
Bachelorarbeit

Frau
Hannah John

**Erzeugung eines 3D-
Lungengewebemodells mithilfe einer
Luft-Flüssigkeits-Grenzflächen-
Zellkultur**

Freiberg, 17.08.2023

Bachelorarbeit

Erzeugung eines 3D- Lungengewebemodells mithilfe einer Luft-Flüssigkeits-Grenzflächen- Zellkultur

Autor:

Frau

Hannah John

Studiengang:

B.Sc. Biotechnologie

Seminargruppe:

BT20wM-B

Erstprüfer:

Herr Prof. Dr. rer. nat. habil. Röbbke Wünschiers

Firmenbetreuer:

Frau Dr. Ina Prade

Einreichung:

Freiberg, 17.08.2023

Verteidigung/Bewertung:

Mittweida, 29.08.2023

Bibliographische Beschreibung

John, Hannah: Erzeugung eines 3D-Lungengewebe-modells mithilfe einer Luft-Flüssigkeits-Grenzflächen-Zellkultur. - 2023. – 11 Seiten Verzeichnisse, 99 Seiten Inhalt, 0 Seiten Anhang
Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät für Angewandte Computer- und Biowissenschaften, Bachelorarbeit, 2023.

Englischer Titel

Generation of a 3D lung tissue model using an air-liquid-interface-cell culture

Kurzbeschreibung

Die vorliegende Bachelorarbeit befasst sich mit der Etablierung und Entwicklung eines dreidimensionalen Lungengewebe-modells auf Grundlage einer Luft-Flüssigkeits-Grenzflächen-Zellkultur. Das In-vitro-Modell sollte die Grenzfläche zwischen dem luftgefüllten Raum der Lungenbläschen und dem Blut innerhalb der Kapillaren rekonstruieren. Für die Nachbildung des Lungenepithels kamen die Lungenkarzinomzelllinie A549 und die humanen primären Bronchialepithelzellen HBEpC zum Einsatz. Das Endothelgewebe wurde mit der somatischen Hybridzelllinie EA.hy926 und den Primärzellen HUVEC rekonstruiert. Die Eignung des entwickelten Modells wurde anhand der Ausbildung einer epithelialen Barrierefunktion sowie der Reaktion auf die Zugabe des Transforming Growth Factors 1 (TGF-β1) bewertet. Während der Etablierung wurde der Einfluss der Kokultivierung auf die epitheliale Barriere untersucht. Des Weiteren wurden verschiedene, kommerziell verfügbare Medien für die Air-Liquid-Interface-Kultur (ALI-Kultur) getestet. Als Anhaftungssubstrat für die Zellen wurden verschiedene Präparationen des extrazellulären Matrix-Proteins Kollagen eingesetzt. Die Kultivierung von Zellen an der Luft-Flüssigkeitsgrenze führte zur Expression spezieller Markergene, die mithilfe von Immunfluoreszenz und einer quantitativen Real-Time PCR quantifiziert wurden. Die Atembewegung ist für die Differenzierung ebenfalls essentiell und somit wichtiger Bestandteil zukünftiger und aussagekräftiger Lungen-in-vitro-Modelle. Diese mechanische Stimulation konnte unter Zuhilfenahme des vom Fraunhofer Institutes (IWS) entwickelten MPSstimulus realisiert werden, sodass es möglich war erste Untersuchungen zur zyklischen, physiologischen und mechanischen Dehnung von Lungenzellen durchzuführen.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Bachelorarbeit unterstützt haben. Es war mir eine Freude, Anregungen und konstruktive Kritik entgegenzunehmen und in meine Arbeit einfließen zu lassen.

Ein besonderer Dank gebührt meiner Firmenbetreuerin Frau Dr. Ina Prade, die meine Bachelorarbeit betreut und begutachtet hat. Vielen Dank für die hilfreichen Anregungen und Ideen bei der Erstellung dieser Arbeit.

Außerdem bedanke ich mich herzlichst bei Caroline Seidel, Tina Hille und Fanny Mende für die kompetente Unterstützung und Betreuung im Labor.

Ein weiterer Dank gilt meinem Praxisunternehmen, dem FILK Freiberg, welches mir überhaupt erst diese Arbeit ermöglicht hat. Für die Bereitstellung des Laborplatzes, der internen Daten und des großen Vertrauens bin ich sehr dankbar.

Ebenso bedanke ich mich bei Herr Prof. Dr. rer. nat. habil. Röbbbe Wünschiers für die Betreuung von Seiten der Hochschule Mittweida.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir mein Studium durch ihre Unterstützung ermöglicht haben und stets ein offenes Ohr für mich hatten.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Lunge.....	2
1.1.1 Aufbau und Funktion.....	2
1.1.2 Atemwegsepithel.....	3
1.2 Zellquellen.....	5
1.3 In-vitro-Modelle.....	6
1.3.1 Vergleich Submers- und ALI-Kultur	7
1.3.2 Beurteilung der Qualität einer ALI-Kultur	10
1.3.3 Vergleich Mono- und Kokultursysteme.....	10
1.4 Kollagen Typ I.....	12
1.4.1 Struktur.....	12
1.4.2 Erzeugung von dreidimensionalen Kollagenmatrizen für das Tissue Engineering....	13
2 Zielstellung	15
3 Material.....	17
3.1 Chemikalien	17
3.2 biologische Reagenzien.....	17
3.3 TaqMan Sonden.....	18
3.4 Primersequenzen	18
3.5 Kits	18
3.6 Enzyme und Lösungen	18
3.7 Medien und Zusätze	19
3.8 Material.....	20
3.9 Geräte	21
4 Methoden.....	22
4.1 Zellkultur	22
4.1.1 Auftauen und Einfrieren	23
4.1.2 Splitten und Zellzahlbestimmung.....	23

