten mit TBST-Puffer gewaschen. Die primären Antikörper wurden in TBST verdünnt und mit der Membran über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal fünf Minuten bei RT mit TBST gewaschen. Die mit der Meerrettichperoxidase gekoppelten (HRP-gekoppelten) sekundären Antikörper wurden in 1 %igem Milchpulver in TBST verdünnt. Die Membran wurde mit den sekundären Antikörpern eine Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal für fünf Minuten mit TBST und einmal für fünf Minuten mit TBS (ohne Tween-20) gewaschen. Die Membran wurde dann mit dem Western Blotting Substrat ECL entwickelt. Das Chemilumineszenz-Signal wurde über zehn Minuten mit einem ECL-Imager aufgenommen. Die Banden wurden mit der Software LabImage 1D quantifiziert. Die Signale von β -Aktin, welches als Ladekontrolle fungierte, wurde gegen die Signale von ac. α -Tubulin gegengerechnet.

3.7 WST-1-Assay

Der Assay wurde genutzt, um den Einfluss der individuellen Probanden und Zellkulturmedien auf die Proliferation humaner primärer Bronchialepithelzellen zu bestimmen. Es wurden die beiden Probanden 59 und 60 in beiden Medienansätzen (beide in Passage 1) und Kontroll-NHBEs in PC Ex+-Medium (in Passage 2) untersucht.

Der Assay wurde an drei Zeitpunkten (Tag 3, 5 und 7 nach Aussaat) als Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Zellen wurden in einer mit Rattenschwanz-Kollagen beschichteten 24-Well-Kulturplatte kultiviert. Pro Well wurden 25.000 humane primäre Bronchialepithelzellen ausgesät. In den Wells zur Bestimmung des Leer-Wertes wurde nur PC Ex+-Medium hinzugefügt. Für den Assay wurde das Medium entfernt, 300 µl der 12,5 %igen WST-1-Lösung pro Well hinzugefügt und für vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die WST-1-Lösung vorsichtig gemischt und je 100 µl auf eine transparente 96-Well-Platte mit flachem Boden übertragen. Die Extinktion wurde mit einem TECAN-Reader bei einer Wellenlänge von 440 nm und einer Referenzwellenlänge von 600 nm gemessen. Es wurde die Differenz der Werte von Mess- und Referenzwellenlänge gebildet und der Mittelwert der Leer-Werte abgezogen. Die Wells mit kultivierten Zellen wurden mit PBS⁻ gewaschen, um eine Akkumulation von WST-1-Stoffwechselprodukten zu vermeiden. Die Zellen wurden mit Medium versorgt und bis zur nächsten Messung weiterkultiviert.

3.8 5-ALA-Messung mit MTT-Normalisierung

3.8.1 5-ALA-Messung

Da die PpIX-Fluoreszenzwerte abhängig von der Anzahl lebender Zellen sind, wurde im Anschluss an die Messung ein MTT-Assay (siehe Kapitel 3.8.2) durchgeführt und die PpIX-Fluoreszenzwerte so auf die Zellzahl normiert. Es wurden von vier Patienten und von Kontroll-NHBEs PpIX-Fluoreszenzwerte bestimmt.

In einer 96-Well-Platte wurden 25.000 primäre, humane Bronchialepithelzellen pro Well ausgesät und für drei Tage kultiviert. Am vierten Tag wurde für die Messung eine 20 mM Stocklösung 5-ALA in PC Ex+-Medium hergestellt ($M_{5-ALA}=167,59 \frac{g}{mol}$). Diese Stocklösung wurde 1:10 in PC Ex+-Medium verdünnt und das Falcon mit Alufolie umwickelt. Mit Hilfe eines pH-Meters und 10 M Natriumhydroxid (NaOH) oder 12 M Salzsäure (HCl) wurde der pH-Wert der Verdünnung auf pH 7,4 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung durch einen 0,22 µm-Filter sterilfiltriert. Das Zellkulturmedium wurde aus der 96-Well-Platte abgesaugt, reines Medium als Kontrolle oder die 5-ALA-Verdünnung zugegeben und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurde das Medium mit und ohne 5-ALA abgesaugt und in jedes Well PC Ex+-Medium hinzugefügt. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Zeitmessung gestartet. Die Zellen jedes Patienten wurden zu vier Zeitpunkten (30 min, 90 min,

150 min, 210 min) in Dreifachbestimmung gemessen, je nur mit PC Ex+-Medium oder mit 5-ALA-Verdünnung. Die Messung erfolgte mit Hilfe des Programms i-control 2.0 und dem TECAN-Reader. Es wurde bei einer Exzitationswellenlänge von 405 nm und einer Emissionswellenlänge von 607-652 nm in 1 nm-Schritten gemessen. Die Werte jedes Wells wurden in eine Excel-Tabelle übertragen.

3.8.1.1 Auswertung der 5-ALA-Messung

Die Basislinie der gemessenen Fluoreszenzspektren wurden mit Hilfe der Software Origin durch Subtraktion der Basislinie korrigiert. Anschließend wurde mit diesen korrigierten Werten die Emissionswellenlänge mit der maximalen Fluoreszenzintensität im Bereich von 635 nm bestimmt, da PpIX bei 635 nm ein Maximum im Spektrum aufweist. Diese Emissionswellenlänge schwankte etwas und lag zwischen 628 nm und 638 nm. Deshalb wurde der Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten für 628 nm bis 638 nm berechnet und für die Normalisierung mit der Zellzahl verwendet.

3.8.2 MTT-Assay

Der Assay wurde zur Normalisierung der 5-ALA-Werte (siehe Kapitel 3.8) auf die Zellzahl genutzt und direkt nach der 5-ALA-Messung durchgeführt. Zusätzlich musste für jeden Probanden, bei dem eine 5-ALA-Messung durchgeführt wurde, mittels eines weiteren Versuches eine MTT-Standardkurve erstellt werden, um die Zellzahl ermitteln zu können.

Nach der 5-ALA-Messung wurde das Medium in allen Wells abgesaugt und zweimal mit 200 µL PBS⁻ gewaschen. Anschließend wurden pro Well 100 µl einer 1:10 Verdünnung MTT in PC Ex+-Medium hinzugegeben und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Der Farbstoff wurde abgesaugt und es wurde einmal mit 200 µl PBS⁻ gewaschen. Es wurden pro Well 100 µl DMSO zugegeben und kurz auf dem Mikrotiterschüttler geschüttelt, um die Farbstoffkristalle in Lösung zu bringen. Im TECAN-Reader wurde die optische Dichte bei 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 640 nm gemessen.

3.8.3 MTT-Standardkurve und Normalisierung der ALA-Werte

Um aus den Werten eine Zellzahl zu berechnen, mussten MTT-Standardkurven erstellt werden. Dazu wurden für jeden Probanden 10.000, 20.000, 40.000 und 60.000 Zellen pro Well ausgesät. Pro Zellzahl wurden vier Wells ausgesät, zwei davon wurden jeweils mit und zwei ohne 5-ALA gemessen, um ungewünschte Effekte von 5-ALA auf die Zellvitalität auszuschließen. Die Inkubation mit MTT und die folgende Messung lief analog wie oben beschrieben. Es wurden die Mittelwerte der Werte mit und ohne 5-ALA gebildet und jeweils in ein Diagramm übertragen. Es wurde die Kurvengleichung und das Bestimmtheitsmaß (R^2)

bestimmt. Mit Hilfe der Gleichung konnte die Zellzahl des MTT-Assays nach den 5-ALA-Versuchen berechnet werden. Anschließend wurden die 5-ALA-Werte durch die Zellzahl geteilt und so normiert.

3.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm InStat. Es wurde der ungepaarte Mann-Whitney-Sum Rank Test verwendet und als $*=p<0,05$, $**=p<0,01$, $***=p<0,001$ und n.s. (nicht signifikant)= $p>0,05$ dargestellt.

Die TEER-Messungen wurden mit dem Kruskal-Wallis Nonparametric Anova Test in Kombination mit dem Dunn's Multiple Comparison Test ausgewertet und ebenso als $*=p<0,05$, $**=p<0,01$, $***=p<0,001$ und n.s. (nicht signifikant)= $p>0,05$ dargestellt.

Alle Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 2D-Kultivierung

Humane primäre Epithelzellen wurden aus Bronchusgewebe isoliert und zunächst in zwei verschiedenen Medienansätzen (AECG-Medium und PC Ex+-Medium) in 2D kultiviert. Im Folgenden werden die Zellmorphologie, die Zellausbeute nach Isolation, die Zellvitalität, das Proliferationsverhalten und abschließend der Differenzierungsstatus nach Kultur in den beiden Medien beschrieben.

4.1.1 Zellmorphologie und -ausbeute nach Isolierung

Nach 3 bis 7 Tagen konnte ein erstes Auswachsen von Epithelzellen aus dem Bronchusgewebe beobachtet werden. Die Zellen wuchsen in alle Richtungen aus den Bronchusstücken aus und proliferierten kreisförmig weiter (Abbildung 11). Die Wachstumsgeschwindigkeit war stark von den Probanden abhängig. Die mit AECG-Medium kultivierten Zellen waren größer, besaßen viel Zytoplasma und bildeten teilweise Fortsätze aus (Abbildung 11A). Die mit PC Ex+-Medium kultivierten Zellen waren klein, polygonal und der Zellkern füllte nahezu die ganze Zelle aus, sodass nur wenig Zytoplasma sichtbar war (Abbildung 11B). Sie wuchsen sehr eng und hatten viel Zell-Zell-Kontakt. Am Rande der Zellinseln bildete sich ein Wall aus proliferierenden Zellen.

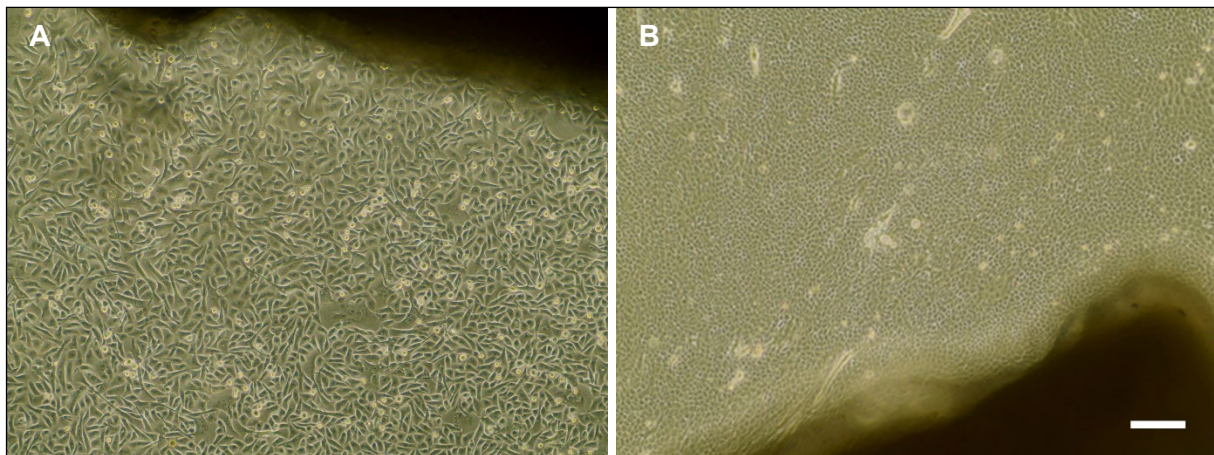
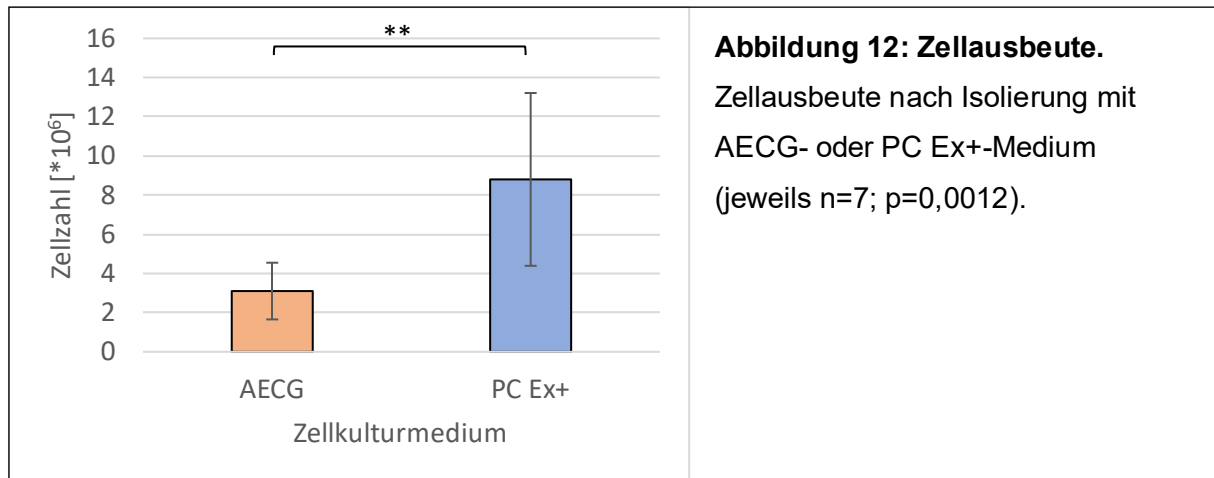


Abbildung 11: Zellmorphologie nach Isolierung. Isolierung von humanen primären Epithelzellen aus Bronchusgewebe (dunkles Gewebe), kultiviert mit **(A)** AECG- oder **(B)** PC Ex+-Medium. Maßstab $\pm 200 \mu\text{m}$.

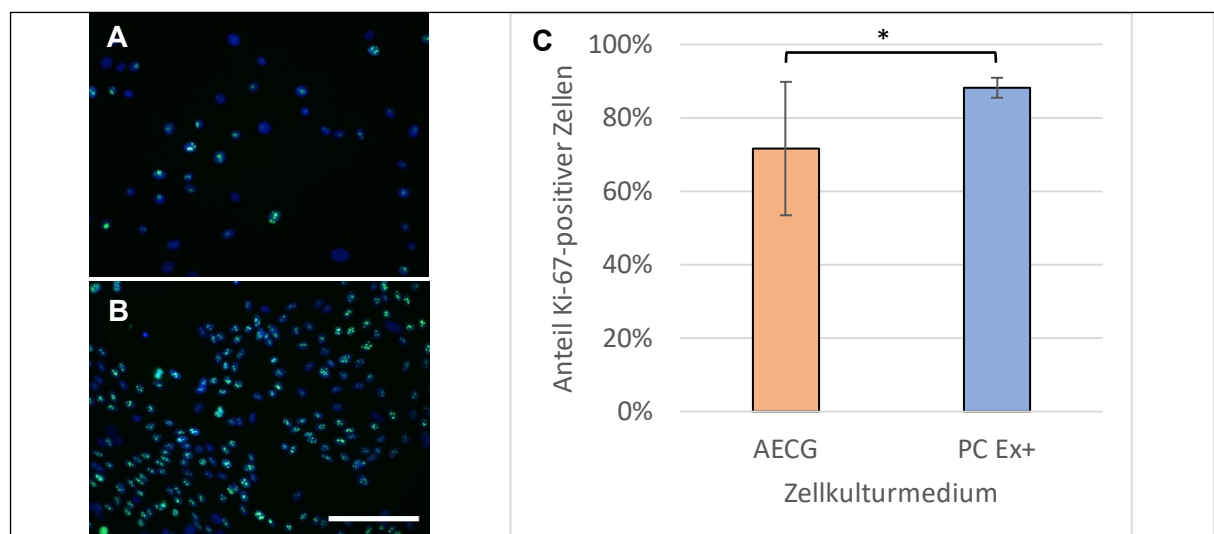
Die Epithelzellen wurden bei 80 %iger Konfluenz (ca. 15 Tage) passagiert und gezählt (Abbildung 12). Mit PC Ex+-Medium wurden im Durchschnitt $8,8 \cdot 10^6$ Zellen isoliert ($\pm 4,41 \cdot 10^6$), während nach der Isolierung mit AECG-Medium $3,1 \cdot 10^6$ Zellen gezählt wurden (\pm

$1,45 \cdot 10^6$). Somit wurde bei der Isolierung mit PC Ex+-Medium eine signifikant höhere Zellausbeute erzielt ($p=0,0012$).



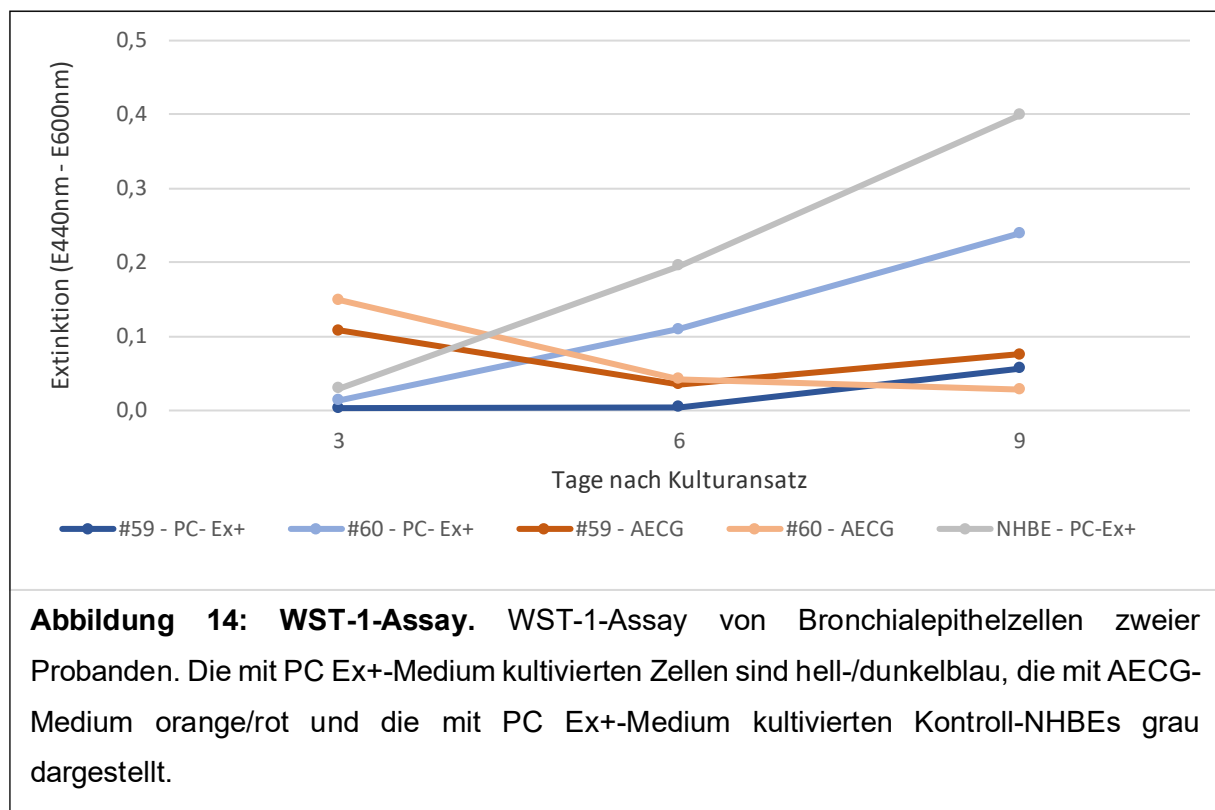
4.1.2 Zellvitalität und -proliferation

Um Aussagen über die Zellvitalität und das Proliferationsverhalten der isolierten Zellen zu treffen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen gegen Ki-67 und ein WST-1-Assay durchgeführt.



Es wurden gleiche Zellzahlen ausgesät (25.000 Zellen pro Well), die Zellen nach drei Tagen fixiert und mittels Immunfluoreszenzfärbung gegen Ki-67 charakterisiert (Abbildung 13). Die mittels DAPI-Färbung bestimmte Zellzahl war mit PC Ex+ deutlich höher. Bei der Mehrheit der Zellen waren Ki-67-Signale zu sehen, die sich mit den Nukleoli überdecken. In den PC Ex+-Zellkulturen waren zusätzlich Zellen mit kleineren Ki-67-Granula anzufinden, was auf ein direktes Verlassen der Mitose hindeutet (siehe Kapitel 1.3, Abbildung 13B). Es wurde der Anteil Ki-67-positiver Zellen an allen DAPI-gefärbten Zellen gezählt (Abbildung 13C). Die mit AECG-Medium kultivierten Zellen hatten durchschnittlich einen Anteil von 71,62 % Ki-67-positiver Zellen (+/- 18,16 %). Bei der Kultivierung mit PC Ex+-Medium gab es mit 88,17 % (+/- 2,71 %) einen signifikant höherem Anteil an Ki-67-positiven Zellen ($p=0,0317$), und somit eine höhere Proliferationsrate bei der Kultivierung mit PC Ex+-Medium.

Zusätzlich wurde ein WST-1-Assay zur Bestimmung der Zellvermehrung anhand der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen an zwei Probanden und Kontroll-NHBes durchgeführt (Abbildung 14). Der Assay wurde an Tag 3, 6 und 9 nach dem Aussäen der Bronchialepithelzellen durchgeführt und zeigt eine Extinktion an, die proportional zur Anzahl lebender Zellen ist.

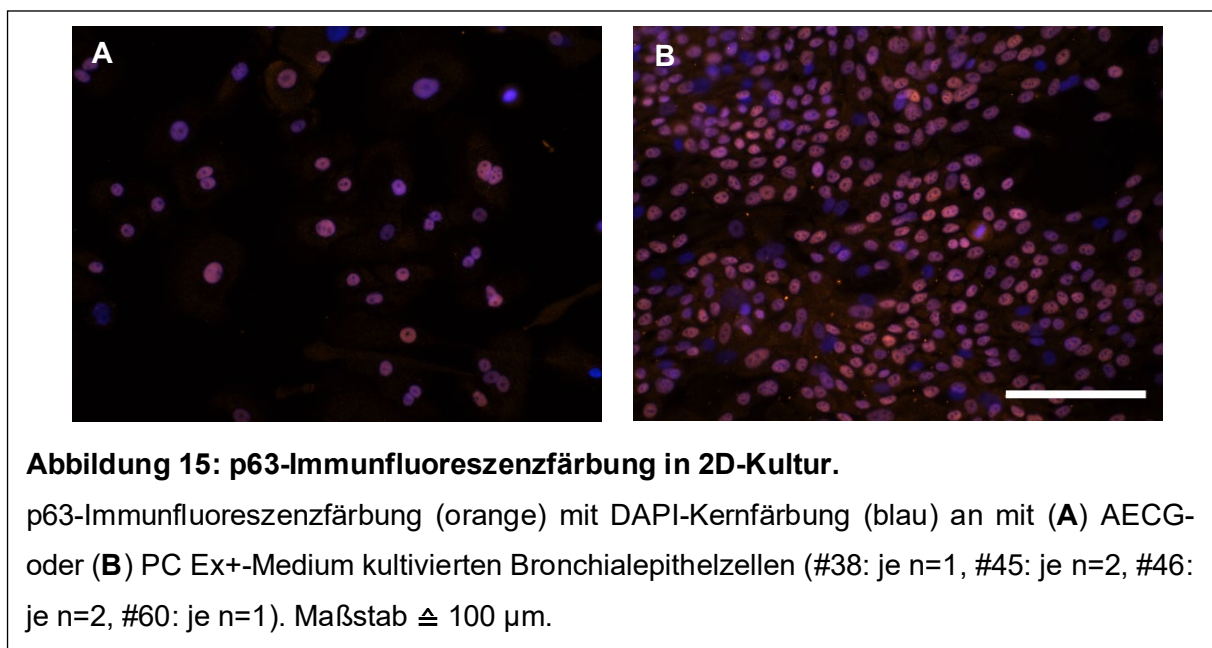


Bei Betrachtung des Startpunktes an Tag 3 war auffällig, dass das initiale Wachstum der mit AECG-Medium kultivierten Epithelzellen (orange/rot) die anderen Kultivierungsansätze

übertraf. Das Wachstum nahm aber im Verlauf der Passage ab. Die mit PC Ex+-Medium kultivierten Zellen starteten von einem einheitlich niedrigeren Niveau (blau und grau). Das größte Wachstum ließ sich bei den Kontroll-NHBEs feststellen, die standardmäßig nur mit PC Ex+-Medium kultiviert wurden. Die Probanden-Zellen, die mit PC Ex+-Medium kultiviert wurden, proliferierten unterschiedlich stark. Es ließ sich die Tendenz erkennen, dass die mit AECG-kultivierten Zellen initial gut proliferierten, die mit PC Ex+-Medium kultivierten Zellen aber ein größeres Wachstum aufwiesen.

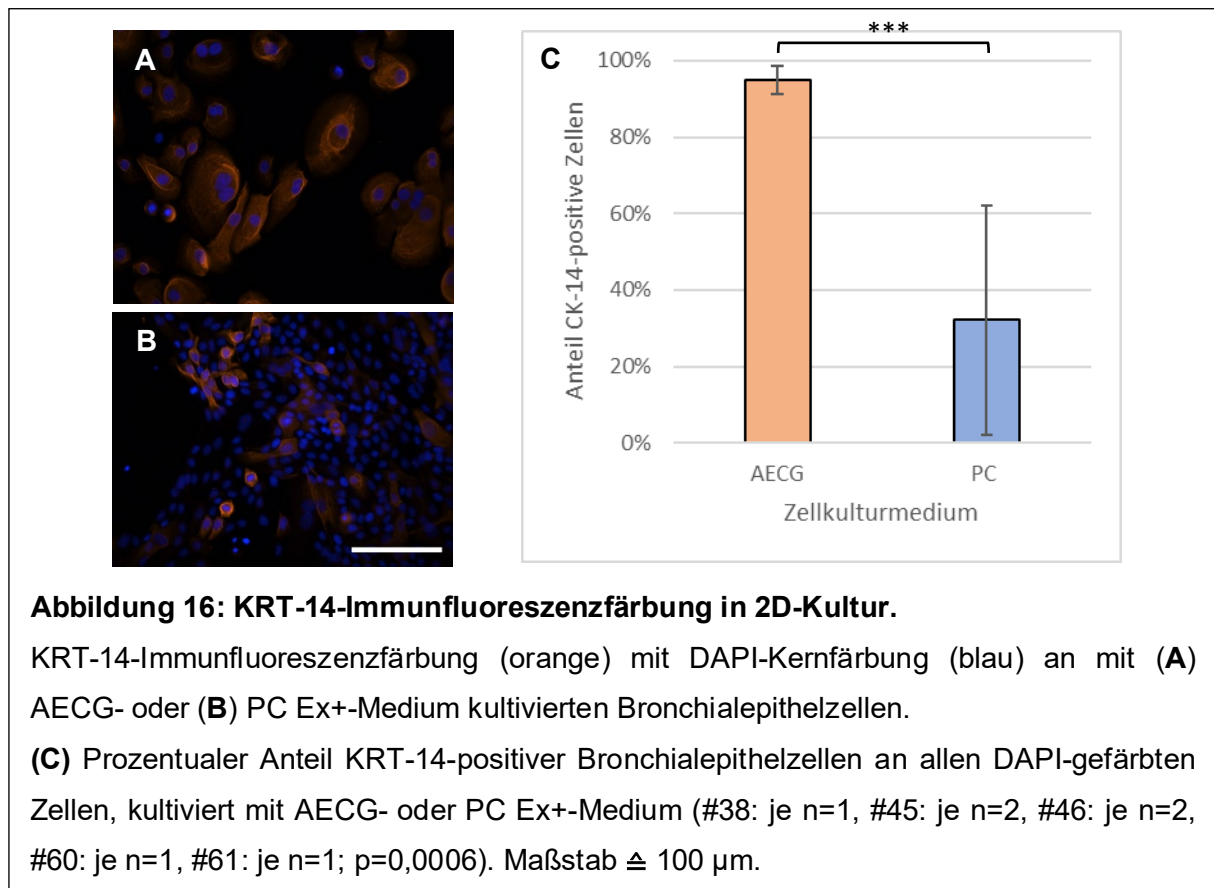
4.1.3 Differenzierungsstatus nach Isolierung

Während der Isolierung und Kultivierung von primären Zellen dedifferenzieren diese und verlieren so nach und nach ihre Differenzierungsmerkmale und ihren Phänotyp. Durch bestimmte Proteine wie Zytokerin-14 (KRT-14; Typ-I-Keratin) oder p63 kann der Differenzierungsgrad nachgewiesen werden, da diese vor allem in undifferenzierten Basalzellen, unter anderem in den Atemwegen, vorhanden sind (Li et al. 2015, Moll et al. 2008).



Beide Medienansätze zeigten nukleäre p63-Signale in nahezu allen Zellen, weswegen auf eine genauere Auszählung verzichtet wurde (Abbildung 15).

Die KRT-14-Färbung zeigte bei beiden Medienansätzen ähnliche Signale (Abbildung 16). Die Auszählung ergab für das AECG-Medium einen prozentualen Anteil KRT-14-positiver von 94,99 % mit geringer Standardabweichung (\pm 3,72 %). Im Vergleich dazu war der Anteil KRT-14-positiver Zellen mit 32,18 % und einer Standardabweichung von \pm 29,93 % deutlich geringer. Die Kultivierung mit AECG-Medium resultierte dementsprechend in einem signifikant höheren prozentualen Anteil an KRT-14-positiven Zellen ($p=0,0006$).



4.2 Charakterisierung zum Ausschluss tumoröser Merkmale

Das verwendete Bronchusgewebe wurde im Rahmen von Operationen (Segmentresektion, Lobektomie, Tracheateilresektion) gewonnen, die vor allem an Patienten durchgeführt wurden, die an einem Bronchialkarzinom erkrankt waren. Das Bronchusgewebe wurde mit ausreichend Sicherheitsabstand zum tumorösen Gewebe aus gesundem Gewebe entnommen. Um zusätzlich einen tumorösen Charakter auszuschließen, wurde untersucht, ob es sich bei den isolierten Fibroblasten in der 2D-Kultivierung und im 3D-Modell um CAFs handelte. Außerdem wurde der Stoffwechsel der Epithelzellen mit Hilfe der 5-ALA-Messung untersucht.

4.2.1 Nachweis von CAFs

Es wurden 10.000 primäre, bronchiale Fibroblasten pro Well in eine 48-Well-Platte ausgesät, nach drei Tagen fixiert und mittels Immunfluoreszenz gegen α -SMA, MCT4 und Vimentin gefärbt (Abbildung 17). Normale, nicht aktivierte Fibroblasten sind Vimentin-positiv, jedoch negativ für die CAF-Marker α -SMA und MCT4. Durch diesen Nachweis kann die Gegenwart von CAFs ausgeschlossen werden. Die Fibroblasten des Probanden 31 (Abbildung 17A) zeigten α -SMA-, MCT4- und Vimentin-positive Signale. α -SMA und Vimentin waren zytosolisch lokalisiert, während MCT4 eher membranständig lokalisiert war. Die Fibroblasten der

Probanden 44 und 46 (Abbildung 17B+C) zeigten deutlich weniger Fluoreszenzsignale für α -SMA. Die niedrigen Signale bei α -SMA stammten hier weniger aus dem Zytosol (verglichen zu den Fibroblasten des Probanden 31), sondern überlagerten sich mit dem blauen DAPI-Signal im Nukleus. Bei Proband 44 zeigte sich MCT4 membranständig ähnlich zu Proband 31, bei Proband 46 war das Signal deutlich schwächer und MCT4 schien hier mehr zytosolisch lokalisiert zu sein.

Zusammenfassend war das Vimentin-Fluoreszenzsignal bei allen Probanden stark positiv. Von fünf Probanden waren nur bei den Fibroblasten des Probanden 31 beide CAF-Marker eindeutig positiv, wodurch dieser Proband vom Aufbau von 3D-Modellen ausgeschlossen wurde. Bei Proband 44 konnte ein schwaches α -SMA-Signal und ein stärkeres und eher zytosolisches MCT4-Signal festgestellt werden. Die restlichen drei Probanden zeigten schwache Signale für α -SMA und MCT4, zusätzlich änderte sich bei schwachem Signal die zelluläre Lokalisation.

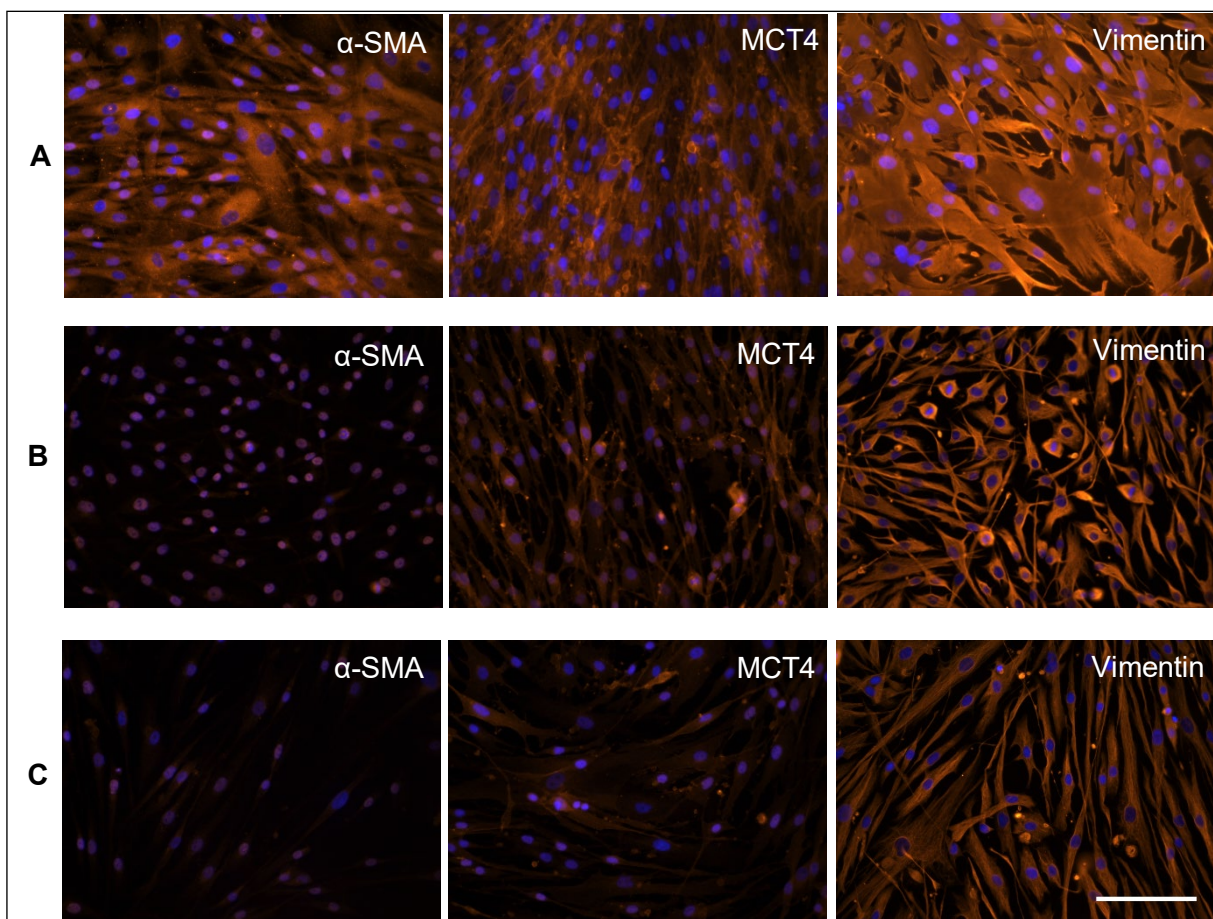
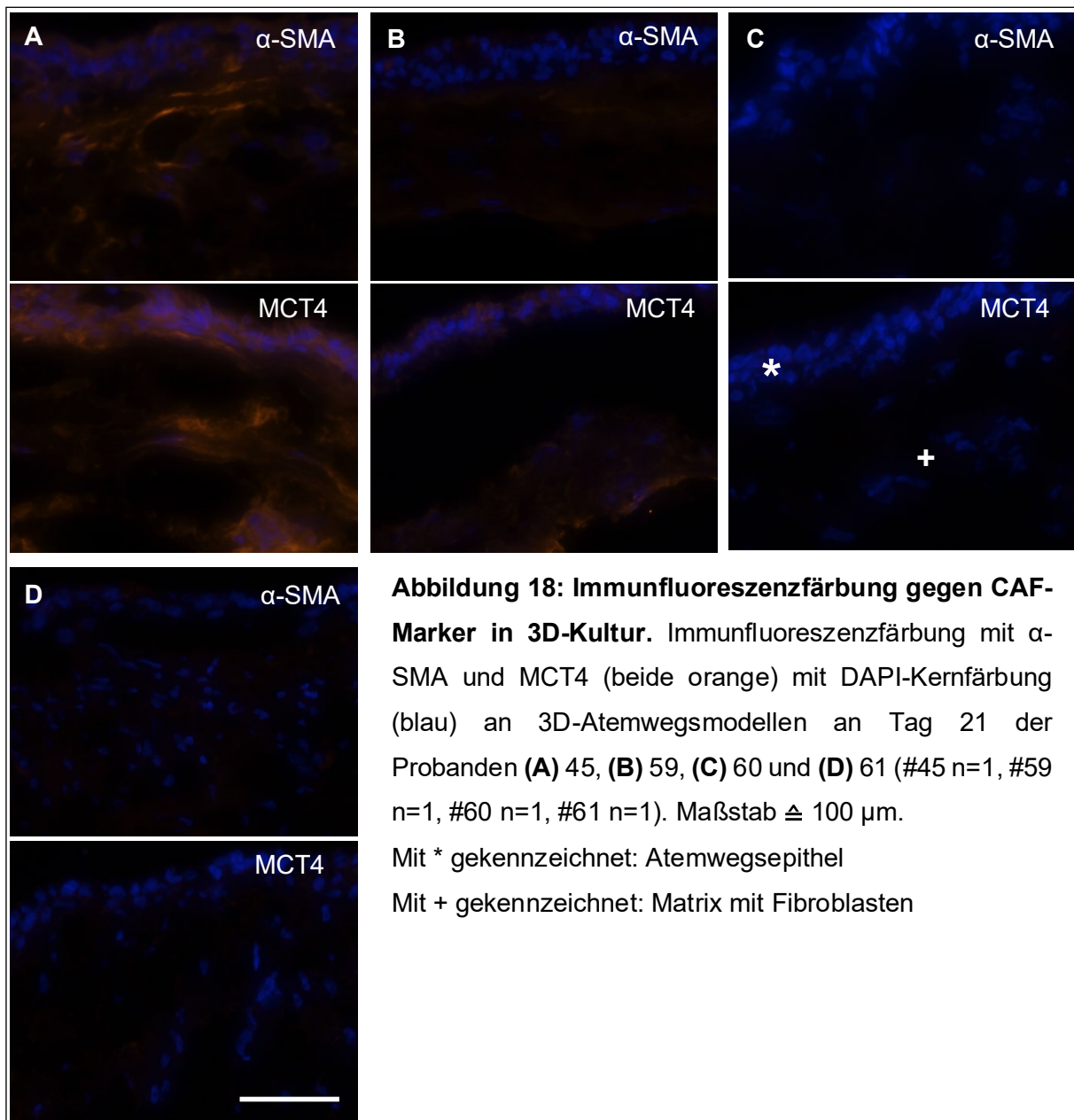


Abbildung 17: Immunfluoreszenzfärbung gegen CAF-Marker in 2D-Kultur. Immunfluoreszenzfärbung mit α -SMA, MCT4 und Vimentin (alle orange) mit DAPI-Kernfärbung (blau) an primären bronchialen Fibroblasten der Probanden **(A)** 31, **(B)** 44 und **(C)** 46 (#31 n=1, #38 n=2, #39 n=1, #44 n=1, #46 n=2). Maßstab \triangleq 100 μ m.

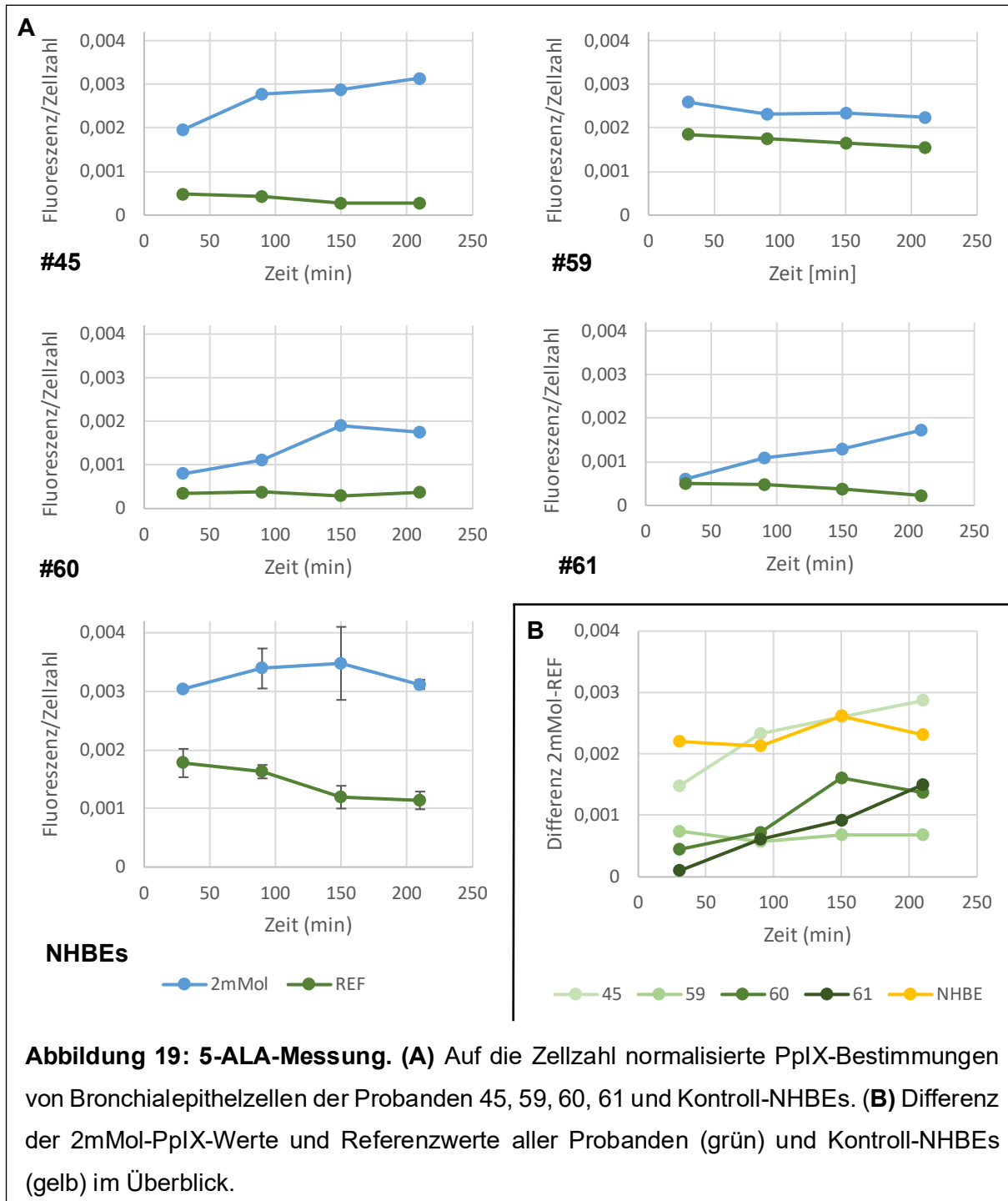
Analog wurden Immunfluoreszenzfärbungen gegen α -SMA und MCT4 an 21 Tagen kultivierten 3D-Atemwegsmodellen durchgeführt (Abbildung 18).



In Abbildung 18C sind die Bereiche des 3D-Atemwegsmodells zur Orientierung markiert. Die Antikörper α -SMA und MCT4 sind hier orange gefärbt. Bei Proband 45 wurde eine deutliche α -SMA-Färbung im Bereich der Matrix beobachtet, während die Signale von MCT4 in der Matrix, aber vor allem auch im Epithel zu finden waren (Abbildung 18A). Das Modell des Probanden 59 zeigte keine α -SMA-Signale und nur eine leichte Anfärbung von MCT4 in Epithel und Matrix (Abbildung 18B). Bei den Probanden 60 und 61 waren keine CAF-Marker nachzuweisen (Abbildung 18C+D). So wiesen zwei von vier Modellen CAF-Marker auf, jedoch in sehr unterschiedlicher Signalstärke.

4.2.2 5-ALA-Messung

Es wurde an Bronchialepithelzellen der Probanden 45, 59, 60 und 61 und an Kontroll-NHBes eine 5-ALA-Messung durchgeführt (Abbildung 19).



Die gemessenen 5-ALA-Werte wurden mittels eines MTT-Assays mit Standardkurve auf die Zellzahl normalisiert (Abbildung 19A). Die grünen Linien beschreiben die Fluoreszenz der ohne 5-ALA behandelten Wells, die blauen Linien die Fluoreszenz nach 5-ALA-Behandlung.

Bei allen Probanden konnte ein nur geringer Anstieg der PpIX-Werte über die Zeit beobachtet werden. Die höchsten PpIX-Werte erreichte Proband 45 mit knapp über 0,003. Die Kontroll-NHBEs zeigten den stabile Werte bis ungefähr 0,0035.

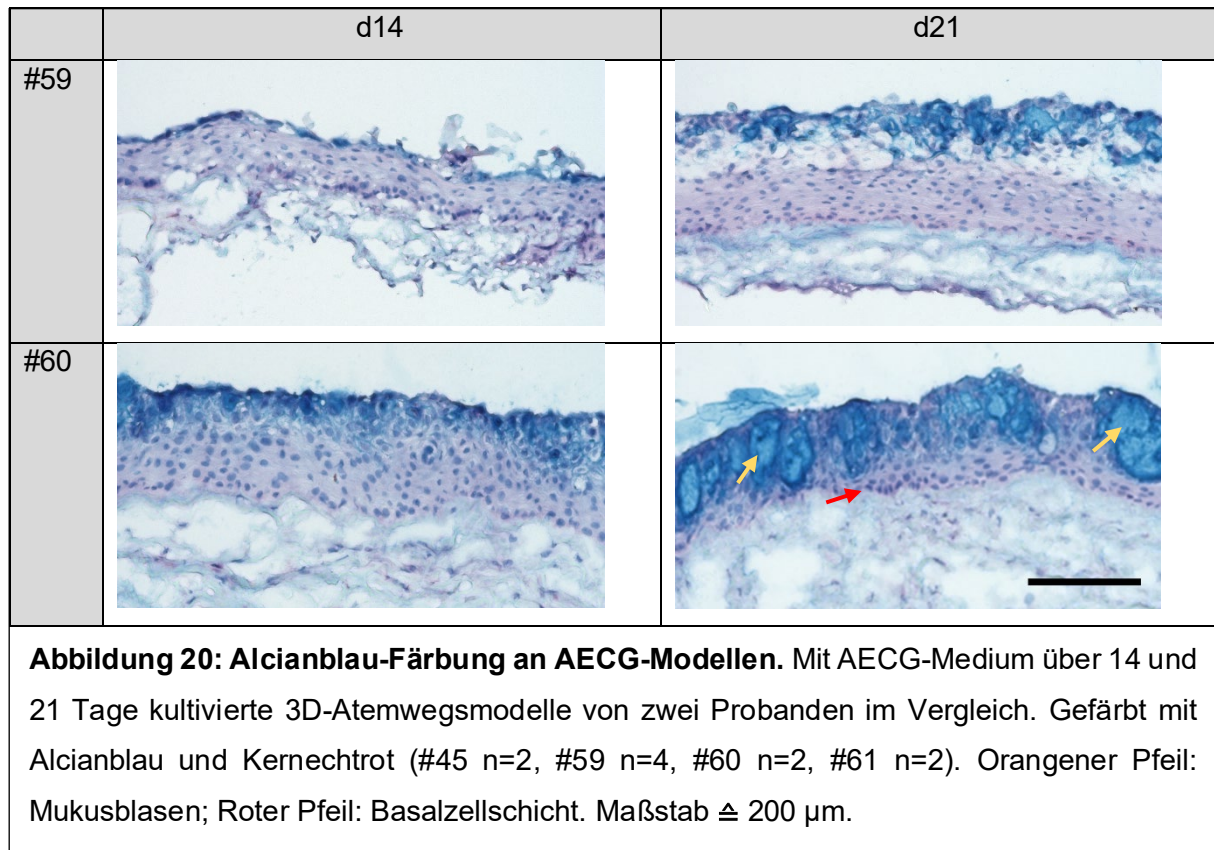
Um eine Aussage treffen zu können, ob die Epithelzellen PpIX akkumulieren, muss die Differenz der PpIX-Fluoreszenz- und Referenzwerte betrachtet werden (Abbildung 19B). Die Werte der Probanden 59, 60 und 61 lagen deutlich unter den gesunden Referenzwerten der NHBEs. Die Werte des Probanden 45 wiesen einen ähnlichen Kurvenverlauf wie die Kontroll-NHBEs auf.