4.1.3 Herstellung einer säurelöslichen Kollagenlösung	24
4.1.4 Herstellung der Kollagensubstrate	25
4.1.5 Zellaussaat	26
4.1.6 Konfluenzbeurteilung	26
4.2 Erzeugung einer ALI-Kultur	28
4.3 Erzeugung einer Kokultur	29
4.4 Färbemethoden	30
4.4.1 Lebend-Tod.....	30
4.4.2 Phalloidin-DAPI.....	30
4.4.3 Hämatoxylin-Eosin.....	31
4.4.4 Alcianblau	31
4.4.5 CellMask Deep Red.....	32
4.4.6 Immunfluoreszenzfärbung	32
4.5 Membranschnitte	33
4.6 Zytotoxizitätstest	33
4.7 Barriere messung.....	35
4.7.1 Natriumfluorescein-Durchgang.....	35
4.7.2 Dextran-Durchgang	36
4.8 Auslenkungsmessung der Kollagenschichten	36
4.9 Netwell-Besiedlung und Dehnung	37
4.10 qRT-PCR	38
4.10.1 RNA-Extraktion	38
4.10.2 RNA-Aufreinigung.....	38
4.10.3 cDNA-Synthese	38
4.10.4 qRT-PCR	39
4.11 Gelelektrophorese	40
4.12 Überprüfung der Wirksamkeit eines ALI-Modells mithilfe von TGF- β 1	40
5 Ergebnisse	42
5.1 Konfluenzbeurteilung	42
5.2 Experimente und Ergebnisse der Lungenkarzinomzelllinie A549.....	44
5.2.1 H&E-Färbung für die Untersuchung der epithelialen Integrität	44
5.2.2 Alcianblau-Färbung zur Untersuchung der Freisetzung von Lungensurfactant.....	46
5.2.3 Membran-Querschnitte und Zellschichtdicken-Vergleich	47

5.2.4 Permeabilitätsmessung der entstandenen Epithelschicht.....	48
5.2.5 Untersuchung verschiedener Kollagensubstrate und Kultivierungstypen.....	50
5.2.6 Auswirkungen der Kollagenvernetzung auf die Barriere	51
5.2.7 Zytotoxizitätstest für verschiedene Anhaftungssubstrate	53
5.2.8 Überprüfung der Funktionalität des entwickelten ALI-Modells mittels TGF- β 1	54
5.2.9 Untersuchung epithelspezifischer Markerproteine im entwickelten ALI-Modell.....	55
5.3 Zytotoxizitätstest für die Etablierung eines Kokulturmediums	57
5.4 Etablierung eines Airliftmediums der primären Bronchialepithelzellen HBEpC	59
5.4.1 Alcianblau- und H&E-Färbung zur Untersuchung der primären Epithelschichten....	60
5.4.2 Permeabilitätsmessung der primären Epithelien.....	61
5.5 Untersuchung der Genexpression im ALI-Modell und in Gegenwart von kokultivierten Endothelzellen	62
5.6 Erste Untersuchungen mithilfe des MPSstimulus	66
5.6.1 Überprüfung der Durchlässigkeit von Kollagenmembranen.....	66
5.6.2 Auslenkungsexperimente der Kollagenmembranen.....	68
5.6.3 Berechnung der Kollagenmembran-Auslenkung	69
5.6.4 Untersuchung der mechanischen Belastung auf die Zellmorphologie	72
6 Diskussion.....	74
6.1 Charakterisierung geeigneter Aussaat-Bedingungen	75
6.2 Etablierung eines geeigneten Anhaftungssubstrates für die Airlift-Kultur	76
6.3 Identifizierung eines geeigneten Mediums für eine Kokultur	78
6.4 Etablierung der Airlift-Kultivierung für die Lungenkarzinomzelllinie A549	79
6.5 Überprüfung der Funktionalität des erzeugten Modells mithilfe von TGF- β 1	82
6.6 Auswirkungen der Verwendung von Primärzellen im Modell.....	84
6.7 Beurteilung der Aussagekraft und Funktionalität der erzeugten Airlift-Kulturen	86
6.8 Erste Untersuchungen zur mechanischen Stimulation des Lungenmodells.....	90
7 Ausblick	94
8 Zusammenfassung	96
9 Summary	98
Literaturverzeichnis	100
Selbstständigkeitserklärung	104