4.3 3D-Modellmorphologie

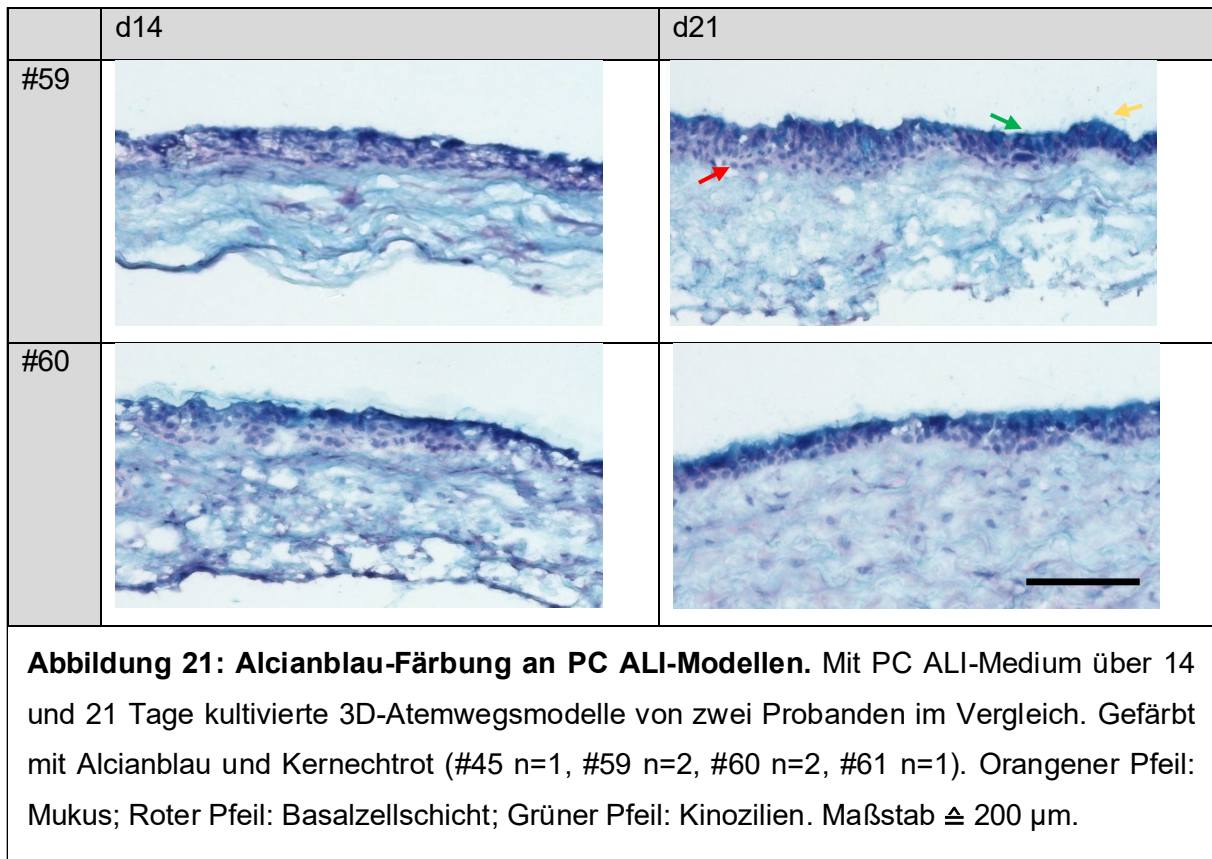
In den folgenden Kapiteln werden die 3D-Atemwegsmodelle betrachtet, die mit primären humanen Bronchialepithelzellen und Fibroblasten unter *Air-Lift*-Bedingungen und unter Verwendungen zweier verschiedener Medienansätze (AECG- und PC ALI-Medium) kultiviert wurden.

4.3.1 Allgemeine Morphologie

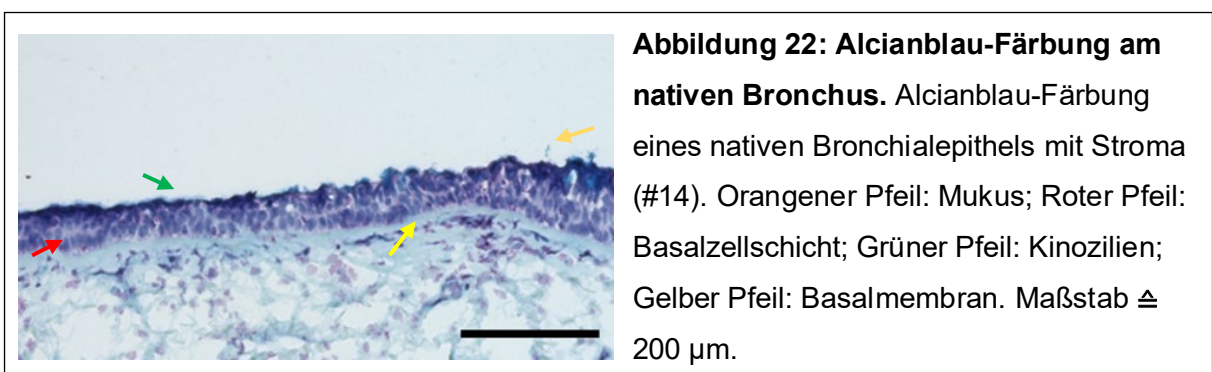
Die Verwendung verschiedener Zellkulturmedien hatte nicht nur, wie bereits in Kapitel 4.1 gezeigt, Auswirkungen auf die 2D-Kultivierung, sondern führte auch zu starken morphologischen Unterschieden im 3D-Atemwegsmodell. Die mit AECG-Medium kultivierten Modelle waren durch eine hohe morphologische Variation gekennzeichnet (Abbildung 20). Das mit primären Zellen von Proband 59 kultivierte Modell zeigte an Tag 14 ein breites mehrschichtiges Epithel mit wenig Mukusproduktion, einer nicht ganz durchgängigen Basalzellschicht und eine mit Fibroblasten durchsetzte, zerplückte Matrix. Nach 21 Tagen konnte ein ähnliches Epithel als Grundgerüst beobachtet werden, jedoch erweitert durch einen sehr locker wirkenden apikalen Zellverband mit viel Mukus und kleinen intraepithelialen Mukusblasen. Die Matrix war kompakt mit vereinzelt Fibroblastenzellkernen. Das Modell von Proband 60 war an Tag 14 durch ein sehr hohes Epithel gekennzeichnet, die Epithelzellen zeigten hier eine eher polygonale Morphologie. Apikal zeigte sich eine starke Mukusproduktion und eher locker verbundene Zellen, die teilweise von intraepitheliale Mukus umfasst waren. Es zeigte sich eine lockere Matrix mit eingewanderten Fibroblasten. Nach 21 Tagen zeigte sich weiterhin ein hohes Epithel mit einer durchgängigen Basalzellschicht. Dieses Epithel war durch eine starke ungerichtete Mukusproduktion gekennzeichnet, welche große und fast durch die gesamte Höhe des Epithels ziehende Mukusblasen zur Folge hatte. In der löchrig verbreiterten Matrix waren eingewanderte Fibroblasten zu sehen.



Alle mit PC ALI-kultivierten Modelle wiesen eine ähnliche Morphologie auf (Abbildung 21). Das Modell von Proband 59 zeigte nach 14 Tagen ein kompaktes Epithel mit angedeuteter Basalzellschicht. In der kompakten Matrix waren längliche Fibroblastenzellkerne erkennbar. Nach 21 Tage entwickelte sich ein höheres hochprismatisches Epithel mit vertikal ausgerichteten Zellen, einer schmalen apikalen Mukusschicht und bereits histologisch erkennbaren Kinozilien. Das Epithel war klar von der minimal aufgeworfenen Matrix zu trennen. Das Modell von primären Zellen des Probanden 60 zeigte an Tag 14 ein schmales Epithel mit nicht ganz durchgängiger Basalzellschicht und apikaler Mukussekretion. Die Matrix war kompakt. An Tag 21 zeigte sich ein von der Matrix klar abgrenzbares Epithel mit apikaler Mukussekretion und durchgehender Basalzellschicht. Die Matrix zeigte sich breit und mit homogen verteilten Fibroblastenzellkernen durchsetzt.



Im Vergleich wies der native Bronchus ein hochprismatisches Flimmerepithel mit apikaler Mukussekretion und histologisch erkennbaren Kinozilien auf (Abbildung 22). Neben Fibroblasten waren zusätzlich Blutgefäße im Stroma und eine Basalmembran zu erkennen. Die mit PC ALI-Medium kultivierten Modelle zeigten eine hohe morphologische Ähnlichkeit mit dem nativen Bronchus auf. Eine Basalmembran ist in keinen Modellen zu sehen. Außer dem Fehlen von Blutgefäßen ähnelt die stromale Komponente der Modelle sehr der Lamina propria des nativen Bronchus.

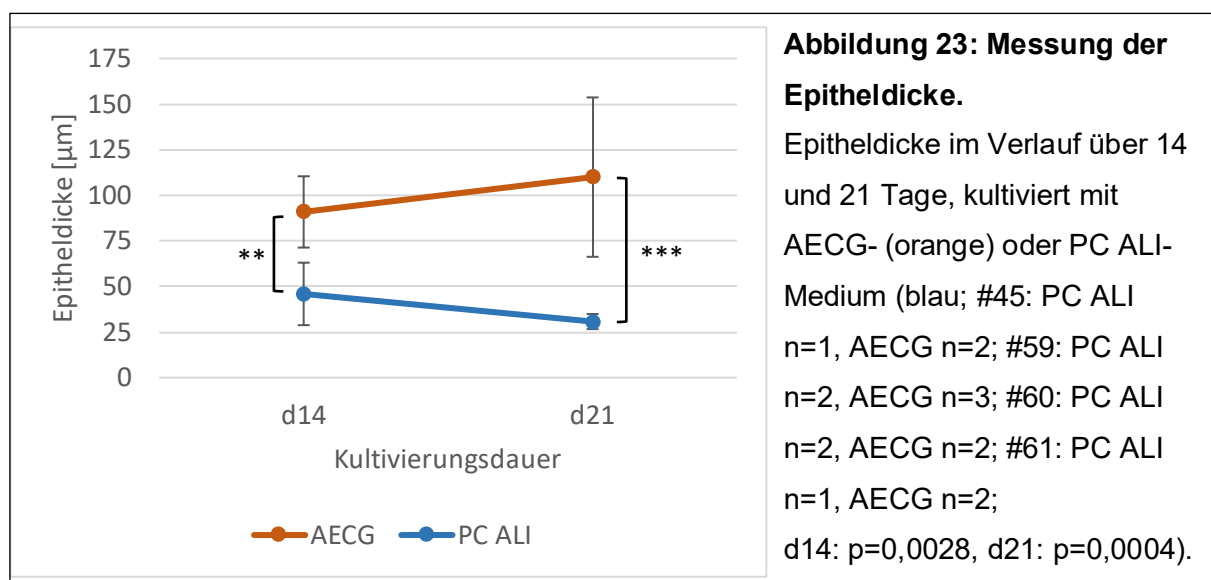


Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die mit AECG-Medium kultivierten Modelle eine hohe morphologische Variation aufwiesen, ein eher mehrschichtiges und hyperplastisches Epithel ausbildeten und durch ungerichtete Mukussekretion und damit einhergehend durch

intraepitheliale Mukusblasen gekennzeichnet waren. Die mit PC ALI-Medium kultivierten Modelle zeigten durchgehend eine ähnliche hochprismatische Morphologie mit gerichteter Mukussekretion und teils histologisch erkennbarem Ziliensaum. Vor allem nach 21 Tagen *Air-Lift*-Kultivierung wiesen die mit PC ALI-Medium kultivierten Modelle histologisch ein Flimmerepithel auf.

4.3.2 Bestimmung der Epitheldicke

Die Verwendung verschiedener Medienansätze führte zu einer unterschiedlichen Morphologie des Epithels. So entwickelten sich bei Kultivierung mit AECG-Medium eher mehrschichtige, hyperplastische Epithelien, während die mit PC ALI-Medium kultivierten Modelle im Verlauf kompakter und hochprismatischer wurden. Zur weiteren Charakterisierung des Epithelaufbaus, wurde die Epitheldicke der Modelle nach 14 und 21 Tagen vermessen (Abbildung 23).



Die mit AECG-Medium kultivierten Modelle entwickelten nach 14 Tagen ein Epithel mit im Mittel 90,9 µm Dicke (+/- 19,6 µm). Nach 21 Tagen stieg die durchschnittliche Epitheldicke bis auf 110,0 µm an, mit einer Standardabweichung von +/- 43,7 µm. Im Vergleich waren die mit PC ALI-Medium kultivierten Modelle dünner mit einer nach 14 Tagen gemessenen mittleren Epitheldicke von 46,0 µm (+/- 17,1 µm), die im Verlauf nach 21 Tagen auf durchschnittlich 30,8 µm abfiel (+/- 4,1 µm). Somit unterschieden sich die Epitheldicken beider Medien an beiden Tagen signifikant (d14: p=0,0028 und d21: p=0,0004). Der Anstieg der mit AECG-Medium kultivierten Modelle von Tag 14 bis Tag 21 war nicht signifikant. Die mit PC ALI-Medium kultivierten Modelle unterschieden sich im Verlauf signifikant (p=0,0152).

4.3.3 Fibroblasten-Co-Kultur

Die Modelle wurden als Co-Kultur mit Fibroblasten aufgebaut, um die epitheliale Differenzierung zu fördern und um eine höhere *in vivo/in vitro*-Korrelation zu erlangen. Um eine Aussagen über die Qualität der Co-Kultur treffen zu können, wurde das Vorhandensein von in die Matrix eingewanderten primären bronchialen Fibroblasten überprüft.

In Kapitel 4.3.1 wurde bereits die histologische Matrixmorphologie samt Fibroblasten beurteilt. Weiterführend wurde die Co-Kultur mittels Immunfluoreszenzfärbungen gegen Vimentin charakterisiert (Abbildung 24). Jedes der gezeigten Modelle wies positive Vimentin-Signale in der Matrix auf. Allein die Signalverteilung unterschied sich minimal zwischen den Probanden bzw. den Kultivierungsansätzen. Die meisten Modelle wiesen homogen verteilte Vimentin-Signale in der gesamten Matrix auf.

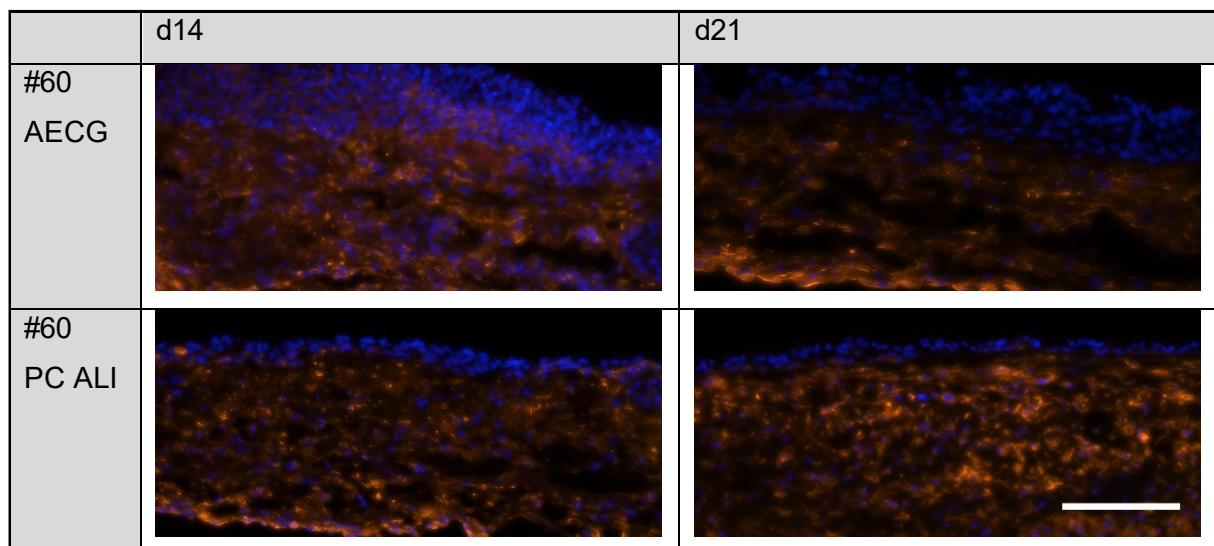


Abbildung 24: Vimentin-Immunfluoreszenzfärbung in 3D-Kultur.

Immunfluoreszenzfärbungen von 3D-Atmwegsmodellen gegen Vimentin (orange) und DAPI-Kernfärbung (blau), beispielhaft am Probanden 60. Die Modelle wurden für 14 oder 21 Tage mit AECG- oder PC ALI-Medium kultiviert (#45: PC ALI n=1, AECG n=2; #59: PC ALI n=2, AECG n=3; #60 PC ALI n=2, AECG n=2; #61: PC ALI n=1, AECG n=2).

Maßstab \pm 200 μ m.

Die Immunfluoreszenzfärbungen gegen Vimentin im nativen Bronchusgewebe zeigten eine homogene Verteilung von Fibroblasten in der Lamina propria unterhalb des Epithels (Abbildung 25). Im Vergleich zu den 3D-Modellen sind die Vimentin-Signale ähnlich homogen verteilt, im Bronchusgewebe erscheinen sie lediglich etwas punktueller.

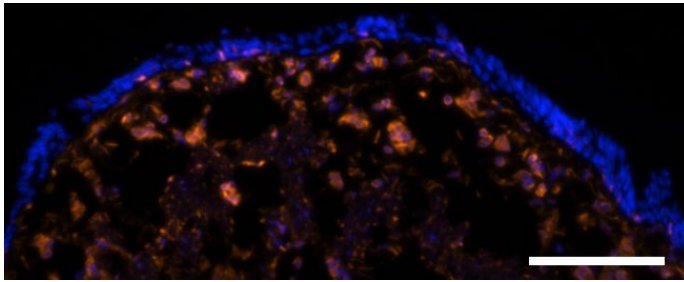


Abbildung 25: Vimentin-Immunfluoreszenzfärbung am nativen Bronchus.

Immunfluoreszenzfärbung gegen Vimentin (orange) und DAPI-Kernfärbung (blau) eines nativen Bronchus (#14). Maßstab \triangleq 200 μ m.

Um eine semiquantitative Aussage über das Vorhandensein von Fibroblasten in der Matrix treffen zu können, wurden die Modelle anhand eines Punktesystems bewertet (Abbildung 26). Null Punkte entsprachen einer Abwesenheit von Fibroblasten, ein Punkt entsprach vereinzelt Signalen, zwei Punkte entsprachen einer inhomogenen Verteilung, drei Punkte entsprachen einer homogenen Verteilung.

Die Epithelien, welche mit AECG-Medium kultiviert wurden, erreichten an Tag 14 durchschnittlich 2,8 (\pm 0,3) und an Tag 21 3,0 Punkte (\pm 0,0). Es kam also an beiden Zeitpunkten zu einer homogenen Verteilung der Fibroblasten. Die mit PC ALI-Medium kultivierten Modelle erreichten an Tag 14 durchschnittlich 2,3 (\pm 0,9) und an Tag 21 2,3 Punkte (\pm 0,7), was für eine inhomogene Verteilung der Fibroblasten in der Matrix spricht.

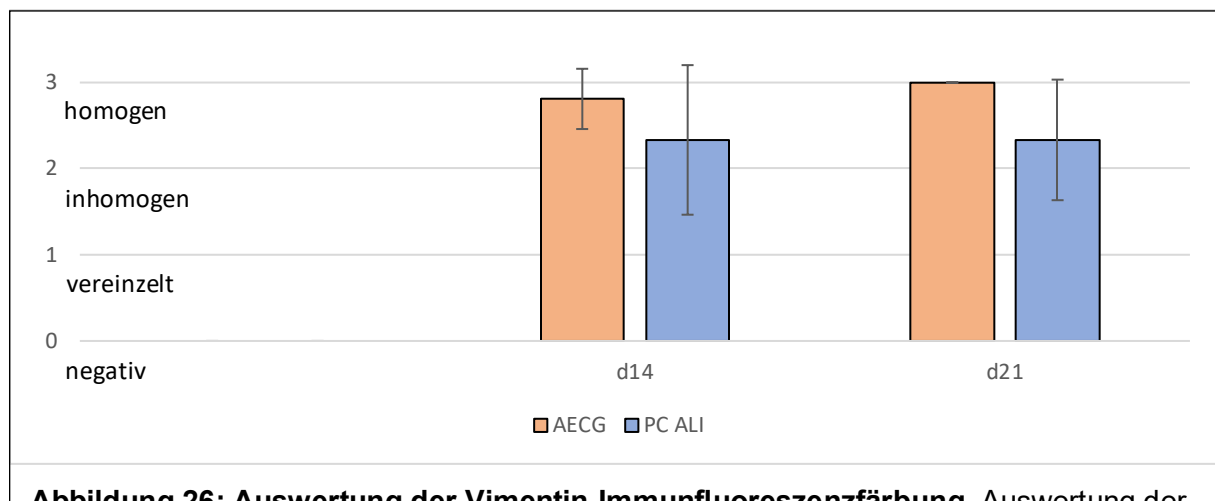


Abbildung 26: Auswertung der Vimentin-Immunfluoreszenzfärbung. Auswertung der Vimentin-Immunfluoreszenzfärbung von Modellen, die mit AECG- oder PC ALI-Medium über 14 und 21 Tage kultiviert wurden. An der Ordinate sind die vergebenen Punkte erläutert (#45: PC ALI n=1, AECG n=2; #59: PC ALI n=2, AECG n=1; #60: PC ALI n=2, AECG n=2, #61: AECG n=2).

4.4 3D-Modelldifferenzierung

Das bronchiale Flimmerepithel setzt sich hauptsächlich aus differenzierungsfähigen Basalzellen, Kinozilien-tragenden Zilienzellen und Mukus produzierenden Becherzellen zusammen. Diese Zelltypen weisen bestimmte Differenzierungsmerkmale auf, die durch verschiedene Methoden nachgewiesen werden können. Im folgenden Kapitel werden diese Differenzierungsmerkmale an den mit AECG- oder PC ALI-Medium kultivierten 3D-Atemwegsmodellen untersucht, um so eine Aussage über den Differenzierungsgrad der Modelle treffen zu können. Es wird auf allgemeine Differenzierungsmerkmale, auf die Ziliendifferenzierung im Speziellen und auf die Barriereigenschaften des Epithels eingegangen.

4.4.1 Allgemeine Differenzierung

4.4.1.1 Becherzellen und Mukusproduktion

Die Mukusbarriere wird im humanen bronchialen Epithel hauptsächlich durch die beiden sekretorischen Muzine Muc5B und Muc5AC gebildet, die durch Becherzellen sezerniert werden. 3D-Atemwegsmodelle wurden mittels Immunfluoreszenzfärbung gegen Mu5B und Mu5AC gefärbt (Abbildung 27).

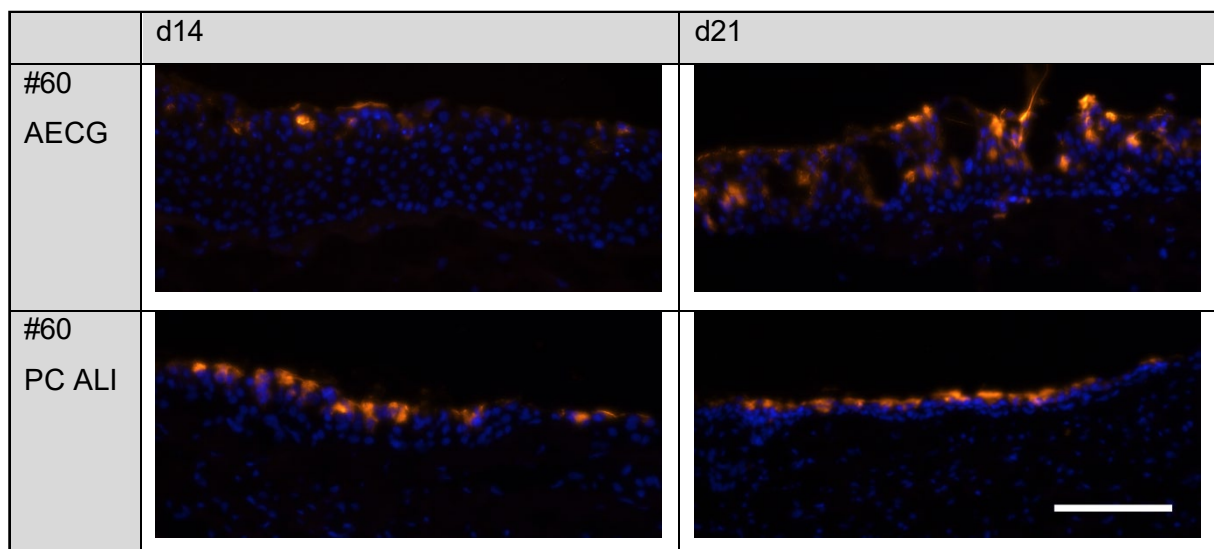


Abbildung 27: Muc5B-Immunfluoreszenzfärbung in 3D-Kultur.

Immunfluoreszenzfärbungen von 3D-Atemwegsmodellen gegen Muc5B (orange) und DAPI-Kernfärbung (blau), beispielhaft am Probanden 60. Die Modelle wurden für 14 oder 21 Tage mit AECG- oder PC ALI-Medium kultiviert (#45: PC ALI n=1, AECG n=2; #59: PC ALI n=2, AECG n=3; #60 PC ALI n=2, AECG n=2; #61: PC ALI n=1, AECG n=2).

Nach 14 Tagen Kultivierung mit AECG-Medium konnte nur eine leichte inhomogene Mukussekretion ausgemacht werden, die apikal erfolgte. Nach 21 Tagen konnte man einen breiten Epithelaufbau mit vor allem ungerichteter intraepithelialer Mukussekretion erkennen. Im Vergleich zeigten die mit PC ALI-Medium kultivierten Modelle ein flacheres Epithel mit ausschließlich nach apikal sezerniertem Muc5B. Bereits an Tag 14 produzierte das mit PC ALI-Medium kultivierte Epithel deutlich mehr Muc5B. Die Sekretion stieg im Verlauf bis Tag 21 weiter an.