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau und zelluläre Zusammensetzung des menschlichen Atemwegsepithels	4
Abbildung 2: Vergleich von Submers- und ALI-Kultivierung	9
Abbildung 3: Erzeugung einer Kokultur zur Rekonstruktion der Lungenphysiologie	11
Abbildung 4: schematische Darstellung der Struktur von Kollagen.....	13
Abbildung 5: Konfluenzbeurteilung für A549, EA.hy926, HBEpC und HUVEC	42
Abbildung 6: lichtmikroskopische Aufnahmen der Primärzellen HBEpC und HUVEC	43
Abbildung 7: H&E-Färbung zur Untersuchung der epithelialen Integrität	45
Abbildung 8: Alcianblau-Färbung zur Untersuchung der Anwesenheit von Muzin.....	46
Abbildung 9: Querschnitte der unterschiedlichen Airlift-Kulturen.....	47
Abbildung 10: Vergleich der Zellschichtdicke	48
Abbildung 11: Permeabilitätsmessung der Epithelschichten	49
Abbildung 12: Untersuchung verschiedener Kollagensubstrate und Kultivierungstypen	51
Abbildung 13: A549 auf unterschiedlichen Kollagensubstraten.....	52
Abbildung 14: Untersuchung verschiedener Kollagenkonzentrationen und –vernetzungen.....	53
Abbildung 15: Zytotoxizitätstest zum Vergleich der Kollagensubstrate	54
Abbildung 16: Permeabilitätsmessung einer mit TGF- β 1 behandelten ALI-Kultur.....	55
Abbildung 17: Immunfluoreszenzfärbung 7-tägiger Airlift-Kulturen	56
Abbildung 18: Zytotoxizitätstest für die Etablierung der Kokulturmedien.....	58
Abbildung 19: H&E- und Alcianblau-Färbung der primären Epithelien.....	61
Abbildung 20: Permeabilitätsmessung der primären Epithelschichten	62
Abbildung 21: Genexpressionsprofile unterschiedlicher Airlift-Kulturen.....	64
Abbildung 22: Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte	65
Abbildung 23: Dextran-Messung verschiedener Kollagenmembranen	67
Abbildung 24: Auslenkungsmessung verschiedener Kollagenmembranen	69
Abbildung 25: Funktionsverlauf für die Berechnung der Kollagenmembran-Auslenkung	70
Abbildung 26: Vergleich der synthetischen Membranen von Net- und Transwell-Einsätzen	72
Abbildung 27: CellMask Deep Red-Färbung gedehnter Zellen	73

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung und Bezeichnungen der Kulturmedien sowie Pufferlösungen....	22
Tabelle 2: Volumina für die Konfluenzbeurteilung	28
Tabelle 3: Volumina der jeweiligen well Platten und Einsätze	30
Tabelle 4: Konzentrationen der Primär- und Sekundärantikörper	33
Tabelle 5: Medien-Varianten zur Etablierung des Kulturmediums der Kokultur.....	35
Tabelle 6: Probenzusammensetzung für die qRT-PCR.....	38
Tabelle 7: qRT-PCR-Programm.....	39
Tabelle 8: Zellzahlen für die Aussaat der verwendeten Zellen	44

Abkürzungsverzeichnis

A549	humane Lungenkarzinomzelllinie
ALI	Air-Liquid-Interface
AQP5	Aquaporin-5
AT1	Pneumozyten Typ 1
AT2	Pneumozyten Typ 2
BPE	Rinderpituitarextrakt
BSA	Bovine Serum Albumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
CDH1	Cadherin-1
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EA.hy926	vaskuläre Endothelzelllinie
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EZM	extrazelluläre Matrix
FBS	Fetal Bovine Serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HBEpC	Humane Bronchialepithelzellen
HCl	Chlorwasserstoffsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
KI-67	Proliferationsmarker

KK	Kokultur
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MUC1	Mucin-1
NaOH	Natriumhydroxid
NTC	no template control
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
qRT-PCR	quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SARS-CoV-2	severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2
SFTPC	Surfactant Protein C
SK	Submerskultur
SLK	säurelösliches Kollagen
TEER	transepithelialer elektrischer Widerstand
TGF-β1	Transforming Growth Factor Beta 1
TNS	Trypsin Neutralizing Solution
UNG	Uracil N-Glycosylase
ZO-1	Zonula occludens-1