Im Vergleich dazu zeigte die Immunfluoreszenzfärbung gegen Muc5B im nativen Bronchusgewebe ebenfalls eine rein apikale Mukussekretion, die in einer fast durchgehenden Mukusschicht resultierte (Abbildung 28).

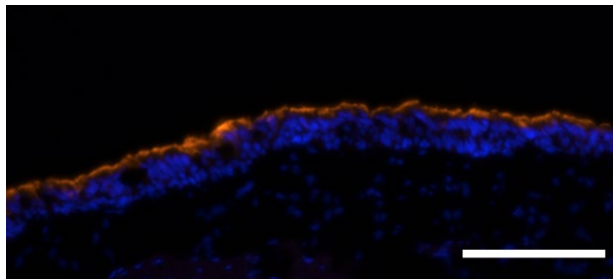


Abbildung 28: Muc5B-Immunfluoreszenzfärbung am nativen Bronchus. Immunfluoreszenzfärbung gegen Muc5B (orange) und DAPI-Kernfärbung (blau) eines nativen Bronchus (#14). Maßstab \triangleq 200 μ m.

Um eine semiquantitative Aussage über die Muc5B-Sekretion treffen zu können, wurden die Modelle mittels eines Punktesystems bewertet (Abbildung 29). Null Punkte entsprachen keinerlei Sekretion, ein Punkt entsprach vereinzelter Sekretion, zwei Punkte entsprachen einer Sekretion, die unter 50 % der epithelialen Oberfläche ausmachte und drei Punkte entsprachen einer Sekretion, die über 50 % der epithelialen Oberfläche ausmachte. Bei beiden Medien konnte man im Verlauf einen Anstieg der Muc5B-Sekretion erkennen. Die Epithelien, welche mit AECG-Medium kultiviert wurden, erreichten an Tag 14 durchschnittlich 1,8 (\pm 0,4) und an Tag 21 2,4 Punkte (\pm 0,6). Es waren also an beiden Zeitpunkten unter 50% der epithelialen Oberfläche mit Muc5B bedeckt. Die mit PC ALI-Medium kultivierten Modelle erreichten an Tag 14 durchschnittlich 2,6 (\pm 0,5) und an Tag 21 3 Punkte (\pm 0). An Tag 14 und 21 waren über 50 % der Oberfläche mit Muc5B bedeckt. Wie in Abbildung 20 gezeigt, kam es bei manchen Modellen zu ungerichteter intraepithelialer Mukusproduktion. Die Prozentzahlen im Diagramm beschreiben den Anteil von untersuchten Bereichen, bei denen eine ungerichtete Sekretion festgestellt wurde. Die mit AECG-Medium kultivierten Modelle wiesen einen Anteil von 22,2 % an Tag 14 und 44,4 % an Tag 21 auf. Im Vergleich konnte bei den mit PC ALI-Medium kultivierten Modellen an Tag 14 keine ungerichtete Sekretion festgestellt werden, während die Modelle an Tag 21 einen Anteil von 5,6 % aufwiesen.

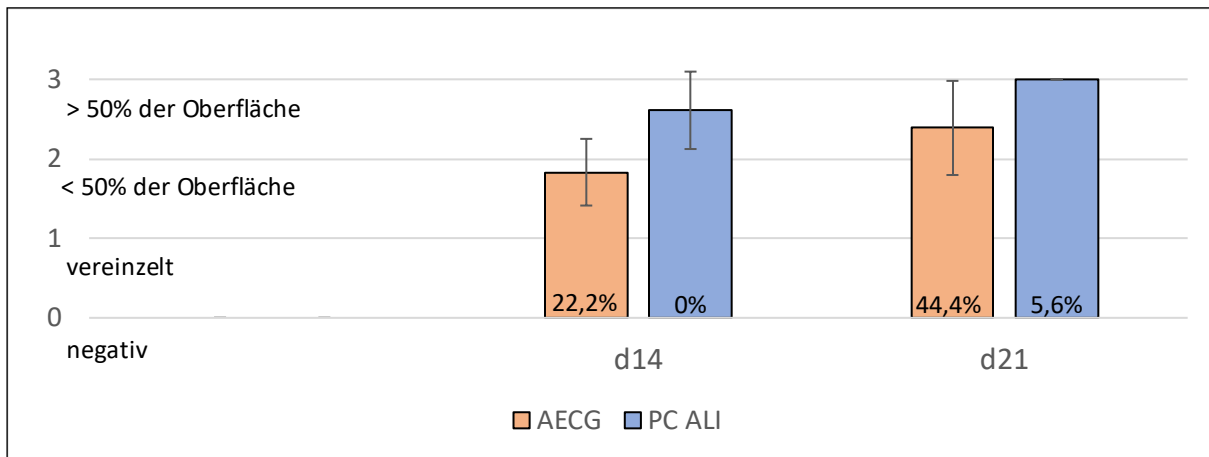


Abbildung 29: Auswertung der Muc5B-Immunfluoreszenzfärbung. Auswertung der Muc5B-Immunfluoreszenzfärbung von Modellen, die mit AECG- oder PC ALI-Medium über 14 und 21 Tage kultiviert wurden. An der Ordinate sind die vergebenen Punkte erläutert. Die Prozentzahlen im entsprechenden Datensatz stehen für den Anteil der untersuchten Bereiche, die eine ungerichtete, intraepitheliale Mukussekrektion aufwiesen (#45: PC ALI n=1, AECG n=1; #59: PC ALI n=2, AECG n=1; #60: PC ALI n=2, AECG n=2; #61: PC ALI n=1, AECG n=2).

Analog zu Muc5B wurden die gleichen Analysen zum Muzin Muc5AC durchgeführt (Abbildung 30).

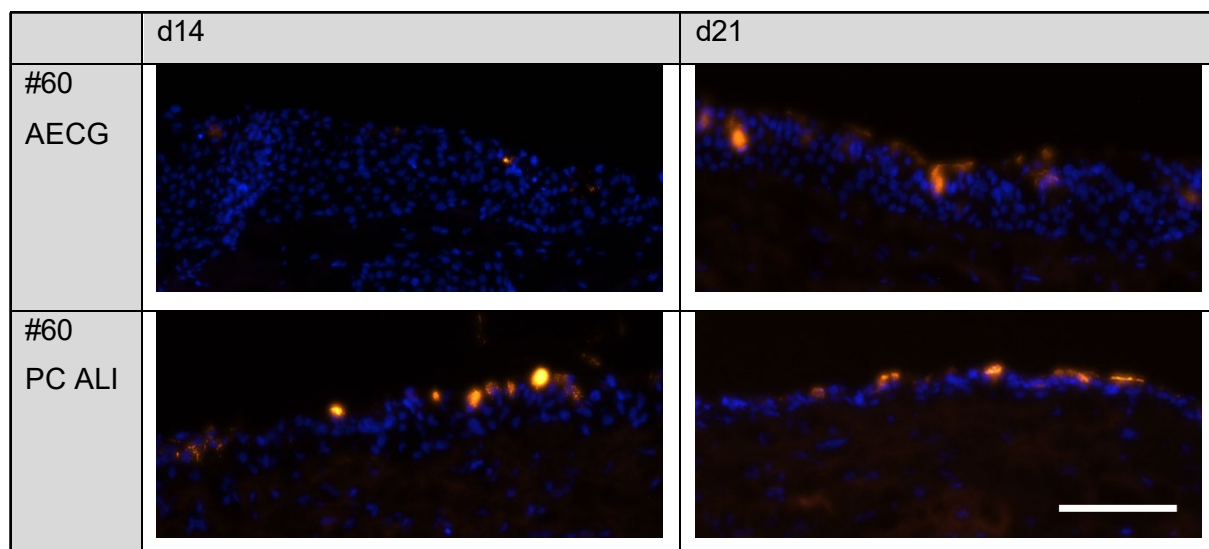
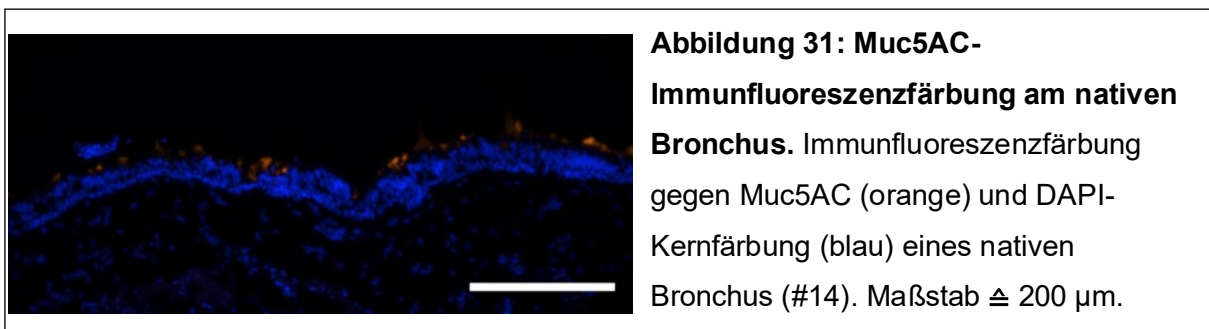


Abbildung 30: Muc5AC-Immunfluoreszenzfärbung in 3D-Kultur.

Immunfluoreszenzfärbungen von 3D-Atemwegsmodellen gegen Muc5AC (orange) und DAPI-Kernfärbung (blau), beispielhaft am Probanden 60. Die Modelle wurden für 14 oder 21 Tage mit AECG- oder PC ALI-Medium kultiviert (#45: PC ALI n=1, AECG n=2; #59: PC ALI n=2, AECG n=3; #60 PC ALI n=2, AECG n=2; #61: PC ALI n=1, AECG n=2). Maßstab $\triangleq 200 \mu\text{m}$.

Nach 14 Tagen Kultivierung mit AECG-Medium konnte man nur einzelne positive Muc5AC-Signale erkennen. Die Sekretion ist tendenziell bis Tag 21 angestiegen, teilweise auch ungerichtet intraepithelial. Die Kultivierung mit PC ALI-Medium zeigte nach 14 Tagen mehr Muc5AC-Sekretion als die Kultivierung mit AECG-Medium, jedoch erfolgte die Sekretion hier auch eher aus mehreren vereinzelt Becherzellen. Die Sekretion stieg hier nach 21 Tagen nur leicht an. Eine durchgehende Mukusschicht ähnlich zur Muc5B-Sekretion wurde hier nicht gebildet.

Die Immunfluoreszenzfärbung gegen Muc5AC im nativen Bronchus zeigte vereinzelte apikale Muc5AC-Signale, also eine deutlich geringe Muc5AC als Muc5B-Sekretion (Abbildung 31). Die Muc5AC-Sekretion der PC ALI-Modelle ähnelt der Sekretion des nativen Bronchus.



Analog zur Auswertung von Muc5B wurden die Modelle mit dem gleichen Punktesystem ausgewertet (Abbildung 32). Es konnte verglichen mit Muc5B eine im Allgemeinen niedrigere Muc5AC-Sekretion festgestellt werden. Die mit AECG-Medium kultivierten Modelle erreichten an Tag 14 durchschnittlich 0,8 Punkte (\pm 0,5). An Tag 21 stieg die Sekretion auf 1,3 Punkte (\pm 0,9). Es fand an beiden Tagen eine eher vereinzelte Muc5AC-Sekretion statt. Im Vergleich erreichten die mit PC ALI-Medium kultivierten Modelle 1,8 Punkte an Tag 14 (\pm 0,2) und 1,9 Punkte an Tag 21 (\pm 0,3). Bei diesen Modellen fand also eher eine Sekretion statt, die unter 50 % der epithelialen Oberfläche ausmachte. Die mit AECG-Medium kultivierten Modelle wiesen einen Anteil an ungerichteter Muc5AC-Sekretion von 11,1 % an Tag 14 und 50,0 % an Tag 21 auf. Die mit PC ALI-Medium kultivierten Epithelien zeigten an Tag 14 einen minimal höheren Anteil von 13,3 %, der nach 21 Tagen auf 6,7 % sank.

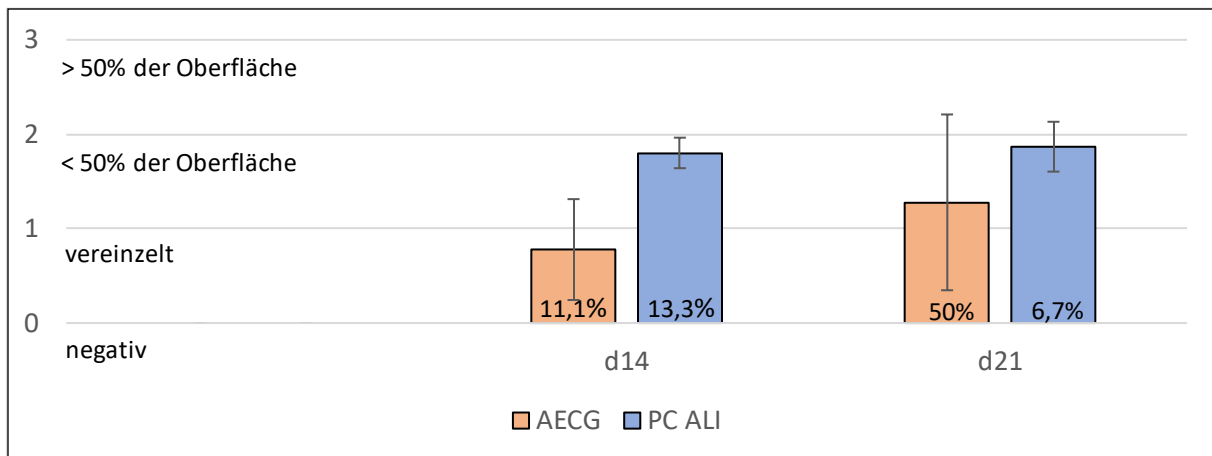


Abbildung 32: Auswertung der Muc5AC-Immunfluoreszenzfärbung. Auswertung der Muc5AC-Immunfluoreszenzfärbung von Modellen, die mit AECG- oder PC ALI-Medium über 14 und 21 Tage kultiviert wurden. An der Ordinate sind die vergebenen Punkte erläutert. Die Prozentzahlen im entsprechenden Datensatz stehen für den Anteil der untersuchten Bereiche, die eine ungerichtete, intraepitheliale Mukussekretion aufwiesen (#45: PC ALI n=1, AECG n=1; #59: PC ALI n=2, AECG n=1; #60: PC ALI n=2, AECG n=2; #61: AECG n=2).

Zusammenfassend ließ sich bei beiden Medien ein Anstieg der Muc5B/AC-Sekretion von Tag 14 auf Tag 21 feststellen. Die mit AECG-Medium kultivierten Modelle zeigten eine geringere und auch ungerichtete Muzin-Sekretion als die mit PC ALI-Medium kultivierten Modelle. Es wurde weniger Muc5AC als Muc5B sezerniert. Die Muzinsekretion der mit PC ALI-Medium kultivierten Modelle wies eine hohe Ähnlichkeit mit der des nativen Bronchus auf.

4.4.1.2 Zell-Zell-Kontakte

Zell-Zell-Kontakte sind unerlässlich für die Funktion eines Epithels. Dazu gehören *Tight Junctions* und die vor allem für die mechanische Stabilität verantwortlichen *Adherens Junctions* bzw. Desmosomen. Die Ausbildung von *Tight Junctions* wird in Kapitel 4.4.3 (Barriereigenschaften) genauer betrachtet. Im Folgenden wurden die 3D-Atemwegsmodelle mittels Immunfluoreszenzfärbungen auf das Vorhandensein von E-Cadherin untersucht, welches eines der wichtigsten Bestandteile von epithelialen *Adherens Junctions* und Desmosomen ist (Abbildung 33).

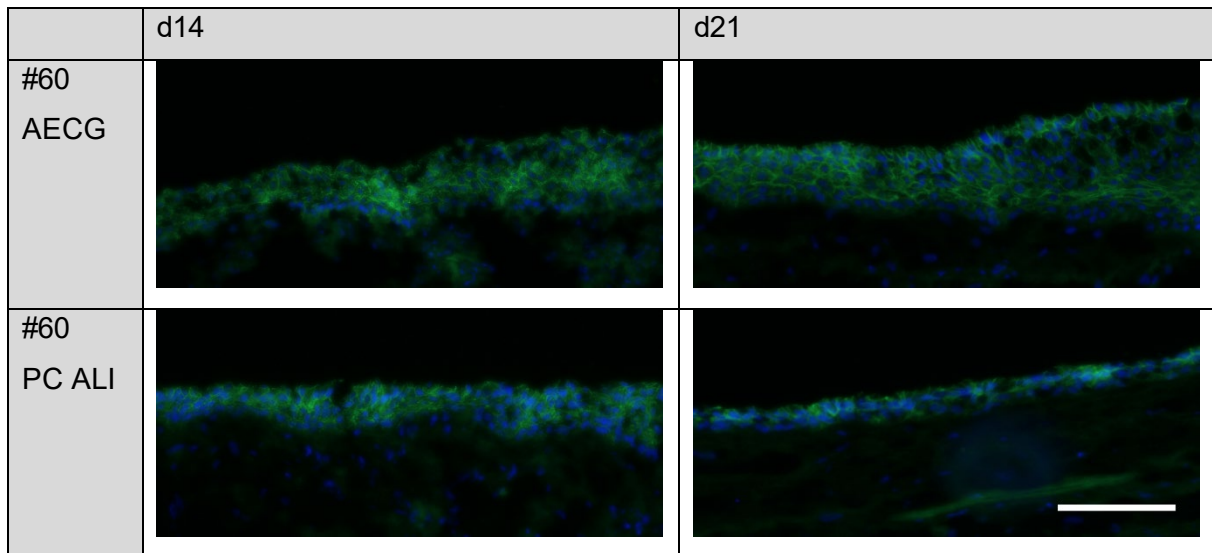


Abbildung 33: E-Cadherin-Immunfluoreszenzfärbung in 3D-Kultur.

Immunfluoreszenzfärbungen von 3D-Atemwegsmodellen gegen E-Cadherin (grün) und DAPI-Kernfärbung (blau), beispielhaft am Probanden 60. Die Modelle wurden für 14 oder 21 Tage mit AECG- oder PC ALI-Medium kultiviert (#45: PC ALI n=1, AECG n=2; #59: PC ALI n=2, AECG n=3; #60 PC ALI n=2, AECG n=2; #61: PC ALI n=1, AECG n=2).

Maßstab $\pm 200 \mu\text{m}$.

Bei den hier gezeigten Modellen ließ sich eine homogene und membranständige E-Cadherin-Verteilung erkennen. Es konnten wenig Unterschiede sowohl zwischen den beiden Zeitpunkten, als auch zwischen den mit AECG- oder PC ALI-Medium kultivierten Modellen ausgemacht werden. Aufgrund des eher hyperplastisch mehrschichtigen Epithels bei Kultivierung mit AECG-Medium konnte man hier eher flache bis polygonale Zellen erkennen, während die Zellen in der Kultivierung mit PC ALI-Medium hochprismatisch aufgerichtet waren. Ungeachtet der Zellmorphologie unterschied sich die qualitative Verteilung von E-Cadherin nicht.

Die Immunfluoreszenzfärbung gegen E-Cadherin im nativen Bronchus zeigte ebenfalls membranständige Signale an hochprismatisch aufgerichteten Zellen (Abbildung 34).

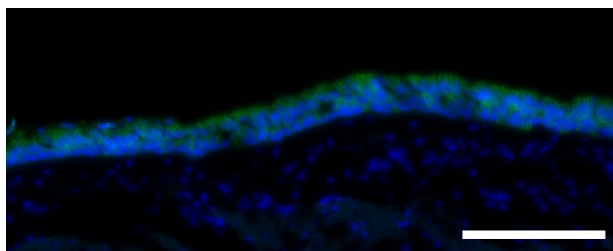
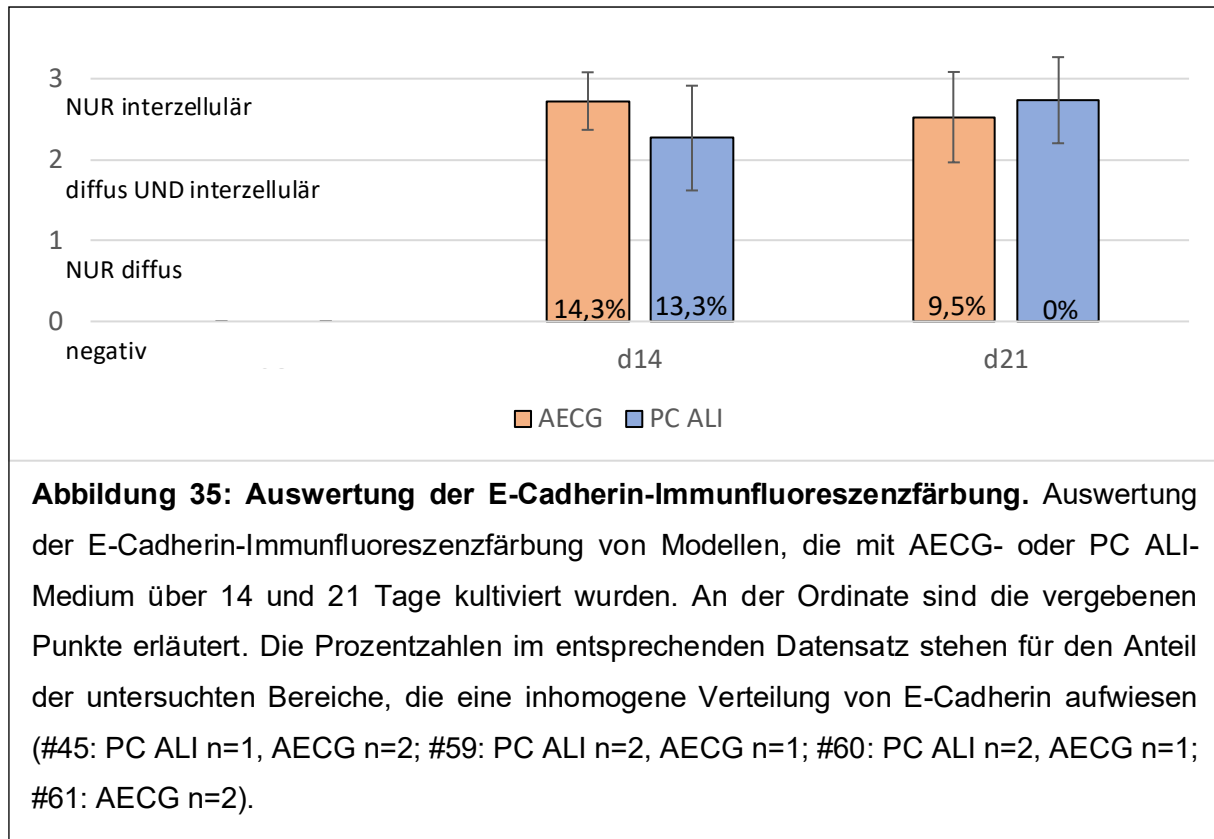


Abbildung 34: E-Cadherin-Immunfluoreszenzfärbung am nativen Bronchus. Immunfluoreszenzfärbung gegen E-Cadherin (orange) und DAPI-Kernfärbung (blau) eines nativen Bronchus (#14). Maßstab $\pm 200 \mu\text{m}$.

Auch für E-Cadherin wurden die Modelle mittels eines Punkteverfahrens bewertet (Abbildung 35). Null Punkte entsprachen einem negativen Signal, ein Punkt entsprach einem rein diffusen Signal, zwei Punkte entsprachen einem diffusen und interzellulären Signal und drei Punkte entsprachen einem rein interzellulären Signal.



Die mit AECG-Medium kultivierten Modelle erreichten an Tag 14 eine Punktzahl von 2,7 (+/- 0,4) und nach 21 Tagen von 2,5 (+/- 0,6). In diesen Modellen war E-Cadherin rein interzellulär lokalisiert. Die mit PC ALI-Medium kultivierten Modelle erreichten nach 14 Tagen 2,3 Punkte (+/- 0,6) und nach 21 Tagen 2,7 Punkte (+/- 0,5). Während in diesen Modellen E-Cadherin nach 14 Tagen noch diffus und interzellulär E-Cadherin lokalisiert war, war E-Cadherin nach 21 Tagen Kultivierung mit PC ALI-Medium rein interzellulär vorhanden. Bei einigen Modellen wurde E-Cadherin nicht homogen über das ganze Epithel ausgebildet. Die Anteile dieser inhomogenen Bereiche an allen untersuchten Bereichen sind in Abbildung 35 als Prozentzahl dargestellt. Die Kultivierung mit AECG-Medium nach 14 Tagen ergab einen Anteil von durchschnittlich 14,3 %, nach 21 Tagen nur noch von 9,5 %. Bei den Modellen, die mit PC ALI-Medium kultiviert wurden, war der Anteil von inhomogen verteiltem E-Cadherin nach 14 Tagen bei 13,3 %. Nach 21 Tagen war E-Cadherin bei allen Modellen homogen über das gesamte Epithel lokalisiert.

4.4.1.3 Basalzellen

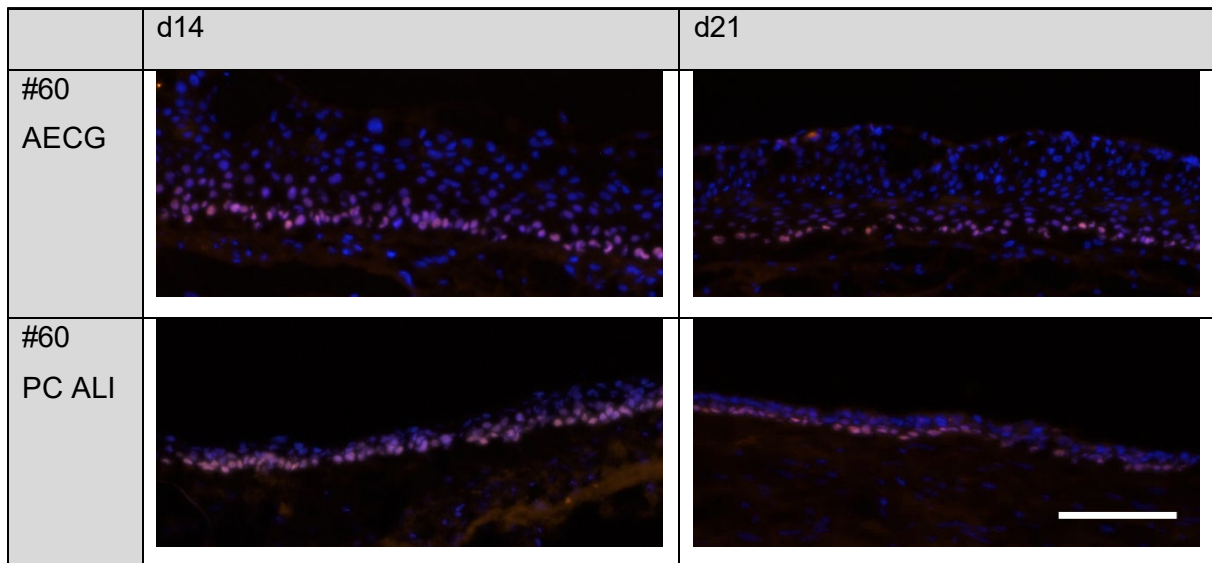


Abbildung 36: p63-Immunfluoreszenzfärbung in 3D-Kultur.

Immunfluoreszenzfärbungen von 3D-Atemwegsmodellen gegen p63 (orange) und DAPI-Kernfärbung (blau), beispielhaft am Probanden 60. Die Modelle wurden für 14 oder 21 Tage mit AECG- oder PC ALI-Medium kultiviert (#45: PC ALI n=1, AECG n=2; #59: PC ALI n=2, AECG n=3; #60 PC ALI n=2, AECG n=2; #61: PC ALI n=1, AECG n=2). Maßstab \triangleq 200 μ m.

Basalzellen sind die Grundlage für ein vitales und differenzierungsfähiges Epithel. Die Atemwegsmodelle wurden mittels Immunfluoreszenz gegen das Protein p63 untersucht (Abbildung 36). In der untersten basal gelegenen Zellschicht des Epithels wurde eine durchgehende Basalzellschicht mittels p63 identifiziert. Das p63-Signal war in der basalen Schicht am stärksten und wurde nach apikal schwächer. Die weiter apikal gelegenen Zellkerne waren p63-negativ. Immunfluoreszenzfärbungen gegen p63 im nativen Bronchus zeigten ebenfalls eine durchgehende Basalzellschicht (Abbildung 37).

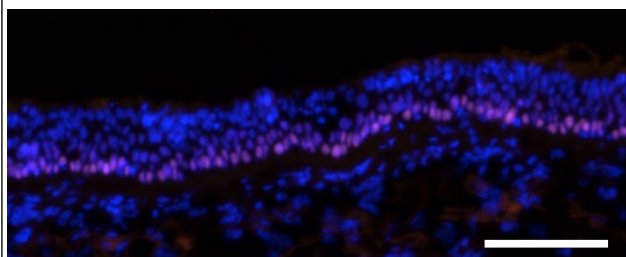
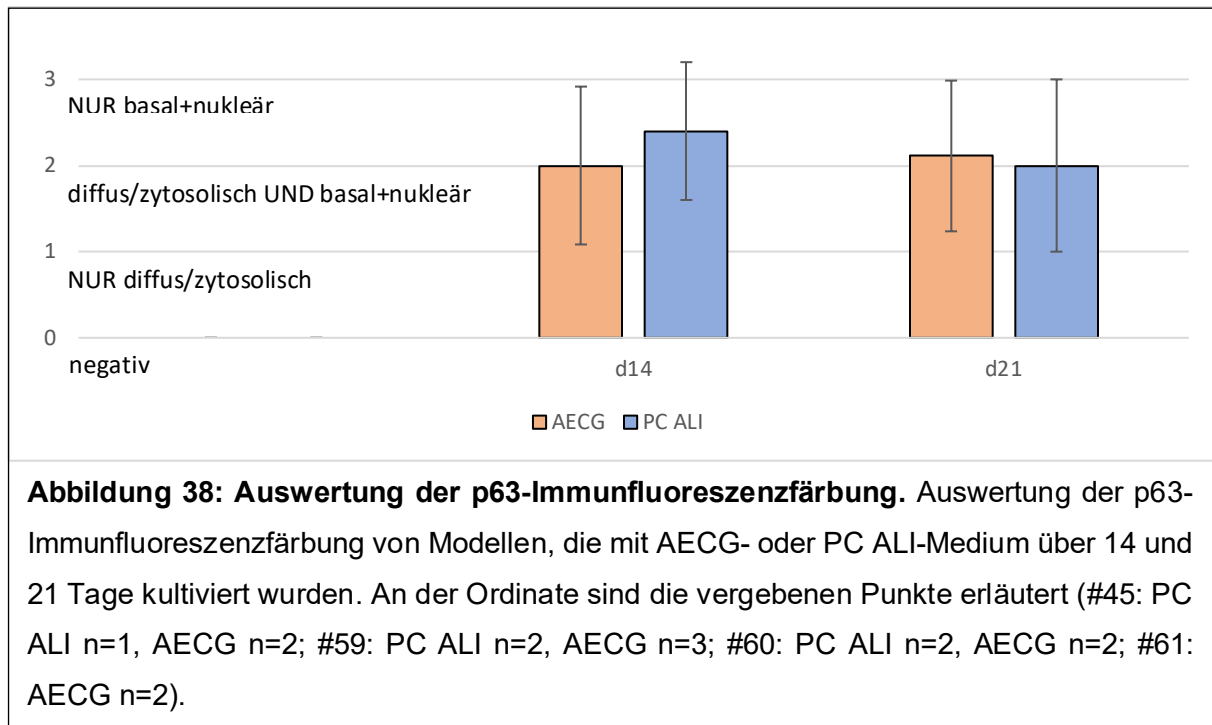


Abbildung 37: p63-Immunfluoreszenzfärbung am nativen Bronchus. Immunfluoreszenzfärbung gegen p63 (orange) und DAPI-Kernfärbung (blau) eines nativen Bronchus (#14). Maßstab \triangleq 100 μ m.

Für die p63-Färbungen wurden die Modelle mittels eines Punktesystems bewertet (Abbildung 38). Null Punkte entsprach einem negativen Signal, ein Punkt entsprach einer rein diffusen oder zytosolischen Lokalisation, zwei Punkte entsprachen einer diffus-zytosolischen und einer basal-nukleären Lokalisation und drei Punkte entsprachen einer reinen basalen und nukleären Lokalisation.



In beiden Kultivierungsansätzen konnte ein ähnliches Lokalisationsmuster erkannt werden. Die mit AECG-Medium kultivierten Modelle erreichten nach 14 Tagen eine Punktzahl von 2,0 (+/- 0,9) und nach 21 Tagen von 2,1 (+/- 0,9). Die Kultivierung mit PC ALI-Medium erreichte nach 14 Tagen eine Punktzahl von 2,4 (+/- 0,8) und nach 21 Tagen eine Punktzahl von 2,0 (+/- 1,0). Die 3D-Modelle wiesen also unabhängig vom Mediumansatz ein basal-nukleäres p63-Signal mit meist zusätzlichem diffus-zytosolischem Signal auf.

4.4.2 Ziliendifferenzierung

Schlagende Kinozilien sind ein wichtiges Differenzierungsmerkmal des bronchialen Flimmerepithels. Im folgenden Kapitel wurde das gebildete Flimmerepithel mittels Immunfluoreszenzfärbungen und semiquantitativ durch *Western Blots* untersucht.. Anschließend wurde mittels Analyse der Zilienschlagfrequenz die Zilienfunktion untersucht. Um die Entwicklung der bronchialen Kinozilien sichtbar zu machen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen gegen ac. α -Tubulin durchgeführt (Abbildung 39). Durch Kultivierung mit AECG-Medium kam es nach 14 Tagen zu keiner Zilienentwicklung. Nach 21 Tagen hatten sich apikal auf dem hyperplastischen Epithel vereinzelt Zilien gebildet.

Die Kultivierung mit PC ALI-Medium führte bereits nach 14 Tagen zu einem ausgeprägten apikalen Ziliensaum, der nahezu 50 % der Oberfläche ausmachte. Nach 21 Tagen hatte sich ein fast durchgehender Ziliensaum entwickelt.

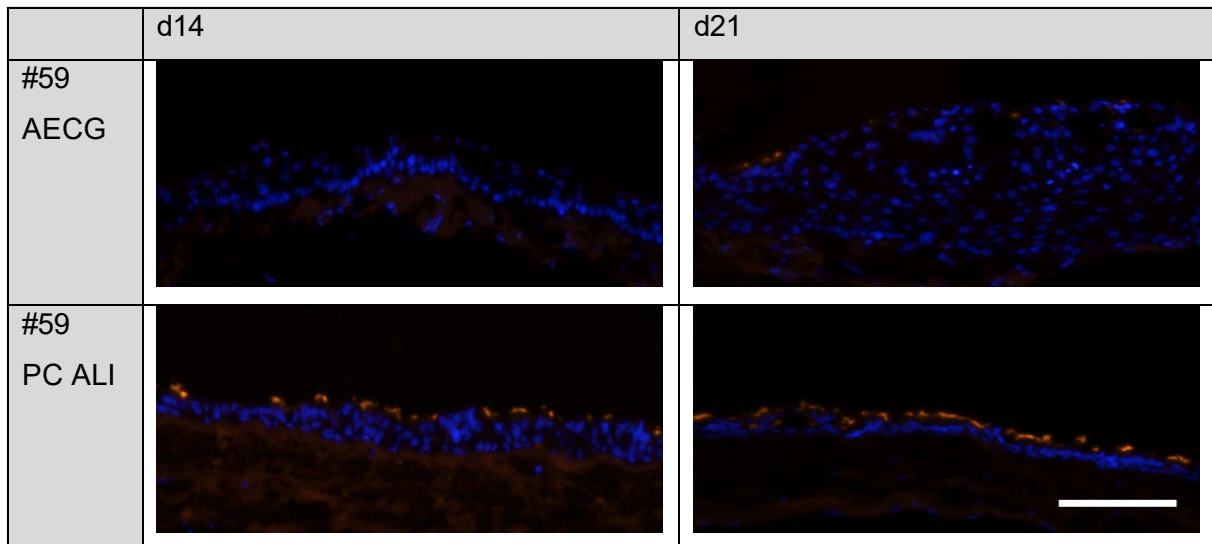
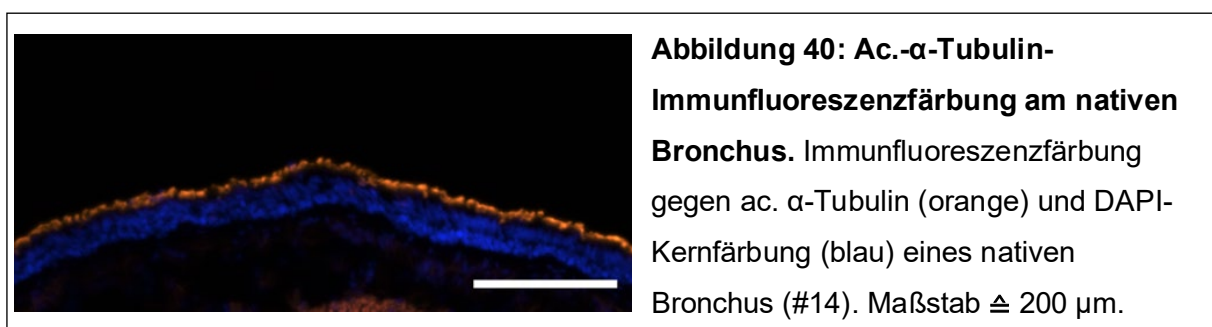


Abbildung 39: Ac.- α -Tubulin-Immunfluoreszenzfärbung in 3D-Kultur.

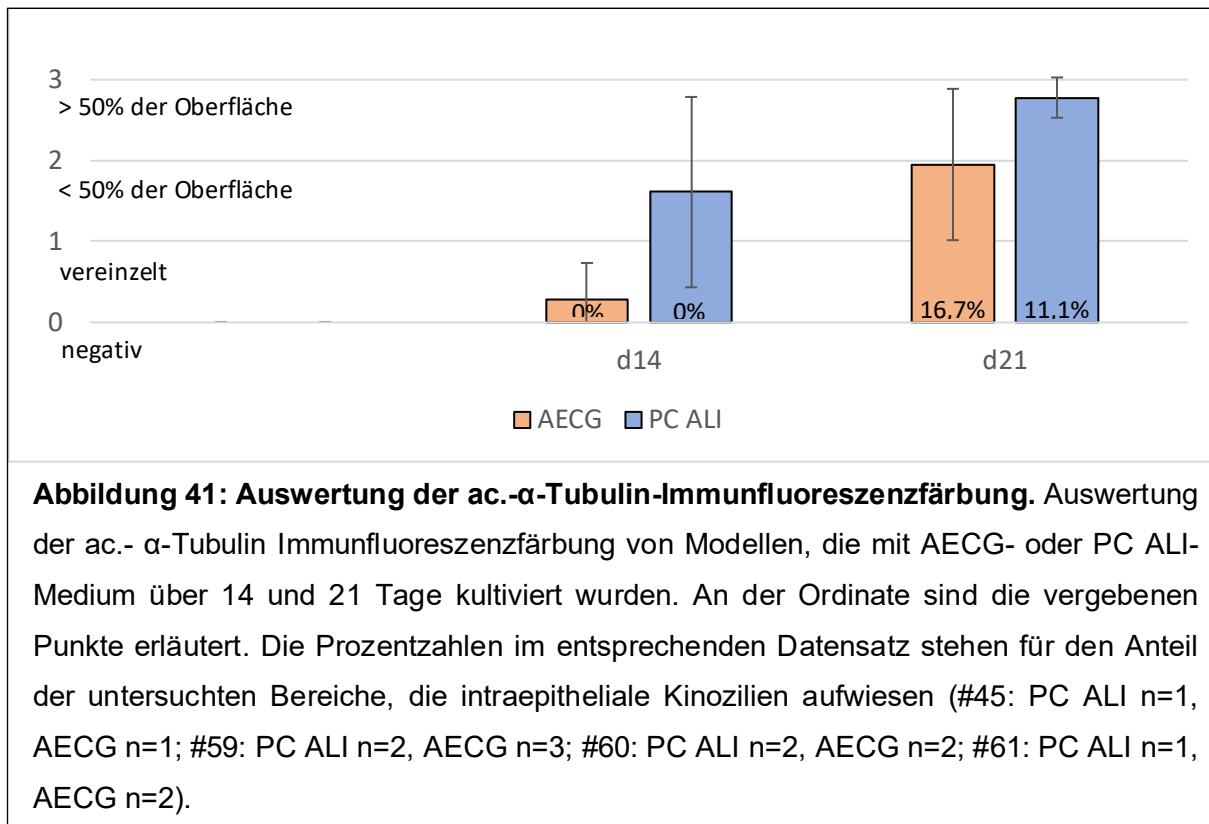
Immunfluoreszenzfärbungen von 3D-Atemwegsmodellen gegen ac. α -Tubulin (orange) mit DAPI-Kernfärbung (blau), beispielhaft am Probanden 59. Die Modelle wurden für 14 oder 21 Tage mit AECG- oder PC ALI-Medium kultiviert (#45: PC ALI n=1, AECG n=2; #59: PC ALI n=2, AECG n=3; #60 PC ALI n=2, AECG n=2; #61: PC ALI n=1, AECG n=2). Maßstab $\pm 200 \mu\text{m}$.

Die Immunfluoreszenzfärbung gegen ac. α -Tubulin im nativen Bronchus zeigte einen nahezu durchgehenden apikalen Ziliensaum (Abbildung 40).



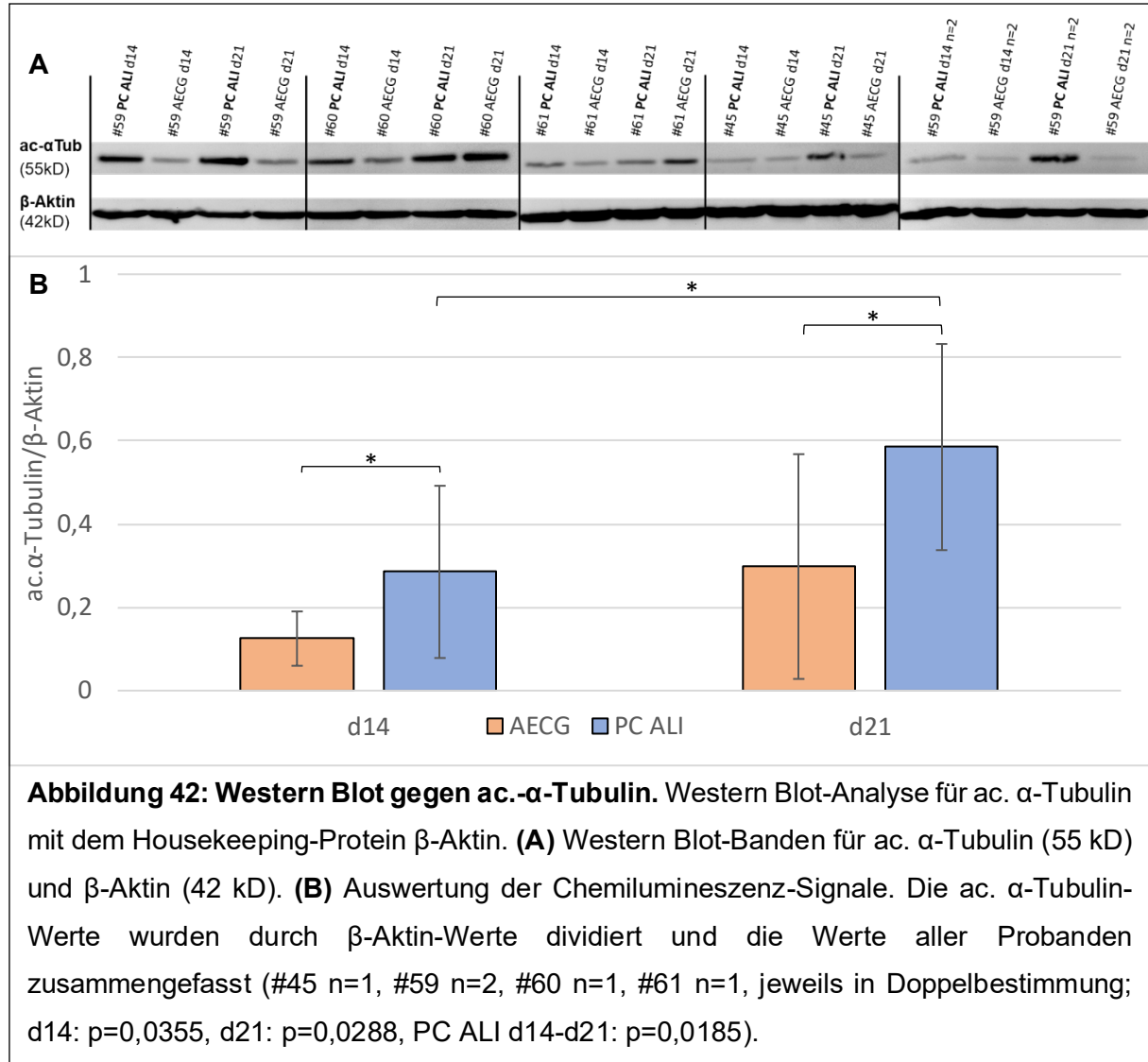
Auch hier wurden die Modelle anhand eines Punktesystems bewertet (Abbildung 41). Null Punkte entsprach keinerlei Expression, ein Punkt entsprach einer vereinzelter Zilienentwicklung, zwei Punkte entsprachen einem Ziliensaum, der unter 50 % der Oberfläche

einnahm und drei Punkte entsprachen einem Ziliensaum, der über 50 % der Oberfläche einnahm.



Bei beiden Medienansätzen konnte im Verlauf ein Anstieg von ac. α-Tubulin detektiert werden. Die mit AECG-Medium kultivierten Modelle erreichten nach 14 Tagen durchschnittlich 0,3 Punkte (+/- 0,5). Es hatten sich also keine Zilien entwickelt. Nach 21 Tagen erreichten die Modelle 2,0 Punkte mit einer großen Standardabweichung von +/- 0,9. Es entwickelte sich also ein Ziliensaum, der unter 50 % der Oberfläche ausmachte, aber mit großer Variation zwischen den Modellen. Nach 14 Tagen gab es keine Entwicklung von intraepithelialen Kinozilien. Nach 21 Tagen konnte ein Anteil von 16,7 % von allen untersuchten Bereichen festgestellt werden. Kultivierung mit PC ALI-Medium führte nach 14 Tagen durchschnittlich zu einer Punktzahl von 1,6 (+/- 1,2). Dies entsprach mit großer Variation der Entwicklung eines Ziliensaums, der unter 50 % der Oberfläche ausmachte. Nach 21 Tagen wurden im Mittel 2,8 Punkte erreicht (+/- 0,2). Es wurde also ein Ziliensaum gebildet, der über 50 % der Oberfläche ausmachte. Durch die Kultivierung mit PC ALI-Medium kam es nach 14 Tagen zu keiner Entwicklung intraepithelialer Kinozilien, nach 21 Tagen wurden in 11,1 % der untersuchten Bereiche solche festgestellt.

Um diese Ergebnisse genauer semiquantitativ zu validieren, wurde die Menge an ac. α -Tubulin in den 3D-Atemwegsmodellen mittels *Western Blot* bestimmt (Abbildung 42). Als *Housekeeping*-Protein wurde β -Aktin verwendet, womit die Tubulin-Werte normiert wurden.



Ein Versuch bestehend aus zwei mit AECG bzw. PC ALI-Medium kultivierten Modellen für 14 und 21 Tage wurde zweimal in unabhängigen technischen Wiederholungen durchgeführt. Alle Versuche wiesen eine gleichmäßige β -Aktin-Bande auf. Darüber sind die Banden für ac. α -Tubulin dargestellt.

Bei Proband 59 konnte man im Verlauf bei beiden Mediumansätzen eine stärkere Bildung von ac.- α -Tubulin erkennen (Abbildung 42A). An beiden Zeitpunkten bildete das mit PC ALI-Medium kultivierte Modell aber deutlich mehr Zilien aus. Bei Proband 60 konnte man nach 14 Tagen eine stärkere Zilienentwicklung mit der Kultivierung mit PC ALI-Medium ausmachen. Bei beiden Kultivierungsansätzen wurden im Verlauf nach 21 Tagen mehr Zilien gebildet. Hier

bildete das mit AECG-Medium kultivierte Modell mehr ac.- α -Tubulin. Die 3D-Modelle des Probanden 61 zeigten ein ähnliches Muster wie Proband 60, aber mit geringerer Signalstärke. Bei Proband 45 zeigte sich durch die Kultivierung mit PC ALI-Medium nach 14 Tagen eine leicht höhere und nach 21 Tagen eine deutlich stärkere Bildung von ac.- α -Tubulin. Das mit AECG-Medium kultivierte Modell zeigte nur einen sehr geringen Anstieg nach 21 Tagen. Der zweite Versuch mit Proband 59 zeigte an beiden Zeitpunkten mehr ac.- α -Tubulin mit PC ALI-Medium als mit AECG-Medium. Im Verlauf stieg die Bildung von ac.- α -Tubulin deutlich an. Kultivierung mit AECG-Medium führte an beiden Zeitpunkten zu einer ähnlich schwachen ac.- α -Tubulin-Bildung. Es ließ sich zusammenfassend bei 8 von 10 Modellen eine höhere ac.- α -Tubulin-Bildung mit PC ALI-Medium feststellen.

Anschließend wurden die Chemilumineszenz-Signale ausgewertet und die Werte von ac.- α -Tubulin durch die Werte von β -Aktin dividiert und so normiert (Abbildung 42B). Beide Medienansätze führten im Verlauf zu einer ansteigenden Bildung von ac.- α -Tubulin. Sowohl nach 14, als auch nach 21 Tagen zeigten die Modelle, die mit PC ALI-Medium kultiviert wurden, signifikant mehr Kinozilien (d14: $p=0,0355$ und d21: $p=0,0288$). Die mit PC ALI-Medium kultivierten Modelle zeigten an beiden Zeitpunkten eine ungefähr doppelt so hohe ac.- α -Tubulin-Expression. Der Anstieg der mit AECG-Medium kultivierten Modelle von Tag 14 auf Tag 21 war nicht signifikant. Dagegen kam es bei den mit PC ALI-Medium kultivierten Modellen im Verlauf zu einem signifikanten Anstieg der ac.- α -Tubulin-Bildung ($p=0,0185$).