1 Einleitung

Atemwegserkrankungen betreffen jährlich Millionen von Menschen und gehören zu den häufigsten Todesursachen weltweit. In Deutschland leidet ungefähr ein Viertel der Bevölkerung unter den Symptomen einer akuten oder chronischen Lungenerkrankung, dazu gehören bspw. Asthma, Tuberkulose oder die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD). Die Quellen für potentielle Schäden im Bereich der Atemwege können dabei ganz unterschiedlich sein und umfassen Luftverschmutzungen sowie Tabakprodukte bis hin zu alltäglichen Gasbelastungen (Moreira, et al., 2021). Erst vor kurzem hat die globale Coronavirus-Pandemie gezeigt, welche sozioökonomischen Folgen eine bisher weitestgehend unerforschte Lungenerkrankung haben kann. Durch die Erforschung des Virus und die Entwicklung potentieller Medikamente wurde auf das Fehlen zuverlässiger und authentischer In-vitro-Modelle für die Rekonstruktion der Lungenphysiologie aufmerksam gemacht. Die Funktion des Atemwegsystems ist vielseitig und umfasst den Gasaustausch mit der Umgebung sowie die Abwehr von Krankheitserregern. Hierfür hat die Lunge zahlreiche Mechanismen und spezialisierte Atemwegsepithelzellen entwickelt, welche es ermöglichen, Fremdstoffen zu erkennen und zu inaktivieren (Heinen, et al., 2021). Die Rekonstruktion der pulmonalen Mikroumgebung ist allerdings aufgrund der angesprochenen komplexen Morphologie und Zellheterogenität, eine Herausforderung. Bislang hat man für die Testung inhalativer Medikamente überwiegend Tiermodelle verwendet, allerdings führten die Unterschiede in Anatomie, Physiologie und Atmungsstruktur immer wieder zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen in klinischen Studien. Zudem ist die Nutzung von Tieren für wissenschaftliche Zwecke stark umstritten und soll zukünftig mithilfe von aussagekräftigen In-vitro-Modellen nach dem 3R-Prinzip: vermieden, verringert und verbessert werden. Lungen-in-vitro-Modelle werden bereits heutzutage für die Grundlagenforschung sowie für das pharmakologische Screening von Arzneimitteln verwendet (Cao, et al., 2020). Besonders die Nutzung von dreidimensionalen Zellkulturen gewinnt dabei zunehmend an wissenschaftlicher Bedeutung. Grund dafür ist, dass Zellkulturen in der Lage sind eine streng kontrollierte zelluläre Mikroumgebung mit hoher Reproduzierbarkeit und Hochdurchsatzfähigkeit zu gewährleisten, wodurch biologische Prozesse, wie Zell-Zell-Interaktionen authentisch rekonstruiert werden können. Darüber hinaus sind zellbasierte Modelle in der Lage mit allen wissenschaftlich relevanten Substanzen in Kontakt zu kommen, ohne dass deren Funktionalität und Aussagekraft negativ beeinflusst werden (Klein, et al., 2011).

1.1 Lunge

Die Lunge ist mit etwa 80 m² eines der größten Organe des menschlichen Körpers. Ihre Hauptaufgabe besteht darin, Sauerstoff im Blut anzureichern und gleichzeitig Kohlendioxid zu eliminieren. Ein solch essentieller Gasaustausch erfordert eine große Oberfläche, weshalb die Lunge ein verzweigtes System aus Atemwegen und Blutgefäßen darstellt. Darüber hinaus bilden die Atemwege eine komplexe Barriere, um den Körper vor Krankheitserregern und gegenüber der Exposition toxischer Substanzen zu schützen (Cao, et al., 2020).

1.1.1 Aufbau und Funktion

Die Lunge befindet sich innerhalb des Brustkorbs und wird nach außen von den Rippen geschützt. Sie setzt sich aus zwei unterschiedlich großen Lungenflügeln zusammen, wobei der linke Flügel, aufgrund der direkten Lage zum Herzen kleiner ist. Umgeben wird die Lunge von einer serösen und feuchten Gewebeschicht, der sogenannten Pleura, welche sich aus dem Lungen- und dem Rippenfell zusammensetzt. Diese Membran bildet innerhalb der Brusthöhle zwei voneinander, durch Flüssigkeit getrennte und geschlossene Hohlräume, welche die Ausdehnung der Lunge während des Atmens ermöglichen (Moreira, et al., 2021). Die pulmonale Anatomie unterliegt einem verzweigten Netzwerk, welches sich aus den oberen (Nasenhöhle, Rachen und Kehlkopf) und den unteren Atemwegen zusammensetzt und sich wiederum in die proximalen (Trachea, Bronchien und Bronchiolen) und distalen Atemwege (Alveolen) gliedert. Die proximalen Atemwege bilden dabei ein Gastransportsystem, welches zusätzlich an der Abwehr von Fremdkörpern beteiligt ist. Im Gegensatz dazu, sind die distalen Atemwege für den Gasaustausch mit der Umgebung verantwortlich (Heinen, et al., 2021). Bei der äußeren Atmung gelangt die Luft über die oberen Atemwege in die Bronchien. Jede Bronchie verzweigt sich etwa 20-mal in immer dünner werdende Bronchiolen, an dessen Enden sich die Alveolen befinden. Das feuchte und einzellschichtige Epithel der Lungenbläschen dient als respiratorische Oberfläche und wird von zahlreichen Blutkapillaren umgeben. Die Diffusion der Gase erfolgt entlang eines Konzentrationsgradienten, wobei der Sauerstoff aus der Atemluft an das Blut abgegeben und gleichzeitig Kohlendioxid ausgeschieden wird (Bilsing, et al., 2007). Diese funktionelle Einheit wird auch als Blut-Luft-Schranke bezeichnet, welche mit Epithel- und Endothelzellen besetzt ist.