Neben der quantitativen Untersuchung der Zilienentwicklung wurden Messungen der Zilienschlagfrequenz mittels eines Mikroskops mit Hochgeschwindigkeitskamera durchgeführt. Dazu wurden pro Modell fünf Videos an zufällig ausgewählten Stellen aufgenommen. Zu jedem Video wurde zur Übersicht eine frequenzabhängige Farbkodierung durchgeführt. Je vier Messareale wurden festgelegt und die Zilienschlagfrequenz bestimmt. Die Messung fand nach 21 Tagen Kultivierung mit AECG- oder PC ALI-Medium statt. In Abbildung 43 sind beispielhaft an zwei Modellen des Probanden 60 die entsprechenden frequenzabhängigen Farbkodierungen und darunter die festgelegten Messareale dargestellt.

Die Bereiche der aktiv schlagenden Kinozilien sind blau gefärbt, was einer Frequenz zwischen ungefähr 5 und 15 Hz entspricht. Bereiche ohne Zilienaktivität sind durch Hintergrundrauschen mit gelb-rötlich gefärbten höheren Frequenzen gekennzeichnet (siehe obere Abbildungen). Passend zu dieser Frequenzübersicht wurden vier *Regions of Interest* (ROI's), also Messareale, festgelegt, in denen die Bestimmung der Zilienschlagfrequenz vorgenommen wurde (siehe untere Abbildungen).

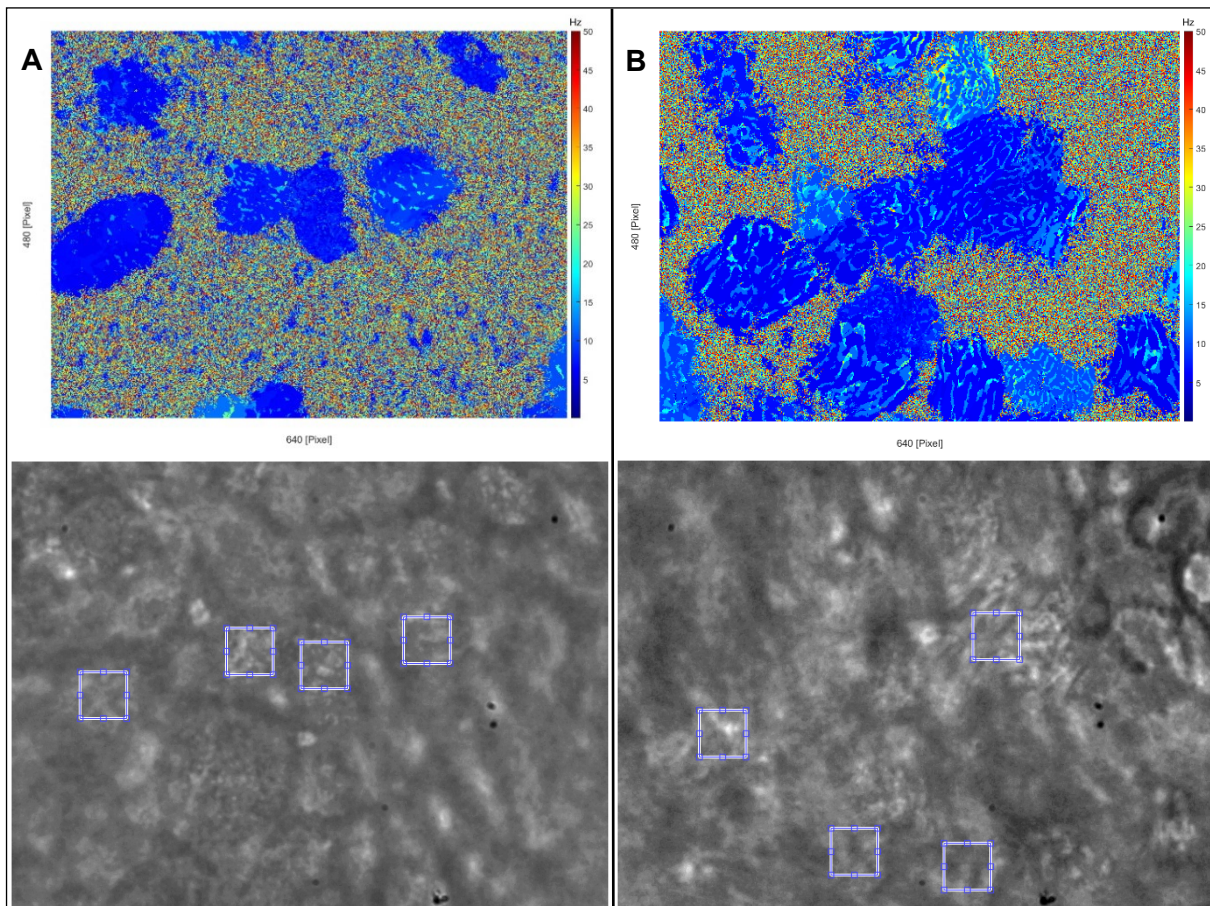
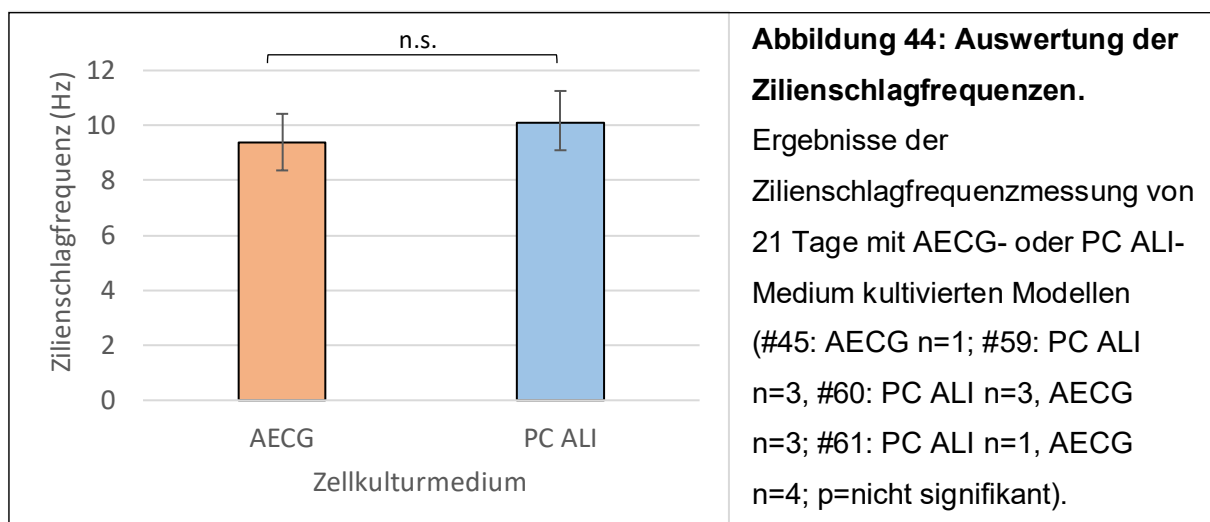


Abbildung 43: Prinzip der Zilienschlagfrequenzmessung. Frequenzabhängige Farbkodierung (oben) und festgelegte Messareale für die Zilienschlagmessung (unten), beispielhaft an zwei Modellen des Probanden 60. Die Modelle wurden für 21 Tage mit **(A)** AECG- oder **(B)** PC ALI-Medium kultiviert.

Die mit AECG-Medium kultivierten Modelle erreichten nach 21 Tagen Kultivierungszeit eine durchschnittliche Zilienschlagfrequenz von 9,36 Hz (+/- 1,06 Hz; Abbildung 44).



Im Vergleich dazu schlugen die Kinozilien der Modelle, die mit PC ALI-Medium kultiviert wurden, mit 10,10 Hz (\pm 1,16 Hz). Der Unterschied zwischen den Medienansätzen war nicht signifikant.

4.4.3 Barriereigenschaften

Das Bronchialepithel ist eine Schnittstelle zwischen Außenwelt und Körper und baut in dieser Funktion eine Barriere auf. Diese Barriere wird hauptsächlich durch Zell-Zell-Kontakte, im Genaueren durch apikale *Tight Junctions* aufgebaut. 3D-Atemwegsmodelle wurden mittels Immunfluoreszenzfärbungen gegen ZO-1 und mittels TEER-Messung auf eine physiologische Barriere untersucht. Zur Etablierung dieser Methode wurden verschiedene Inserts und Zellkronen verglichen. Da die standardmäßig genutzten Zellkronen mit dem Messgerät nicht kompatibel waren und die SIS-Matrix mit käuflich erwerbbaaren Inserts überdurchschnittlich oft gerissen war, wurden im FabLab der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg passende Zellkronen mit dem 3D-Drucker hergestellt. Zusätzlich wurde an zwölf unbesiedelten Kronen eine Leerwert-Messung durchgeführt, um den Endzeitpunkt zu bestimmen, an dem sich das Medium erwärmt hat und somit stabile Messwerte resultierten. So wurde die TEER-Messdauer auf drei Stunden festgelegt.

Es wurden an vier verschiedenen Probanden und an Kontroll-NHBEs TEER-Messungen durchgeführt (Tabelle 13).

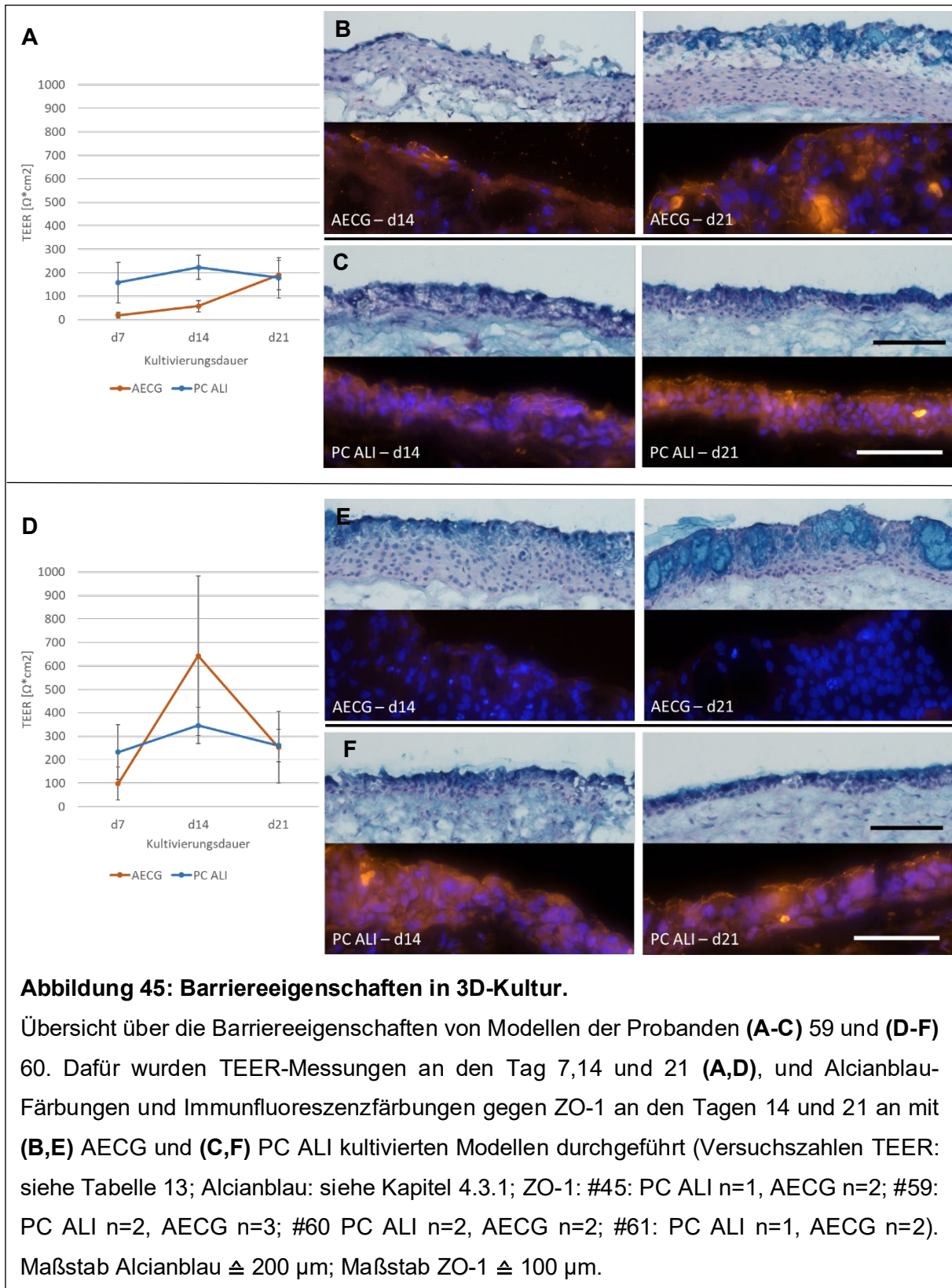
Tabelle 13: Übersicht über erzielte Versuchszahlen der TEER-Messung

| Tag/Proband | d7 | d14 | d21 |
|---------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| #45 | 5x PC ALI 6x AECG | 3x PC ALI 6x AECG | 2x PC ALI 4x AECG |
| #59 | 5x PC ALI 12x AECG | 5x PC ALI 12x AECG | 3x PC ALI 8x AECG |
| #60 | 8x PC ALI 9x AECG | 8x PC ALI 9x AECG | 3x PC ALI 4x AECG |
| #61 | 5x PC ALI 6x AECG | 1x PC ALI 6x AECG | 1x PC ALI 4x AECG |
| Gesamt | 23x PC ALI 33x AECG | 17x PC ALI 33x AECG | 9x PC ALI 20x AECG |
| Kontroll-NHBE | 6x PC ALI | 6x PC ALI | 4x PC ALI |

Da die Barrierefunktion und damit die TEER-Messung vor allem von der Ausbildung von *Tight Junctions* abhängig ist (Srinivasan et al. 2015), wurden beide Parameter zusammen betrachtet und zusätzlich mit der histologischen Morphologie abgeglichen. In Abbildung 45 sind die TEER-Messungen und ausgewählte Modelle des Probanden 59 und 60 dargestellt, die mittels Alcianblau-Färbung und Immunfluoreszenz gegen ZO-1 gefärbt wurden.

Die TEER-Messungen zeigten für Proband 59 mit AECG-Medium nach 7 Tagen Werte von $19,24 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($\pm 12,51 \Omega \cdot \text{cm}^2$), die nach 21 Tagen bis auf $190,16 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($\pm 61,62 \Omega \cdot \text{cm}^2$) anstiegen (Abbildung 45A). Die mit AECG-Medium kultivierten Modelle des Probanden 60 wiederum erreichten nach 7 Tagen Werte um $97,92 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($\pm 70,40 \Omega \cdot \text{cm}^2$), welche nach 14 Tagen stark auf $643,19 \Omega \cdot \text{cm}^2$ anstiegen und nach 21 Tagen wieder auf $252,36 \Omega \cdot \text{cm}^2$ abfielen (Abbildung 45D). Die Alcianblau-Färbung zeigte für Proband 59 nach 14 Tagen ein breites mehrschichtiges Epithel, welches nach 21 Tagen mit lockeren Zellschichten weiter aufbaute (Abbildung 45B oben). Das Epithel des Probanden 60 wurde im Verlauf etwas kompakter, war aber durch starke intraepitheliale Mukusblasen gekennzeichnet (Abbildung 45E oben). Die Immunfluoreszenzfärbungen zeigten für Proband 59 nur vereinzelt positive Signale nach 14 Tagen. Nach 21 Tagen konnte man ein vor allem diffuses ZO-1-Signal erkennen (Abbildung 45B unten). Die mit AECG-Medium kultivierten Modelle des Probanden 60 waren ZO-1-negativ (Abbildung 45E unten).

Die mit PC ALI-Medium kultivierten Modelle des Probanden 59 erreichten relativ konstante TEER-Werte bis maximal $222,50 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($\pm 51,09 \Omega \cdot \text{cm}^2$) an Tag 14 (Abbildung 45A). Die TEER-Werte der mit PC ALI-Medium kultivierten Modelle des Probanden 60 stiegen von Tag 7 mit $232,59 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($\pm 116,96 \Omega \cdot \text{cm}^2$) auf $346,05 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($\pm 77,66 \Omega \cdot \text{cm}^2$) nach 14 Tagen an, und fielen nach 21 Tagen wieder leicht auf $259,99 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($\pm 68,62 \Omega \cdot \text{cm}^2$) ab (Abbildung 45D). Histologisch zeigten die Modelle beider Probanden an beiden Zeitpunkten ein hochprismatisches Epithel (Abbildung 46C und F oben). Die Modelle bildeten nach 14 Tagen leichte apikale Tight Junctions aus, die nach 21 Tagen deutlich interzellulär und apikal lokalisiert waren (Abbildung 45C und F unten).



Die Immunfluoreszenzfärbung gegen ZO-1 im nativen Bronchus zeigte interzelluläre apikale Signale (Abbildung 46), ähnlich zu den mit PC ALI-Medium kultivierten Modellen.

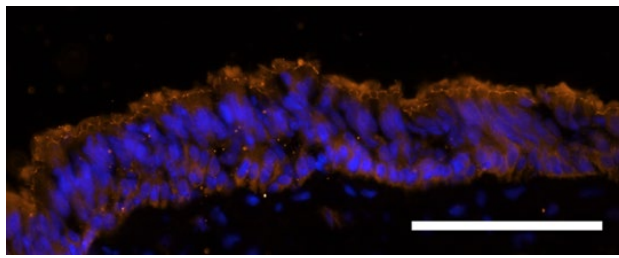


Abbildung 46: ZO-1-Immunfluoreszenzfärbung am nativen Bronchus. Immunfluoreszenzfärbung gegen ZO-1 (orange) und DAPI-Kernfärbung (blau) eines nativen Bronchus (#14). Maßstab $\pm 100 \mu\text{m}$.

Es wurden zusätzlich Modelle mit käuflich erworbenen NHBE-Zellen aufgebaut, die als Kontrollmodelle dienten und ausschließlich mit PC ALI-Medium kultiviert wurden (Abbildung 47). Die TEER-Messungen zeigten nach 7 Tagen Werte von durchschnittlich $383,30 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($\pm 276,44 \Omega \cdot \text{cm}^2$), die nach 14 Tagen auf $518,67 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($\pm 205,16 \Omega \cdot \text{cm}^2$) anstiegen und nach 21 Tagen Kultivierung bei $513,94 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($\pm 186,87 \Omega \cdot \text{cm}^2$) stabil blieben. Die Alcianblau-Färbungen zeigten ein sehr flaches Epithel, welches meist nicht über eine Zellschicht hinausging oder es konnten keine Epithelzellen ausgemacht werden. Man konnte lediglich eine leichte Mukussekretion erkennen. Aufgrund des fehlenden Epithelaufbaus wurden keine Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt.

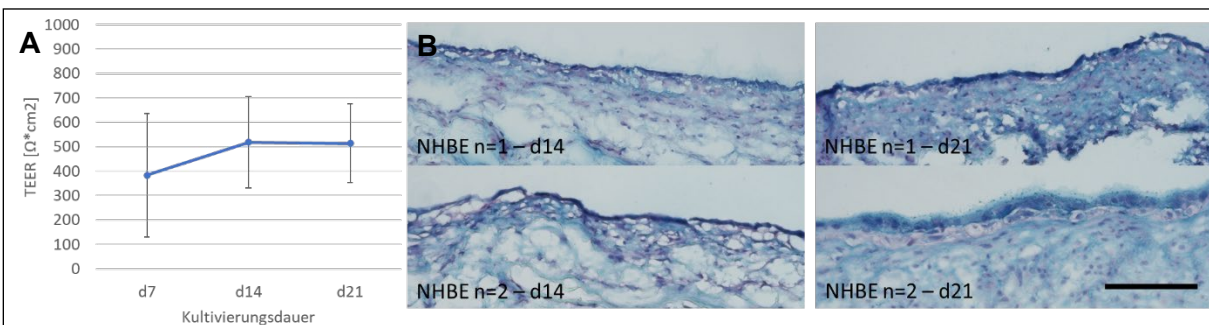
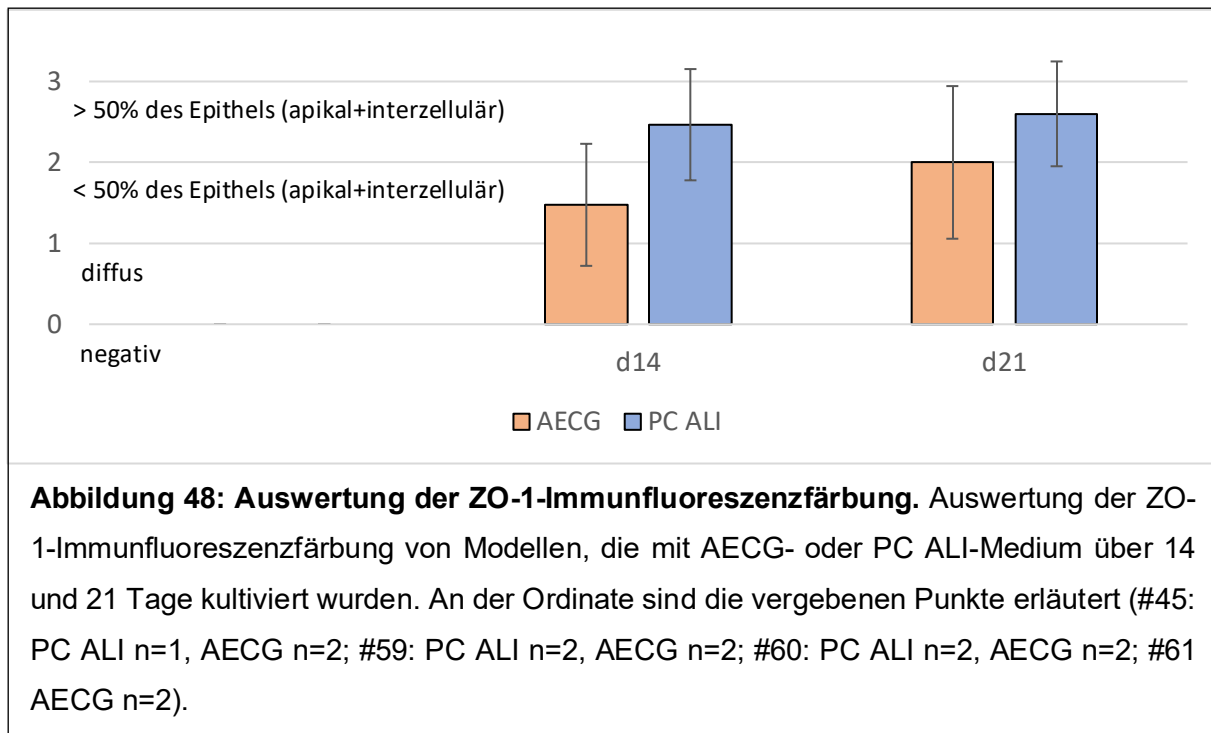


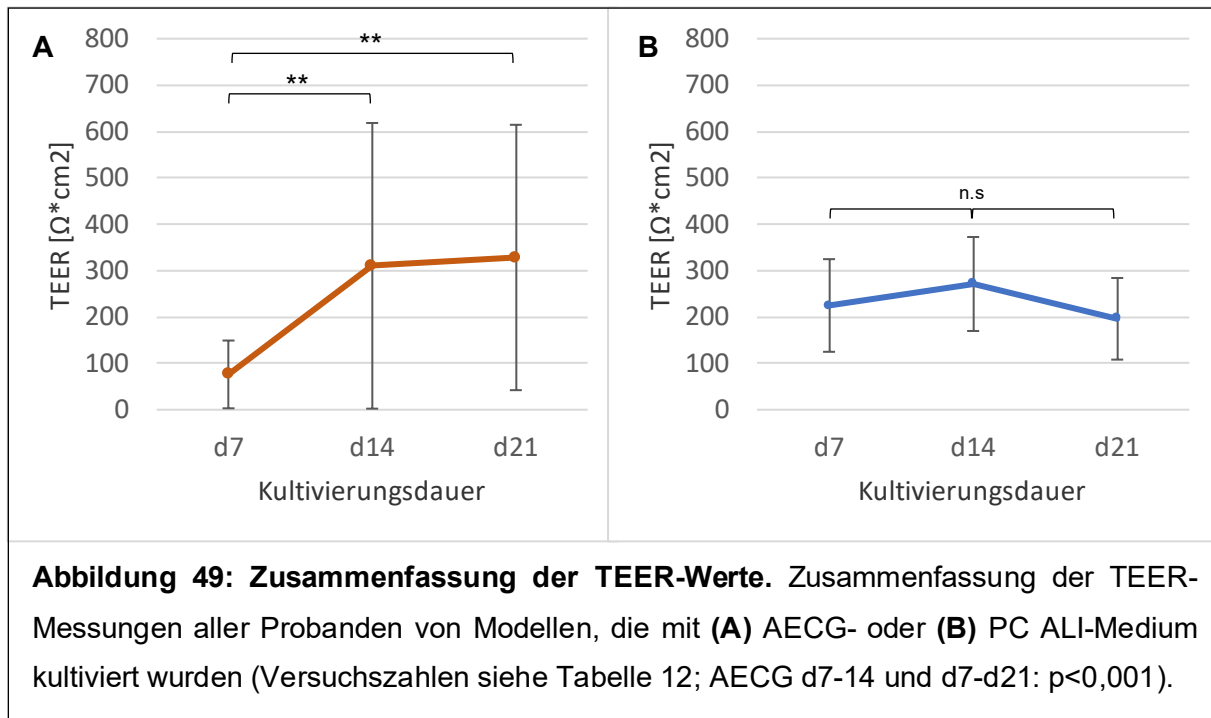
Abbildung 47: Barriereigenschaften der Kontrollmodelle. Übersicht über die Barriereigenschaften von Kontroll-Modellen mit NHBEs. Dafür wurden **(A)** TEER-Messungen an den Tagen 7, 14 und 21 und **(B)** Alcianblau-Färbungen an den Tagen 14 und 21 durchgeführt (Versuchszahlen TEER: siehe Tabelle 13; Alcianblau: n=2). Maßstab Alcianblau $\pm 200 \mu\text{m}$.

Die ZO-1 -Verteilung wurde mithilfe eines Punktesystems bewertet (Abbildung 48). Null Punkte entsprachen einem negativen Signal, ein Punkt entsprach einer rein diffusen Verteilung, zwei Punkte entsprachen einem interzellulären und apikalen Signal, welches unter 50 % des Epithels ausmachte, drei Punkte entsprachen einem interzellulären Signal, welches über 50 % des Epithels ausmachte.



Die mit AECG-Medium kultivierten Modelle erreichten nach 14 Tagen durchschnittlich 1,4 Punkte (+/- 0,8 Punkte) und nach 21 Tagen 2,0 Punkte (+/- 0,9). Nach 14 Tagen war ZO-1 also eher diffus vorhanden, während nach 21 Tagen unter 50 % des Epithels ein apikales und interzelluläres ZO-Signal aufwies. Durch Kultivierung mit PC ALI-Medium erreichten die Modelle nach 14 Tagen eine durchschnittliche Punktzahl von 2,5 Punkten (+/- 0,7 Punkte) und nach 21 Tagen von 2,6 Punkten (+/- 0,6). An beiden Zeitpunkten waren über 50 % des Epithels apikal und interzellulär ZO-1-positiv.

Um eine Gesamtaussage über die TEER-Messung zu treffen, wurden alle Werte der mit AECG-Medium und PC ALI-Medium kultivierten Modelle zusammengefasst (Abbildung 49). Die mit AECG-Medium kultivierten Modelle starteten nach 7 Tagen mit $76,12 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (+/- $73,08 \Omega \cdot \text{cm}^2$), stiegen nach 14 Tagen signifikant auf $310,28 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (+/- $307,97 \Omega \cdot \text{cm}^2$) an und blieben im Mittel nach 21 Tagen bei $328,25 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (+/- $286,09 \Omega \cdot \text{cm}^2$). Im Vergleich dazu erreichten die Modelle, die mit PC ALI-Medium kultiviert wurden, im Verlauf relativ konstante Werte, die nach 14 Tagen auf $271,09 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (+/- $101,31 \Omega \cdot \text{cm}^2$) anstiegen und nach 21 Tagen leicht auf $196,03 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (+/- $88,00 \Omega \cdot \text{cm}^2$) abfielen. Diese Werte zeigten keine signifikanten Unterschiede im Verlauf, blieben also über 21 Tage relativ konstant. Im Vergleich der TEER-Werte zwischen AECG- und PC ALI-Medium unterschieden sich lediglich die Messungen an Tag 7 signifikant ($p < 0,0001$).



Zusammenfassend führte die Kultivierung mit AECG-Medium zu einer weniger starken bzw. diffuseren ZO-1-Verteilung. Die mit PC ALI-Medium kultivierten Modelle zeigten interzelluläre und apikale ZO-1-Signale. Die TEER-Werte zeigten bei Kultivierung mit AECG-Medium niedrige Werte nach 7 Tagen, die im Verlauf mit großer Variabilität anstiegen, während die mit PC ALI-Medium kultivierten Modelle im Verlauf relativ konstant blieben.

5 Diskussion

5.1 2D-Kultivierung

Es wurden primäre Bronchialepithelzellen aus Bronchusgewebe in zwei verschiedenen Medienansätzen isoliert und expandiert. Mit AECG-Medium wuchsen im Vergleich zum PC Ex+-Medium größere Zellen in einem lockeren Zellverband. Die Unterschiede in der Zellmorphologie deckten sich mit den Veröffentlichungen der Medienhersteller (PromoCell 2021a, Stemcell Technologies 2022). Das AECG-Medium wurde häufig als Expansionsmedium in der 2D-Kultur von humanen oder auch anderen tierischen Bronchialepithelzellen genutzt (Ishikawa et al. 2017, Scheffler et al. 2015).

Sowohl die Zellausbeute nach Isolierung, als auch die Ki-67-Charakterisierung und der WST-1-Assay spiegelten eine höhere Proliferation der primären Zellen bei Kultivierung mit PC Ex+-Medium wieder. In der Ki-67-Immunfluoreszenzfärbung gab es vermehrt Zellen, die kleinere Ki-67-Granula aufwiesen, welches auf ein direktes Verlassen der Mitose hindeutet. Ki-67-Signale dagegen, die die Nucleoli überdecken, sprechen dafür, dass die Zelle sich in der späten G1-Phase bzw. Interphase des Zellzyklus befindet (Sun and Kaufman 2018, Matheson and Kaufman 2017). Es waren somit nicht nur mehr Zellen Ki-67-positiv, die höhere Proliferation spiegelte sich auch an der Zellzyklusphase der Zellen wieder.

Der enger wachsende Zellrasen durch die Kultivierung mit PC Ex+-Medium könnte einen Proliferationsvorteil ausmachen, verglichen zu den wenigen Zell-Zell-Kontakten mit AECG-Medium. Zell-Zell-Kontakt kann durch die physikalische Verbindung durch *Gap Junctions*, Cadherine und weitere Zelladhäsionsmoleküle (CAMs) die Proliferation steigern. Hier spielen unter anderem Phosphoinositid-3-Kinasen eine Rolle, die durch weitere Signalkaskaden über Proteinkinase C und MAP-Kinase die Proliferation steigern. Erst in konfluentem Zustand führt die verminderte Zellausbreitung durch Zusammendrängen der Zellen zu einer Inhibition der proliferationsfördernden Signale durch Zell-Zell-Kontakte (Nelson and Chen 2002).

Die höhere Proliferation resultierte in einer signifikant höheren Zellausbeute nach Kultivierung mit PC Ex+-Medium. Die höhere Zellteilungsrate führte aufgrund der individuellen Unterschiede der Probanden zu einer sehr großen Standardabweichung. Ein ähnliches Ergebnis zeigte auch der WST-1-Assay, bei dem die mit PC Ex+-Medium kultivierten Zellen tendenziell ein sehr variables Zellwachstum über die Passage aufwiesen. Für genauere Aussagen müssten diese Versuche noch durch höhere Versuchszahlen validiert werden. Die Spendervariabilität ist eine der Limitationen von primären Bronchialepithelzellen. Exogene spenderabhängige Einflüsse wie Rauchen oder Medikamenteneinnahme sind schwer zu überschauen und bilden so einige unbekannte Variablen (Bukowy-Bieryłło 2021). Es wurde beobachtet, dass beispielsweise eine regelmäßige Entzündung und Rauchen zu einer verminderten Proliferationsfähigkeit von Basalzellen der Atemwege führt (Staudt et al. 2014). Die höhere Proliferation mit PC Ex+-

Medium ist möglicherweise auf die unterschiedliche Medienzusammensetzung zurückzuführen. Die genauen Inhaltsstoffe sind aber nicht veröffentlicht.

Weiterführend haben primäre Zellen – besonders primäre Bronchialepithelzellen – Limitationen in der Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit über mehrere Passagen hinweg (Bukowy-Bieryłło 2021). Im Rahmen dieser Arbeit wurden primäre Bronchialepithelzellen in Passage 0 direkt nach Isolierung oder Passage 1 verwendet, was die Anzahl der Versuche sehr von der Zellausbeute nach Isolierung abhängig machte. Langfristiges Ziel ist der Erhalt der Proliferation der Bronchialepithelzellen über mehrere Passagen hinweg, sowie der Differenzierungsfähigkeit in den höheren Passagen. Dazu gibt es bereits einige Studien, die zeigen konnten, dass beispielsweise mit Hilfe von Fütterzellen wie embryonalen Mausfibroblasten oder mit Mediumzusätzen wie dem ROCK-Inhibitor Y-27632 eine stabilere Kultur über mehrere Passagen erreicht werden kann (Horani et al. 2013, Liu et al. 2012). Eine Studie in unserer Arbeitsgruppe verglich diese zwei Kultivierungsansätze mit weiteren Medienzusätzen wie dem TGF β -Inhibitor A 83-01 und BMP-Inhibitor DMH-1. Hier führte die Kultivierung mit embryonalen Mausfibroblasten-konditioniertem Medium in Kombination mit dem ROCK-Inhibitor zu einer stabileren primären Epithelzellkultur über mehrere Passagen hinweg (Heyer 2021).

Die Charakterisierung der Basalzellen mittels Immunfluoreszenzfärbungen gegen p63 und KRT-14 zeigte unterschiedliche Basalzellpopulationen abhängig vom verwendeten Expansionsmedium. In beiden Medienansätzen wurde in nahezu allen Zellen ein positives p63-Signal beobachtet. Jedoch zeigten nur ca. 32 % der mit PC Ex+-Medium kultivierten Zellen ein positives KRT-14-Signal. Im Vergleich dazu waren ca. 95 % der mit AECG-Medium kultivierten Zellen positiv für KRT-14. So ähnelte die KRT-14-Verteilung der mit PC Ex+-Medium kultivierten Zellen der Verteilung *in vivo* mit ungefähr 40 % (Smirnova et al. 2016). Dieselben Autoren zeigten, dass KRT-14-positive Zellen auch in metaplastischen Arealen distaler Bronchialabschnitte vorkommen, welche durch eine höhere Proliferation und Mehrschichtigkeit gekennzeichnet sind. Diese Beobachtung ließ sich ebenso auf die mit AECG-Medium kultivierten Atemwegsmodelle übertragen.

5.2 Charakterisierung zum Ausschluss tumoröser Merkmale

Es wurden CAF-Marker mittels Immunfluoreszenzfärbung und die 5-ALA-Messung genutzt, um tumoröse Merkmale der genutzten Bronchialepithelzellen auszuschließen. Ein Nachteil des Nachweises der CAF-Marker ist der nur indirekte Tumornachweis, während bei der 5-ALA-Messung die Bronchialepithelzellen direkt untersucht werden. Der immunhistochemische Nachweis von CAF-Markern wie α -SMA und MCT-4 ist für die Diagnose von Tumorzellen schwierig umzusetzen, da es keine quantitative Methode und die Grenze zwischen gesunden

Fibroblasten und CAFs nicht eindeutig ist. Ein Abgleich der Untersuchung der CAFs mit der 5-ALA-Messung oder anderen Methoden ist unerlässlich.

Von fünf in der 2D-Kultur untersuchten Probanden war ein Proband in beiden CAF-Markern deutlich positiv, was auf eine bereits *in-vivo* erfolgte Aktivierung von Fibroblasten hinweist. Bei einem Probanden waren lediglich MCT-4-Signale zu sehen. Da MCT-4 nicht nur zwingend in CAFs exprimiert wird, sondern auch als Folge von oxidativem Stress oder einem zu niedrigem Medium-pH-Wert hochreguliert wird, ist eine CAF-Aktivierung ohne Expression weiterer CAF-Marker unwahrscheinlich (Whitaker-Menezes et al. 2011). Bei allen weiteren Probanden konnte eine Aktivierung aufgrund vollständig negativer CAF-Marker ausgeschlossen werden. Im 3D-Modell zeigte sich ein Proband in beiden CAF-Markern positiv. Ein weiterer zeigte nur bei MCT-4 vereinzelt schwache Signale, bei zwei weiteren Probanden konnten keine CAF-Signale beobachtet werden. Analog zur 2D-Kultivierung weisen beide positiven Signale auf eine Aktivierung hin. Diese kann bereits *in vivo* oder erst *in vitro* im 3D-Modell erfolgt sein. Aufgrund der Inkonsistenz der CAF-Marker und der verschiedenen CAF-Subtypen, gekoppelt mit der hier rein qualitativen Analyse lassen sich nur schwer Aussagen treffen. Um CAFs besser zu identifizieren, sind semiquantitative Analysen wie *Western Blot* mit Positiv- und Negativkontrollen besser geeignet. Des Weiteren sollten Bronchialepithelzellen sowohl in 2D, in der 3D-Kultur, als auch mit Hilfe der 5-ALA-Messung untersucht werden, um aus ergänzenden Informationen aller Methoden Schlüsse zu ziehen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden aus Ressourcengründen für die 2D- und 3D-Untersuchung von CAFs unterschiedliche Probanden untersucht.

Die 5-ALA-Messung hat den Vorteil, dass es eine semiquantitative Methode ist, mit der ein direkter Tumornachweis möglich ist. Zur *in vitro*-Diagnostik von Lungentumorzellen mittels 5-ALA-Messung wurde nur wenig publiziert. Untersuchungen in beispielsweise Haut- oder Nierentumoren zeigten einen nahezu linearen Anstieg der Fluoreszenz und damit der Protoporphyrinkonzentration über mehrere Stunden, welche nach fünf bis sechs Stunden wieder abfällt (Curnow et al. 2019, Datta et al. 1998, Tunstall et al. 2002). Des Weiteren gibt es an Bronchusgewebe durchgeführte *in vivo*-Bestimmungen an Klinikprobanden (Hautmann et al. 2007), als auch *in vitro*-Messungen an 3D-Organkulturen (Gamarra et al. 2002).

In den vorgenannten Publikationen hat die Kinetik *in-vivo* und *in-vitro* bei tumorösem Gewebe einen ähnlichen Verlauf mit einem starken Anstieg der Fluoreszenz mit einem Maximum nach ungefähr 150 Minuten und im Verlauf wieder abfallende Werte. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse von Probandenzellen und Kontroll-NHBes zeigten über 210 Minuten durchgehend relativ stabile Werte ohne den tumorspezifischen Anstieg der Fluoreszenzwerte, wie es in den beiden Veröffentlichungen beschrieben ist. Man kann davon ausgehen, dass die gemessenen Probandenzellen aufgrund ihres stabilen Verlaufs und dem mit den Kontroll-NHBes verglichenem niedrigeren oder vergleichbaren Fluoreszenzniveau nicht tumorös sind.

Neben den im Rahmen dieser Arbeit genutzten Methoden, gibt es weitere Möglichkeiten, einen Tumorcharakter auszuschließen. Beispielsweise können histologische oder molekulargenetische Untersuchungen genutzt werden, die aber eine weitere Nutzung des Gewebes im Sinne einer Zellkultur ausschließen. Eine geeignete nicht-invasive Methode ist die Raman-Spektroskopie, die sich die zelltypspezifischen Moleküle von gesunden und tumorösen Zellen zunutze macht, um sie mittels eines zellspezifischen Spektrums zu charakterisieren (Steinke et al. 2014). Diese Methode wurde zum Zeitpunkt der Veröffentlichung noch etabliert und stand deswegen dieser Arbeit noch nicht zur Verfügung.

5.3 3D-Modellmorphologie

Die Alcianblau-Färbungen der 3D-Atemwegsmodelle zeigten deutliche Unterschiede in der Morphologie des Epithels. Die mit AECG-Medium kultivierten Modelle waren durch ein hyperplastisches mehrschichtiges Epithel gekennzeichnet. Da nicht jede Epithelzelle Kontakt zur Basalmembran hatte, kann nicht von einem mehrreihigen Epithel gesprochen werden (Cao et al. 2020). Auffällig war vor allem die gehäuft auftretende ungerichtete Mukussekretion, die in mukushaltigen Zysten resultierte. Ähnliche Zysten beschreibt auch Bovard et al. bei der Langzeitkultivierung von Atemwegsmodellen über fünf bis neun Wochen, lediglich kultiviert mit PC ALI-Medium (Bovard et al. 2020). Die Autoren beobachten eine vor allem probandenabhängige Zystenentwicklung. Zu vermuten ist, dass die Individualität der Probanden und das verwendete Nährmedium gleichermaßen eine Rolle spielen. Der Mechanismus dieser Zystenentwicklung ist bisher nicht bekannt. Es scheint aber vor allem der intra- und extrazelluläre Calcium- und Bikarbonathaushalt in der Exozytose von Muzinen eine Rolle zu spielen. Ein vor allem niedriger Spiegel beider Elektrolyte könnte in einer gestörten Exozytose und ungerichteten Sekretion resultieren (Bou-Hanna et al. 1994, Liu et al. 2015). Aber auch für das AECG-Medium ist die genaue Elektrolyt-Zusammensetzung nicht zugänglich. Die Beschreibung einer ähnlichen hyperplastischen Epithelentwicklung mit AECG-Medium konnte in der Literatur nicht gefunden werden, in einigen Studien konnte mit AECG-Medium jedoch ein differenziertes Atemwegsepithel aufgebaut werden (Schweinlin et al. 2017, Steinke et al. 2014).

Im Vergleich entwickelte sich bei Kultivierung mit PC ALI-Medium ein flacheres und eher mehrreihiges Epithel, bei dem ein Ziliensaum histologisch erkennbar war und die Mukussekretion gerichtet nach apikal erfolgte. Nach 21 Tagen Kultivierungszeit entsprach das Modell histologisch am ehesten einem differenzierten Bronchialepithel. Der Aufbau von bronchialen Atemwegsmodellen mit PC ALI-Medium ist bereits in der Literatur beschrieben (Bovard et al. 2020, Leung et al. 2020, Rayner et al. 2019). Diese Studien verwendeten jedoch synthetische Matrices ohne Co-Kultur, wodurch sich diese Arbeit durch die Ergänzung einer

biologischen Matrix mit Probanden-eigenen eingewanderten Fibroblasten von ebendiesen abhebt.

Des Weiteren wurden die Epitheldicken der 3D-Modelle verglichen. Nach 21 Tagen Kultivierung maßen die mit AECG-Medium kultivierten Modelle durchschnittlich 110,0 μm Dicke (\pm 43,7 μm), die mit PC ALI-Medium kultivierten Modelle 30,9 μm (\pm 4,1 μm). Es wurden in verschiedenen Studien *in vivo*-Messungen von physiologischen Atemwegsepithelien durchgeführt. Die Werte proximaler Bronchien reichen von durchschnittlich 28,0 μm (\pm 9,7 μm) (Cohen et al. 2007) bis zu einer Spanne von ungefähr 22 μm bis 56 μm (Tsartsali et al. 2011). In letzterer der beiden Studien wurde festgestellt, dass die Epitheldicke abnimmt, je älter die Probanden sind. Eine solche Korrelation konnte in den 3D-Modellen der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden. Neben der Abhängigkeit vom Alter der Probanden ist die Epitheldicke auch vom Bronchusabschnitt abhängig, von dem das Gewebe entnommen wurde. Im proximalen Abschnitt wie der Trachea und den Hauptbronchien ist das Epithel hochprismatisch aufgerichtet, während es im Verlauf Richtung *Bronchioli* flacher und kuboidaler wird (Hastedt et al. 2016). Auch die in dieser Arbeit verwendeten Bronchusgewebe stammen von verschiedenen bronchialen Abschnitten. Ein Abgleich der Epitheldicke zwischen *in vitro*-Modell und zugehörigem nativem *in vivo*-Bronchusgewebe war methodisch leider nicht möglich. Es lässt sich aber sagen, dass sich die mit PC ALI-Medium kultivierten Modelle im physiologischen Bereich der Epitheldicke bewegten, während die mit AECG-Medium kultivierten hyperplastischen Modelle deutlich über den physiologischen Werten lagen.

Die Vimentin-Immunfluoreszenzfärbungen zeigten eine erfolgreiche Co-Kultur von Bronchialepithelzellen mit in die Matrix eingewanderten bronchialen, Probanden-eigenen Fibroblasten. Es zeigten sich keine Unterschiede in den beiden Medienansätzen. Auffällig war die unterschiedliche Dicke und Kompaktheit der Matrix in verschiedenen 3D-Modellen. Dies kann zum einen an einer unterschiedlich starken Straffung der Matrix bei der Vorbereitung der Kronen liegen, zum anderen am unterschiedlichen *Remodelling* durch die bronchialen Fibroblasten. Es ist bekannt, dass Fibroblasten in dreidimensionalen Matrices sowohl durch Kontraktion, als auch durch Auflösen und Synthese von Kollagen die Matrix umbauen können. Tatsächlich geht eine starke Straffung der Matrix (=hohe Spannung) mit einer Umorganisation des Zytoskellets einher, was unter anderem dazu führt, dass Fibroblasten Kollagen synthetisieren (Rhee 2009). So führt eine unterschiedlich starke Straffung der Matrix zu einem spannungsabhängigen *Remodelling* der Matrix durch die eingewanderten Fibroblasten. Durch die Verwendung der biologischen Matrix SIS und einer erfolgreichen Co-Kultur von Bronchialepithelzellen mit in die Matrix eingewanderten Fibroblasten wurde eine hohe *in vivo/in vitro*-Korrelation erreicht, die bisher publizierte Modelle um die stromale Umgebung ergänzt.

5.4 3D-Modelldifferenzierung

Weiterführend wurden spezifische Merkmale untersucht, die charakteristisch für ein differenziertes Bronchialepithel sind. In der Ausbildung von E-Cadherin-abhängigen Zell-Zell-Kontakten zeigten sich nach 21 Tagen Kultivierung keine Unterschiede im Vergleich beider Medienansätze. Ebenso kam es zu einer ähnlichen physiologischen Verteilung von p63-positiven Basalzellen.

Unterschiede zugunsten der mit PC ALI-Medium kultivierten Modelle wurden bei den sezernierten Muzinen Muc5B und Muc5AC, der Ausbildung zilientragender Zellen und der Barriereigenschaften des Epithels festgestellt. Die mit PC ALI-Medium kultivierten Modelle sezernierten mehr Muc5B und Muc5AC, während die mit AECG-Medium kultivierten Modelle vor allem durch intraepitheliale Zysten gekennzeichnet waren. Auffällig war, dass bei beiden Medienansätzen mehr Muc5B als Muc5AC sezerniert wurde. Dies spiegelt die *in vivo*-Situation wieder, in der Muc5B in gesunden Atemwegen das vorherrschende Mucin ist, während Muc5AC vor allem bei inflammatorischen Vorgängen hochreguliert wird (Bonser and Erle 2017).

Auch zeigten die mit PC ALI-Medium kultivierten Modelle signifikant mehr ac. α -Tubulin, welches Bestandteil der Zilien ist. Diese Modelle zeigten einen Ziliensaum, der mindestens 50% der epithelialen Oberfläche ausmachte. Dies ähnelt der Zusammensetzung des Atemwegsepithels *in vivo* mit 60-80% Zilienzellen (Feriani et al. 2017). Letztlich zeigte sich in der Zilienschlagfrequenz kein Unterschied im Vergleich beider Medienansätze. Eventuell könnte bei erfolgreicher Ziliendifferenzierung die finale Schlagfrequenz konstant sein. Ähnliche Ergebnisse zeigten auch Leung et al., die Atemwegsmodelle mit PC ALI- und BEDM-Medium aufbauten, welches als Expansionsmedium dem AECG-Medium ähnlich ist. Auch hier zeigten beide Medienansätze eine nahezu identische Zilienschlagfrequenz von ungefähr 10,4 Hz (Leung et al. 2020).

Die TEER-Messung ist eine etablierte Methode zur Charakterisierung der epithelialen Barriere. Hohe TEER-Werte wurden lange mit einer hohen Dichte von *Tight Junctions* und somit mit einer guten Differenzierung des Epithels gleichgesetzt. Die im Rahmen dieser Arbeit mit AECG-Medium aufgebauten Modelle zeigten - auf den ersten Blick paradoxerweise - höhere und variablere TEER-Werte als die mit PC ALI-Medium kultivierten Atemwegsmodelle. Zugleich ging die Kultivierung mit PC ALI-Medium aber mit einer stärkeren Ausbildung von *Tight Junctions* einher, ebenso zeigten die Modelle morphologisch ein differenzierteres Flimmerepithel. Das zeigt, dass die hohen TEER-Werte der mit AECG-Medium kultivierten Modelle nicht aus einer besseren Differenzierung resultieren, sondern eher der Ausbildung eines hyperplastischen Epithels mit einer großen Oberfläche zuzuschreiben sind, welche ebenfalls einen Einfluss auf den TEER-Wert hat. Da der angelegte Strom nicht nur

parazellulär, sondern auch transzellulär fließen kann, könnten die niedrigeren Werte der mit PC ALI-Medium kultivierten Modelle auch durch eine höhere Aktivität von Ionenkanälen zu erklären sein (Leung et al. 2020). Der TEER-Wert allein kann somit ohne zusätzliche Betrachtung der Histologie und *Tight Junction*-spezifischen Proteinen wie ZO-1 kaum interpretiert werden.