1.1.2 Atemwegsepithel

Zum Schutz der Atemwege hat die Lunge zahlreiche effektive Mechanismen entwickelt, um Fremdstoffe herauszufiltern und Krankheitserreger zu inaktivieren. So sind Trachea und Bronchien mit einem Atemwegsepithel ausgekleidet, welches sich aus einer Luft zugewandten, apikalen Seite und einer dem inneren Milieu ausgesetzten, basalen Seite zusammensetzt (Heinen, et al., 2021). Die menschliche Epithelauskleidung besteht aus unterschiedlichen Populationen sekretorischer Zellen, Flimmerzellen und Basalzellen. Alle Zellen befinden sich hierbei auf der Basallamina. Der wichtigste Typ von Atemwegsepithelzellen sind die Basalzellen, welche undifferenziert sind und ein Drittel der Atemwegsepithelzellpopulation ausmachen (Cao, et al., 2020). Basalzellen fungieren innerhalb der Epithelschicht als Stammzellen, mit dem Potential sich während der Gewebeerhaltung zu erneuern und sich bei einer Gewebeverletzung in sekretorische oder bewimperte Zellen zu differenzieren (Rock, et al., 2010). Zudem sind sie in der Lage Entzündungsreaktionen zu regulieren und die transepitheliale Wasserbewegung zu beeinflussen (Evans, et al., 2001). Die oberen Atemwege sind mit einem pseudostratifiziertem Epithel ausgekleidet und bestehen zum Großteil aus Becherzellen sowie submukösen Drüsen, welche für die mukoziliäre Clearance, dem Abtransport von Schadstoffen aus dem Atemwegslumen verantwortlich sind (Moreira, et al., 2021). Die schleimproduzierenden Becherzellen gehören zu den wichtigsten sekretorischen Zellen der Atemwege, welche sich aus glykosyliertem Muzin-Granulat zusammensetzen. Gemeinsam mit den Flimmerzellen, welche 50 % - 70 % der Epithelzellpopulation ausmachen, ergibt sich die mukoziliäre Eskalation. Diese stellt ebenfalls einen Abwehrmechanismus der Atemwege dar, um Fremdstoffe einzufangen und letztendlich zu entfernen (Staudt, et al., 2014). Die Flimmerzellen sind zudem in der Lage sich zu dedifferenzieren, um nach der Verletzung von Plattenepithelzellen die Gewebeintegrität aufrecht zu erhalten. Anschließend können sie sich wieder in Flimmerzellen differenzieren, um das Atemwegsepithel wiederherzustellen (Park, et al., 2006). Die apikale Seite des Epithels, ist mit einer gelartigen Schicht bedeckt, sodass Pathogene umschlossen und anschließend durch den Zilienschlag abtransportiert werden. Als Zilie bezeichnet man eine auf Mikrotubuli basierende Struktur. Die Ziliarbewegung ist vom Basalkörper sowie der umgebenden Zytoskelettstruktur abhängig und wird von der in den Mitochondrien erzeugten Energie angetrieben (Harkema, et al., 2006). Die terminalen Atemwege sind mit Alveolarepithel ausgekleidet und von Blutgefäßen und Fibroblasten umgeben. Man unterscheidet zwei verschiedene Arten von Alveolarepithelzellen (Pneumozyten). Die Pneumozyten Typ 1 (AT1) sind differenzierte Zellen, welche die für den

Gasaustausch benötigte Oberfläche bereitstellen und am Ionen- und Proteintransport beteiligt sind. Die Pneumozyten Typ 2 (AT2) sind demhingegen für die Produktion und Sekretion von Lungensurfactant verantwortlich, welches die Oberflächenspannung während des Atmens verringert. Zudem fungieren sie als alveoläre Stammzellen, mit der Fähigkeit sich selbst zu erneuern und sich in AT1 Zellen zu differenzieren (Moreira, et al., 2021). Das ausgeschiedene Lungensurfactant enthält Kollektine, welche zusammen mit den in der Lunge vorkommenden Alveolarmakrophagen die Abwehr von Krankheitserregern fördern. Um die Versorgung mit Ionen, Wasser und Makromolekülen auch in den Zwischenräumen der Zellen zu gewährleisten, werden diese mit Tight Junctions, Adherens Junctions und Desmosomen abgedichtet. Diese Verbindungskomplexe sind jedoch nicht nur für die Versorgung der Zellen verantwortlich, sondern sie fungieren auch als Regulatoren für die Proliferation, Apoptose und Differenzierung der Epithelzellen (Ganesan, et al., 2013). Die Zellen der Epithelschicht sind zudem am Aufbau der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche beteiligt, welche für die Regulation der Flüssigkeitszusammensetzung innerhalb der Lufträume verantwortlich ist. Erzeugt wird diese Grenzfläche durch eine zelluläre apikal-basale Polarität, wodurch das Lungenepithel seine Funktion erhält und die Atmung erleichtert wird (Moreira, et al., 2021).