Es gibt bereits Studien, die analog hierzu höhere TEER-Werte bei mehrschichtig und eher undifferenzierten Epithelien von primären Bronchialepithelzellen gemessen haben (Leung et al. 2020, Schamberger et al. 2015, Oshima et al. 2011, Yamaya et al. 1992). Generell ist der Vergleich von absoluten TEER-Werten zwischen verschiedenen Studiengruppen jedoch schwierig, da die TEER-Messung von vielerlei Faktoren abhängig ist. So haben die Messtemperatur, die Zellpassage, das Zellkulturmedium, die Kultivierungsdauer, Scherbelastungen durch mechanische Störungen und individuelles Handling Einfluss auf die Messung (Srinivasan et al. 2015).

Die Kultivierung mit PC ALI-Medium führte zu einer besseren Epitheldifferenzierung. Die genaue Zusammensetzung des Mediums ist nicht bekannt, so dass Rückschlüsse auf einzelne Faktoren, die für die bessere Differenzierung verantwortlich waren, schwierig sind. Es ist aber bekannt, dass AECG-Medium mit 0,1 ng/ml und PC ALI-Medium mit unbekannter Konzentration Retinsäure enthalten (PromoCell 2021b, Lee et al. 2020). Retinsäure fördert konzentrationsabhängig durch Bindung an den Retinsäure-Rezeptor α vor allem die muzinäre Differenzierung von Bronchialepithelzellen. Eine niedrige Konzentration geht mit einem mehrschichtigen Epithelaufbau einher, während höhere Konzentrationen eine mehrreihige Differenzierung begünstigen (Nettesheim et al. 2000). Sehr hohe Konzentrationen über 100 nM können aber wiederum mit einer niedrigen Differenzierungskapazität einhergehen (Luengen et al. 2020). Der mehrschichtige Aufbau der mit AECG-Medium kultivierten Modelle könnte also auf eine eher niedrige Retinsäure-Konzentration zurückzuführen sein. Ein weiteres käuflich erhältliches Differenzierungsmedium beinhaltet mit 30 ng/ml die 300-fache Konzentration der Retinsäure im AECG-Medium (Lifeline Cell Technology 2016). Das PC ALI-Medium könnte eventuell ebenso eine höhere Konzentration an Retinsäure aufweisen, oder aber die bessere Differenzierung ist auf andere, unbekannte (Wachstums-)Faktoren zurückzuführen. In der Arbeit von Ng-Blichfeldt et al. führte die Inhibition des Retinsäure-Signalwegs zu einer erhöhten Proliferation von distalen Lungenorganoiden, aber gleichzeitig zu schlechter Differenzierung (Ng-Blichfeldt et al. 2018). Die Verwendung von Retinsäure wäre zusammenfassend bei der Kultivierung von Bronchialepithelzellen in der 2D-Kultur nachteilig, was ungeachtet der hier gezeigten Ergebnisse für die geringere Konzentration im AECG-Medium sprechen würde, und im 3D-Modell differenzierungsfördernd (höhere Konzentration im PC ALI-Medium vorteilhaft).

5.5 Fazit

Die Kultivierung mit PC ALI-Medium führte nicht nur zu einem physiologischerem Atemwegsmodell, sondern zusätzlich zu einer höheren Reproduzierbarkeit. Mit der Integration einer biologischen Matrix SIS und der Co-Kultur mit bronchialen, Probanden-eigenen Fibroblasten konnte das Modell um den stromalen Anteil des Bronchus, der *in vivo* durch die *Lamina propria* gebildet wird, erweitert werden. So bilden diese Modelle die Grundlage für weiterführende Studien, die die Wechselwirkungen zwischen Bronchialepithelzellen und Fibroblasten untersuchen, welche beispielsweise bei COPD (*chronic obstructive pulmonary disease*) eine Rolle spielen. Die Modelle können durch weitere Zelltypen wie Makrophagen oder Endothelzellen ergänzt werden, um die *in vivo* Situation noch besser abzubilden. Außerdem kann durch Infektion mit zum Beispiel Influenza-Viren oder SARS-CoV-2 die Ausbreitung von Erregern in den Atemwegen untersucht werden. Des Weiteren können pharmakologische oder toxikologische Studien durchgeführt werden.

6 Zusammenfassung

Der Aufbau von *in vitro*-Atemwegsmodellen wird für pathomechanistische Analysen von Atemwegserkrankungen immer wichtiger. Bestehende Modelle sind durch ihre unvollständige zelluläre Komplexität begrenzt und bilden meist nur den epithelialen Anteil der Atemwege ab. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein 3D-humanes Atemwegsmodell aus primären Bronchialepithelzellen in Co-Kultur mit Probanden-eigenen bronchialen Fibroblasten auf einer biologischen Matrix aufgebaut.

Primäre, humane Bronchialepithelzellen und Fibroblasten wurden aus Bronchusgewebe isoliert und die Epithelzellen in zwei verschiedenen Medien (AECG oder PC Ex+) kultiviert. In Passage 1 erfolgte eine Charakterisierung mittels Immunfluoreszenz. Zum Aufbau der 3D-Modelle wurden die Epithelzellen auf einer biologischen Kollagenmatrix mit den Fibroblasten unter *Air-Lift*-Bedingungen und in zwei verschiedenen Kulturmedien (AECG oder PC ALI) über 21 Tage kultiviert. Die 3D-Modelle wurden mittels Histologie und Immunfluoreszenzfärbung charakterisiert. Die epithelialen Barriereigenschaften wurden durch Messungen des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER) charakterisiert. Das Vorhandensein und die Funktion von Kinozilien wurden durch *Western Blots* und durch Mikroskopie mit einer Hochgeschwindigkeitskamera bestimmt.

In 2D-Kulturen mit PC ALI-Medium wurde anhand der Anzahl von Ki-67-positiven Epithelzellen eine höhere Proliferationsrate im Vergleich zur Kultur mit AECG-Medium festgestellt. Mit AECG-Medium war andererseits die Anzahl von KRT-14-positiven Epithelzellen mit AECG-Medium erhöht. In 3D-Modellen führte die Kultivierung mit AECG-Medium zu einer starken Zellproliferation, die in einem hypertrophen Epithelgewebe und intraepithelialen Mukusblasen resultierte. Im Gegensatz dazu entwickelten die mit PC ALI-Medium kultivierten Modelle ein differenziertes Bronchialepithel. PC ALI-Medium führte zu einer höheren Muc5B/AC-Sekretion, die gerichtet nach apikal erfolgte. TEER-Messungen bestätigten eine stabile Epithelbarriere, während die Modelle mit AECG-Medium sehr schwankende Werte aufwiesen. *Western Blots* zeigten mehr ac. α -Tubulin (Zilienkomponente) mit PC ALI-Medium. Funktionell gab es keinen Unterschied in der Zilienschlagfrequenz. Beide Medienansätze erreichten physiologische Frequenzen um die 10 Hz.

Die in dieser Arbeit vorgestellten, mit PC ALI-Medium kultivierten 3D-humanen Atemwegsmodelle zeigten eine hohe *in vivo/in vitro*-Korrelation. Diese Modelle schließen eine translationale Lücke zwischen 2D-Kulturen bzw. Modellen mit geringer Komplexität und Tierversuchen. Durch die Erweiterung des Epithels durch eine stromale Komponente bildet das Modell die Grundlage für weiterführende komplexere Studien. Generell kann an diesem Modell pharmakologische, infektiologische und inflammatorische Forschung betrieben werden.

7 Literaturverzeichnis

- Amini M, Hisdal J, Kalvøy H: Applications of Bioimpedance Measurement Techniques in Tissue Engineering. *Journal of electrical bioimpedance*. 9. 142–158 (2018).
- Arason AJ, Jonsdottir HR, Halldorsson S, Benediktsdottir BE, Bergthorsson JT, Ingthorsson S, Baldursson O, Sinha S, Gudjonsson T, Magnusson MK: deltaNp63 has a role in maintaining epithelial integrity in airway epithelium. *PloS one*. 9. e88683 (2014).
- Benson K, Cramer S, Galla H-J: Impedance-based cell monitoring: barrier properties and beyond. *Fluids and barriers of the CNS*. 10. 5 (2013).
- Biffi G, Tuveson DA: Diversity and Biology of Cancer-Associated Fibroblasts. *Physiological reviews*. 101. 147–176 (2021).
- Bonser LR, Erle DJ: Airway Mucus and Asthma: The Role of MUC5AC and MUC5B. *Journal of clinical medicine*. 6 (2017).
- Bou-Hanna C, Berthon B, Combettes L, Claret M, Laboisie CL: Role of calcium in carbachol- and neurotensin-induced mucin exocytosis in a human colonic goblet cell line and cross-talk with the cyclic AMP pathway. *The Biochemical journal*. 299 (Pt 2). 579–585 (1994).
- Bovard D, Giral A, Trivedi K, Neau L, Kanellos P, Iskandar A, Kondylis A, Luettich K, Frentzel S, Hoeng J, Peitsch MC: Comparison of the basic morphology and function of 3D lung epithelial cultures derived from several donors. *Current research in toxicology*. 1. 56–69 (2020).
- Bukowy-Bieryłło Z: Long-term differentiating primary human airway epithelial cell cultures: how far are we? *Cell communication and signaling : CCS*. 19. 63 (2021).
- Cao X, Coyle JP, Xiong R, Wang Y, Heflich RH, Ren B, Gwinn WM, Hayden P, Rojanasakul L: Invited review: human air-liquid-interface organotypic airway tissue models derived from primary tracheobronchial epithelial cells-overview and perspectives. *In vitro cellular & developmental biology. Animal*. 57. 104–132 (2020).
- Chandorkar P, Posch W, Zaderer V, Blatzer M, Steger M, Ammann CG, Binder U, Hermann M, Hörtnagl P, Lass-Flörl C, Wilflingseder D: Fast-track development of an in vitro 3D lung/immune cell model to study *Aspergillus* infections. *Scientific reports*. 7. 11644 (2017).
- Cohen L, E X, Tarsi J, Ramkumar T, Horiuchi TK, Cochran R, DeMartino S, Schechtman KB, Hussain I, Holtzman MJ, Castro M: Epithelial cell proliferation contributes to airway remodeling in severe asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 176. 138–145 (2007).
- Crystal RG: Airway basal cells. The "smoking gun" of chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 190. 1355–1362 (2014).
- Curnow A, Perry A, Wood M: Improving in vitro photodynamic therapy through the development of a novel iron chelating aminolaevulinic acid prodrug. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. 25. 157–165 (2019).
- Datta SN, Loh CS, MacRobert AJ, Whatley SD, Matthews PN: Quantitative studies of the kinetics of 5-aminolaevulinic acid-induced fluorescence in bladder transitional cell carcinoma. *British journal of cancer*. 78. 1113–1118 (1998).
- Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L: Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay and drug development technologies*. 12. 207–218 (2014).
- Feriani L, Juenet M, Fowler CJ, Bruot N, Chioccioli M, Holland SM, Bryant CE, Cicuta P: Assessing the Collective Dynamics of Motile Cilia in Cultures of Human Airway Cells by Multiscale DDM. *Biophysical journal*. 113. 109–119 (2017).
- Gamarra F, Wagner S, Al-Batran S, Maier I, Castro M, Hautmann H, Bergner A, Baumgartner R, Huber RM: Kinetics of 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence in organ cultures of bronchial epithelium and tumor. *Respiration; international review of thoracic diseases*. 69. 445–450 (2002).
- Grainger CI, Greenwell LL, Lockley DJ, Martin GP, Forbes B: Culture of Calu-3 cells at the air interface provides a representative model of the airway epithelial barrier. *Pharmaceutical research*. 23. 1482–1490 (2006).
- Hasan S, Sebo P, Osicka R: A guide to polarized airway epithelial models for studies of host-pathogen interactions. *The FEBS journal*. 285. 4343–4358 (2018).

- Hastedt JE, Bäckman P, Clark AR, Doub W, Hickey A, Hochhaus G, Kuehl PJ, Lehr C-M, Mauser P, McConville J, Niven R, Sakagimi M, Weers JG: Scope and relevance of a pulmonary biopharmaceutical classification system AAPS/FDA/USP Workshop March 16-17th, 2015 in Baltimore, MD. *AAPS Open*. 2 (2016).
- Hautmann H, Pichler JP, Stepp H, Baumgartner R, Gamarra F, Huber RM: In-vivo kinetics of inhaled 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence in bronchial tissue. *Respiratory research*. 8. 33 (2007).
- He B, Chen G, Zeng Y: Three-dimensional cell culture models for investigating human viruses (2016).
- Heyer A: Optimierung der in-vitro-Kultivierung von primären normalen humanen bronchialen Epithelzellen (NHBE). Masterarbeit. Tirol, fhg - Zentrum für Gesundheitsberufe Tirol GmbH (2021).
- Hoppensack A, Kazanecki CC, Colter D, Gosiewska A, Schanz J, Walles H, Schenke-Layland K: A human in vitro model that mimics the renal proximal tubule. *Tissue engineering. Part C, Methods*. 20. 599–609 (2014).
- Horani A, Nath A, Wasserman MG, Huang T, Brody SL: Rho-associated protein kinase inhibition enhances airway epithelial Basal-cell proliferation and lentivirus transduction. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 49. 341–347 (2013).
- Ishikawa S, Ishimori K, Ito S: A 3D epithelial-mesenchymal co-culture model of human bronchial tissue recapitulates multiple features of airway tissue remodeling by TGF- β 1 treatment. *Respiratory research*. 18. 195 (2017).
- Jensen C, Teng Y: Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Frontiers in molecular biosciences*. 7. 33 (2020).
- Landes R, Illanes A, Goepfner D, Gollnick H, Friebe M: A study of concentration changes of Protoporphyrin IX and Coproporphyrin III in mixed samples mimicking conditions inside cancer cells for Photodynamic Therapy. *PloS one*. 13. e0202349 (2018).
- Langhans SA: Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. *Frontiers in pharmacology*. 9. 6 (2018).
- Lee DDH, Petris A, Hynds RE, O'Callaghan C: Ciliated Epithelial Cell Differentiation at Air-Liquid Interface Using Commercially Available Culture Media. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). 2109. 275–291 (2020).
- Leung C, Wadsworth SJ, Yang SJ, Dorscheid DR: Structural and functional variations in human bronchial epithelial cells cultured in air-liquid interface using different growth media. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 318. L1063-L1073 (2020).
- Li F, He J, Wei J, Cho WC, Liu X: Diversity of epithelial stem cell types in adult lung. *Stem cells international*. 2015. 728307 (2015).
- Lifeline Cell Technology: HBTEC Air-Liquid Interface Differentiation Medium - Instruction Sheet. pp. 6 (2016).
- Lippert H: Lehrbuch Anatomie. pp. 862. Elsevier Urban & Fischer. München (2011).
- Liu J, Walker NM, Ootani A, Strubberg AM, Clarke LL: Defective goblet cell exocytosis contributes to murine cystic fibrosis-associated intestinal disease. *The Journal of clinical investigation*. 125. 1056–1068 (2015).
- Liu X, Ory V, Chapman S, Yuan H, Albanese C, Kallakury B, Timofeeva OA, Nealon C, Dakic A, Simic V, Haddad BR, Rhim JS, Dritschilo A, Riegel A, McBride A, Schlegel R: ROCK inhibitor and feeder cells induce the conditional reprogramming of epithelial cells. *The American journal of pathology*. 180. 599–607 (2012).
- Luengen AE, Kniebs C, Buhl EM, Cornelissen CG, Schmitz-Rode T, Jockenhoevel S, Thiebes AL: Choosing the Right Differentiation Medium to Develop Mucociliary Phenotype of Primary Nasal Epithelial Cells In Vitro. *Scientific reports*. 10. 6963 (2020).
- Lüllmann-Rauch R, Asan E: Taschenbuch Histologie. pp. 726. Georg Thieme Verlag. Stuttgart, New York (2015).
- Lynn KS, Peterson RJ, Koval M: Ruffles and spikes: Control of tight junction morphology and permeability by claudins. *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes*. 1862. 183339 (2020).

- Matheson TD, Kaufman PD: The p150N domain of chromatin assembly factor-1 regulates Ki-67 accumulation on the mitotic perichromosomal layer. *Molecular biology of the cell*. 28. 21–29 (2017).
- Moll R, Divo M, Langbein L: The human keratins: biology and pathology. *Histochemistry and cell biology*. 129. 705–733 (2008).
- Myerburg MM, Latoche JD, McKenna EE, Stabile LP, Siegfried JS, Feghali-Bostwick CA, Pilewski JM: Hepatocyte growth factor and other fibroblast secretions modulate the phenotype of human bronchial epithelial cells. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 292. L1352-60 (2007).
- Nakayama T, Otsuka S, Kobayashi T, Okajima H, Matsumoto K, Hagiya Y, Inoue K, Shuin T, Nakajima M, Tanaka T, Ogura S-I: Dormant cancer cells accumulate high protoporphyrin IX levels and are sensitive to 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. *Scientific reports*. 6. 36478 (2016).
- Nelson CM, Chen CS: Cell-cell signaling by direct contact increases cell proliferation via a PI3K-dependent signal. *FEBS Letters*. 514. 238–242 (2002).
- Nettesheim P, Koo JS, Gray T: Regulation of differentiation of the tracheobronchial epithelium. *Journal of aerosol medicine : the official journal of the International Society for Aerosols in Medicine*. 13. 207–218 (2000).
- Ng-Blichfeldt J-P, Schrik A, Kortekaas RK, Noordhoek JA, Heijink IH, Hiemstra PS, Stolk J, Königshoff M, Gosens R: Retinoic acid signaling balances adult distal lung epithelial progenitor cell growth and differentiation. *EBioMedicine*. 36. 461–474 (2018).
- Nurmik M, Ullmann P, Rodriguez F, Haan S, Letellier E: In search of definitions: Cancer-associated fibroblasts and their markers. *International journal of cancer*. 146. 895–905 (2020).
- Okuda K, Chen G, Subramani DB, Wolf M, Gilmore RC, Kato T, Radicioni G, Kesimer M, Chua M, Dang H, Livraghi-Butrico A, Ehre C, Doerschuk CM, Randell SH, Matsui H, Nagase T, O'Neal WK, Boucher RC: Localization of Secretory Mucins MUC5AC and MUC5B in Normal/Healthy Human Airways. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 199. 715–727 (2019).
- Oshima T, Gedda K, Koseki J, Chen X, Husmark J, Watari J, Miwa H, Pierrou S: Establishment of esophageal-like non-keratinized stratified epithelium using normal human bronchial epithelial cells. *American journal of physiology. Cell physiology*. 300. C1422-9 (2011).
- PromoCell: Air-Liquid Interface Culture System for Standardized Respiratory Research. Application Note. <https://promocell.com/wp-content/uploads/2021/06/Application-Note-Air-Liquid-Interface-Culture-System.pdf>, zuletzt geprüft am: 15.04.2022.
- PromoCell: Airway Epithelial Cell Medium - Instruction Manual. <https://promocell.com/wp-content/uploads/product-information/manual/C-21060.pdf>, zuletzt geprüft am: 28.03.2022.
- Rayner RE, Makena P, Prasad GL, Cormet-Boyaka E: Optimization of Normal Human Bronchial Epithelial (NHBE) Cell 3D Cultures for in vitro Lung Model Studies. *Scientific reports* (2019).
- Rhee S: Fibroblasts in three dimensional matrices: cell migration and matrix remodeling. *Experimental & molecular medicine*. 41. 858–865 (2009).
- Schamberger AC, Staab-Weijnitz CA, Mise-Racek N, Eickelberg O: Cigarette smoke alters primary human bronchial epithelial cell differentiation at the air-liquid interface. *Scientific reports*. 5. 8163 (2015).
- Scheffler S, Dieken H, Krischenowski O, Förster C, Branscheid D, Aufderheide M: Evaluation of E-cigarette liquid vapor and mainstream cigarette smoke after direct exposure of primary human bronchial epithelial cells. *International journal of environmental research and public health*. 12. 3915–3925 (2015).
- Schweinlin M, Rossi A, Lodes N, Lotz C, Hackenberg S, Steinke M, Walles H, Groeber F: Human barrier models for the in vitro assessment of drug delivery. *Drug delivery and translational research*. 7. 217–227 (2017).
- Skibinski G, Elborn JS, Ennis M: Bronchial epithelial cell growth regulation in fibroblast cocultures: the role of hepatocyte growth factor. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 293. L69-76 (2007).

- Smirnova NF, Schamberger AC, Nayakanti S, Hatz R, Behr J, Eickelberg O: Detection and quantification of epithelial progenitor cell populations in human healthy and IPF lungs. *Respiratory research*. 17. 83 (2016).
- Sobecki M, Mrouj K, Colinge J, Gerbe F, Jay P, Krasinska L, Dulic V, Fisher D: Cell-Cycle Regulation Accounts for Variability in Ki-67 Expression Levels. *Cancer research*. 77. 2722–2734 (2017).
- Soppina V, Herbstman JF, Skiniotis G, Verhey KJ: Luminal localization of α -tubulin K40 acetylation by cryo-EM analysis of fab-labeled microtubules. *PLoS one*. 7. e48204 (2012).
- Srinivasan B, Kolli AR, Esch MB, Abaci HE, Shuler ML, Hickman JJ: TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *Journal of laboratory automation*. 20. 107–126 (2015).
- Staudt MR, Buro-Auriemma LJ, Walters MS, Salit J, Vincent T, Shaykhiev R, Mezey JG, Tilley AE, Kaner RJ, Ho MWY, Crystal RG: Airway Basal stem/progenitor cells have diminished capacity to regenerate airway epithelium in chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 190. 955–958 (2014).
- Steinke M, Gross R, Walles H, Gangnus R, Schütze K, Walles T: An engineered 3D human airway mucosa model based on an SIS scaffold. *Biomaterials*. 35. 7355–7362 (2014).
- Stemcell Technologies: PneumaCult Ex Plus Medium. https://www.stemcell.com/products/pneumacult-ex-plus-medium.html?utm_source=google&utm_medium=cpc&gclid=Cj0KCQjwr-SSBhC9ARIsANhzu17R2eodfbwFZV05wmrW4wgZq_5hglL4oJJDa6WzP-ay3WfG3bAGr2oaAhYDEALw_wcB, zuletzt geprüft am: 15.04.2022.
- Sun X, Kaufman PD: Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma*. 127. 175–186 (2018).
- Thermo Fisher Scientific: Pierce BCA Protein Assay Kit User Guide. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf, zuletzt geprüft am: 28.03.2023.
- Tsartsali L, Hislop AA, McKay K, James AL, Elliot J, Zhu J, Rosenthal M, Payne DN, Jeffery PK, Bush A, Saglani S: Development of the bronchial epithelial reticular basement membrane: relationship to epithelial height and age. *Thorax*. 66. 280–285 (2011).
- Tunstall RG, Barnett AA, Schofield J, Griffiths J, Vernon DI, Brown SB, Roberts DJH: Porphyrin accumulation induced by 5-aminolaevulinic acid esters in tumour cells growing in vitro and in vivo. *British journal of cancer*. 87. 246–250 (2002).
- van Roy F, Berx G: The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 65. 3756–3788 (2008).
- Voytik-Harbin SL, Brightman AO, Kraine MR, Waisner B, Badylak SF: Identification of extractable growth factors from small intestinal submucosa. *Journal of cellular biochemistry*. 67. 478–491 (1997).
- Welsch U, Kummer W, Deller T (eds.): *Histologie. Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie : das Lehrbuch*. Vol. 5. Auflage. Elsevier. München (2018).
- Whitaker-Menezes D, Martinez-Outschoorn UE, Lin Z, Ertel A, Flomenberg N, Witkiewicz AK, Birbe RC, Howell A, Pavlides S, Gandara R, Pestell RG, Sotgia F, Philp NJ, Lisanti MP: Evidence for a stromal-epithelial "lactate shuttle" in human tumors: MCT4 is a marker of oxidative stress in cancer-associated fibroblasts. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*. 10. 1772–1783 (2011).
- Wiese-Rischke C, Murkar RS, Walles H: Biological Models of the Lower Human Airways-Challenges and Special Requirements of Human 3D Barrier Models for Biomedical Research. *Pharmaceutics*. 13 (2021).
- Yamaya M, Finkbeiner WE, Chun SY, Widdicombe JH: Differentiated structure and function of cultures from human tracheal epithelium. *The American journal of physiology*. 262. L713–24 (1992).
- Zscheppang K, Berg J, Hedtrich S, Verheyen L, Wagner DE, Suttorp N, Hippenstiel S, Hocke AC: Human Pulmonary 3D Models For Translational Research. *Biotechnology journal*. 13 (2018).

Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

“Aufbau, Optimierung und Charakterisierung eines 3D-humanen Atemwegmodells als Infektionsmodell“

In der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 25.11.2024

Julian Maurer