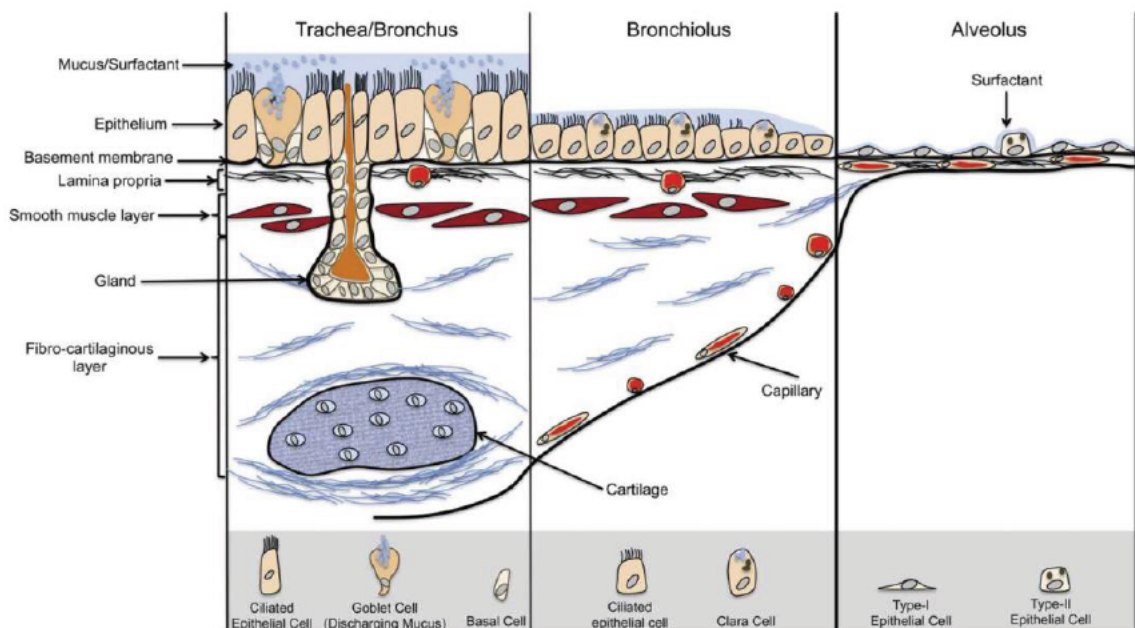


Abbildung 1: Aufbau und zelluläre Zusammensetzung des menschlichen Atemwegsepithels

Vereinfachte Darstellung des Atemwegsepithels auf den drei Hauptebenen: Trachea, Bronchiolen und Alveolen. Die Epithelschicht liegt in der Luftröhre pseudostratifiziert vor und setzt sich aus Zilien, Becher- und Basalzellen zusammen. In den Bronchiolen liegt ein quaderförmiges Epithel bestehend aus Zilien und Keulenzellen vor. Je näher man den Alveolen kommt, desto dünner wird die Faserschicht. In den Alveolen erfolgt die Reduktion zum Plattenepithel, welches sich aus den Pneumozyten Typ I und Typ II zusammensetzt. Auf allen drei Ebenen erfolgt die Sezernierung von Surfactant.

Quelle: Klein et al., 2011, Seite: 1518

1.2 Zellquellen

Die wichtigste biologische Komponente eines jeden In-vitro-Modells ist die Zelle deren Aufgabe darin besteht, sowohl die Zellbiologie als auch die Funktion der Lunge darzustellen. Die für Lungen-in-vitro-Modelle geeigneten Zellen sollten eine einfache Zugänglichkeit und Handhabung besitzen. Zudem sollten sie in ausreichender Zahl vorkommen, ihren differenzierten Phänotyp während der Kultivierung aufrechterhalten und hohe Proliferationsraten für die Hochdurchsatzforschung bereitstellen (Moreira, et al., 2021). Zelllinien werden aufgrund ihrer unbegrenzten Verfügbarkeit, hohen Reproduzierbarkeit und niedrigen Kosten innerhalb der Forschung bevorzugt eingesetzt. Die humane Epithelzelllinie A549 ist die bisher am besten erforschteste Lungenkarzinomzelllinie, welche bereits zahlreiche Anwendungen in der Krebsforschung gefunden hat. Sie wurde 1972 aus den Lungen eines 58-jährigen Amerikaners mit Karzinom gewonnen und dient heutzutage als Modell für die Rekonstruktion der alveolären Pneumozyten Typ II. Die Zellen sind sobald sie an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche kultiviert werden in der Lage Surfactant freizusetzen, wodurch die pulmonale Oberflächenspannung aufrechterhalten werden kann (Barosova, et al., 2021). Allerdings sind Zelllinien nicht in der Lage die komplexe zelluläre Zusammensetzung sowie die Gewebediversität des Lungengewebes vollständig zu rekonstruieren, was einen beträchtlichen Nachteil darstellt (Heinen, et al., 2021). Die meisten Lungenerkrankungen sind auf Funktionsstörungen der Epithelzellen zurückzuführen, weshalb die Verwendung menschlicher Primärzellen eine authentische Plattform darstellt, um Krankheiten zu modellieren. Gewonnen werden Primärzellen mit Hilfe von Gewebebiopsien, chirurgischen Resektionen oder Leichenlungen, wodurch es schwer ist eine ausreichende Anzahl an Zellen zu erhalten. Die Funktion des Atemwegsepithels besteht darin die Lunge vor Fremdstoffen zu schützen und zeitgleich die Luftfeuchtigkeit aufrechtzuerhalten, wodurch das Epithel ein wichtiges Ziel für Medikamente und Toxine darstellt. Für die Untersuchung der Pathologie und Funktion der Atemwege werden heutzutage bevorzugt die humanen primären Bronchialepithelzellen HBEpC verwendet, welche aus dem Oberflächenepithel menschlicher Bronchien stammen. Allerdings können Primärzellen aus unterschiedlichen Geweben von verschiedenen Spendern isoliert werden, wodurch diese eine erhöhte Heterogenität gegenüber Einzelspenderzelllinien aufweisen (Moreira, et al., 2021). Um die Zuverlässigkeit von In-vitro-Modellen zu verbessern und eine *in vivo* ähnlichere Mikroumgebung zu schaffen, bietet es sich zudem an, eine Kokultur der Epithelzellen mit anderen Zelltypen zu realisieren (Arumugasaamy, et al., 2018). Solch eine somatische Hybridzelle ist die Endothelzelllinie EA.hy926, welche durch die Fusion der

makrovaskulären Endothelzellen HUVEC und der Lungenkarzinomzelllinie A549 entstanden ist. Die primären Endothelzellen HUVEC stammen aus der Vene der Nabelschnur und dienen als Modellsystem zur Untersuchung der mechanischen sowie dynamischen Belastung innerhalb der Blutgefäße (Miroshnikova, et al., 2021). Die Kokultur ist in der Lage die Funktion des Lungenepithels zu fördern und die Eigenschaften des nativen Gewebes realistisch zu rekonstruieren, wodurch die pulmonale *in vivo* Situation besser nachgeahmt werden kann (Klein, et al., 2011).

1.3 In-vitro-Modelle

In-vitro-Modelle haben in den letzten Jahren immer mehr an wissenschaftlicher Bedeutung gewonnen. Sie bieten eine streng kontrollierte zelluläre Mikroumgebung, welche repliziert und in Echtzeit bewertet werden kann (Nossa, et al., 2021). Erzeugt werden diese Modelle mit Hilfe menschlicher Zellen, wodurch sie in der Lage sind Organe so realitätsnah wie nur möglich zu rekonstruieren. Zudem bilden sie die Grundlage für personalisierte medizinische Therapien, da sie aus gesunden aber auch aus Gewebe im Krankheitszustand erzeugt werden können. Lungen-in-vitro-Modelle dienen heutzutage nicht nur zur Untersuchung von Lungenerkrankungen, sondern werden auch für die Analyse von Zell-Zell-Interaktionen auf molekularer Ebene verwendet (Miller & Spence, 2017). Solche Modelle werden häufig mit dem Begriff der „physiologischen Relevanz“ in Verbindung gesetzt, welche die Ähnlichkeit eines Modells mit ihrem *in vivo* Äquivalent beschreibt. Diese Analogie ermöglicht die Reduzierung von Tierversuchen sowie klinischen Studien. Die Reproduktion der Lunge ist jedoch aufgrund ihrer Zellheterogenität und komplexen Architektur eine Herausforderung. Lungen-in-vitro-Modelle müssen daher bestimmte Voraussetzungen erfüllen, damit die pulmonale Anatomie in ihrer Gesamtheit so authentisch wie nur möglich rekonstruiert werden kann. Hierbei ist wichtig die Wechselwirkungen zwischen den Zellen untereinander und mit der extrazellulären Matrix darzustellen. Für die erfolgreiche Erzeugung eines Lungenmodells ist es zudem notwendig, die dynamische Bewegung während des Atmens und die Scherbelastung der Endothelzellen durch den Blutfluss innerhalb der Alveolarkapillaren nachzubilden. Diese mechanischen Kräfte sind besonders für die Morphologie und Funktion der Lunge ausschlaggebend und können mithilfe von mikrofluidischen Systemen realisiert werden, welche gleichzeitig in der Lage sind die Zellen mit ausreichend Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen (Davies & Tripathi, 1993). Für die Rekonstruktion eines funktionierenden Lungenepithelgewebes ist darüber hinaus die Ausbildung eines geschlossenen Monolayers, die

Synthese spezieller Markerproteine und die Produktion einer schützenden Schleimschicht, welche später die Kultivierung an der Luft ermöglicht, eine wichtige Voraussetzung (Cao, et al., 2020). Für die Kultivierung der verwendeten Zellen wird ein biokompatibles und mechanisch verformbares Substrat benötigt, welches idealerweise die gleiche chemische Zusammensetzung und dasselbe biochemische Verhalten, wie das native Gewebe besitzt. Hierfür kommen unterschiedliche Materialien wie bspw. Kollagen oder Fibrinogen zum Einsatz (Waters, et al., 2012). Humanbasierte Lungen-in-vitro-Modelle sind bereits heutzutage in der Lage ethisch umstrittene Tierversuche sowie klinische Studien zu ersetzen. Die Nutzung von dreidimensionalen Zellkulturen gewinnt hierbei immer mehr an wissenschaftlicher Bedeutung. Der Vorteil einer Zellkultur gegenüber anderen bereits etablierten Modellen besteht in der Robustheit, Reproduzierbarkeit sowie Hochdurchsatzfähigkeit. Die strenge Kontrolle der zellulären Mikroumgebung ermöglicht dabei eine Anpassung der Eigenschaften an die physiologischen und pathologischen Gegebenheiten im Patienten, wodurch eine gute *in vivo* Ähnlichkeit geschaffen werden kann. So können Zellkulturen, wie bspw. die humane Lungenkarzinomzelllinie A549 bereits heutzutage zur Bewertung der Arzneimittelsicherheit verwendet werden (Barosova, et al., 2021). Allerdings wurden in den vergangenen Jahren noch weitaus mehr authentische Lungen-in-vitro-Modelle entwickelt, wobei jedes System seine eigenen Vor- und Nachteile mit sich bringt. Lunge-on-Chip-Systeme sind bspw. nicht nur in der Lage die zelluläre Mikroumgebung der Lunge, sondern auch die dynamische Bewegung während des Atmens zu rekonstruieren. Sie gehören daher zu den fortschrittlichsten Modellen, die bisher entwickelt wurden und werden heutzutage bereits für Wirkungs- und Toxizitätsstudien von Arzneimitteln verwendet (Nossa, et al., 2021).

1.3.1 Vergleich Submers- und ALI-Kultur

Die Submerskultur ist die klassische Kultivierungsmethode von Zellen, welche lange Zeit für die Toxizitätsbewertung von Pharmaka verwendet wurde. Für die Erzeugung einer Submerskultur werden die Zellen in die Vertiefungen einer well Platte ausgesät und mit Kultivierungsmedium überschichtet. Die Zellen haben dabei keinen Kontakt zur Umgebungsluft. Sobald sich die Zellen vermehrt haben, sind diese entdifferenziert und haben einen konfluenten Monolayer ausgebildet. Der Vorteil einer Submerskultur besteht in der einfachen Handhabung sowie hohen Reproduzierbarkeit und Kosteneffizienz (Klein, et al., 2021). Allerdings führt das Vorhandensein eines einzigen Zelltyps, der Verlust gewebespezifischer Eigenschaften und das Fehlen struktureller Merkmale sowie der zellulären Differenzierung zu einer verminderten

Aussagekraft. Darüber hinaus sind zweidimensionale Modelle mit einer geringen Zellproliferation und einer hohen Seneszenz verbunden (Cao, et al., 2020). Bei einer ALI-Kultur werden die Zellen demhingegen in Transwell-Einsätzen auf einer mit Kollagen beschichteten mikroporösen Membran ausgesät und sowohl von unten als auch von oben mit Medium überschichtet. Sobald sich eine konfluente Zellschicht ausgebildet hat, erfolgt der Airlift, hierfür wird das Medium des oberen Kompartiments verworfen, sodass die Zellen der Umgebungsluft ausgesetzt sind (Klein, et al., 2021). Der für die Erzeugung einer ALI-Kultur verwendete semipermeable Membranträger, trennt das entstehende Lungenepithelgewebe physisch von dem darunter befindlichen Medium und ermöglicht gleichzeitig die Entstehung einer basalen und einer apikalen Seite. Auf der apikalen Seite werden die Zellen der Umgebungsluft ausgesetzt und gleichzeitig mit Sauerstoff versorgt, wodurch die Differenzierung gefördert wird (Bebök, et al., 2001). Auf der basalen Seite erfolgt durch Diffusion, die Ernährung der Zellen mit den im Medium befindlichen Nährstoffen und Medienzusätzen. Diese zweiphasigen Kultivierungsbedingungen ermöglichen die Vermehrung und Differenzierung menschlicher Bronchialepithelzellen, wodurch sich eine polarisierte und gewebeähnliche Struktur ausbildet, welche der nativen apikal-basalen Morphologie des Atemwegsepithels entspricht. So befinden sich auf der basalen Seite überwiegend Basalzellen, während auf der apikalen Seite hauptsächlich Flimmer- und Becherzellen vorzufinden sind (Bals, et al., 2004). Des Weiteren erfolgt während der Differenzierung die Sezernierung von Muzin, welcher sich auf der apikalen Seite ablagert (Cozens, et al., 2018). Zahlreiche Experimente haben gezeigt, dass ALI-Kulturen im Gegensatz zu herkömmlich verwendeten Submerskulturen deutlich höhere Expressionsmuster an basalbezogenen Genen sowie an Genen die am Zellzyklus und an der Proliferation beteiligt sind, aufweisen. Diese gesteigerten Expressionen führen einerseits zu einem erhöhten Anteil von Epithelzellen und andererseits zu *in vivo* ähnlicheren Eigenschaften (Cao, et al., 2020). Zudem ist die Erzeugung vergleichsweise kostengünstig, benutzerfreundlich und in der Literatur etabliert. Ein weiterer Vorteil besteht in der Verwendung chemisch definierter Medien, welche die Chargenvariabilität senken und gleichzeitig die Reproduzierbarkeit gewonnener Ergebnisse verbessern. Darüber hinaus sind ALI-Modelle besonders robust und können aufgrund ihrer apikalen Seite mit jeglichen Fremdstoffen inhalativ in Kontakt kommen, ohne dabei in ihrer Funktion beeinträchtigt zu werden (Loret, et al., 2016). Der Nachteil von ALI-Kulturen besteht in der fehlenden Validierung und Standardisierung verwendeter Verfahren, wodurch verschiedene Studien nicht miteinander vergleichbar sind. Allerdings ist besonders die Standardisierung eines Modells

ausschlaggebend, um von Zulassungsbehörden und der pharmazeutischen Industrie akzeptiert zu werden. Außerdem ist die Erzeugung einer gut differenzierten ALI-Kultur ein langwieriger Prozess und nicht in jedem Labor realisierbar. Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass die ALI-Kultur ein geschlossenes System darstellt und der entstehende Schleim nicht wie bei einer echten Lunge direkt abtransportiert werden kann, sondern sich ansammelt, wodurch die Barrierefunktion und andere messbare Endpunkt in ihrer Aussagekraft negativ beeinflusst bzw. verfälscht werden (Cao, et al., 2020).

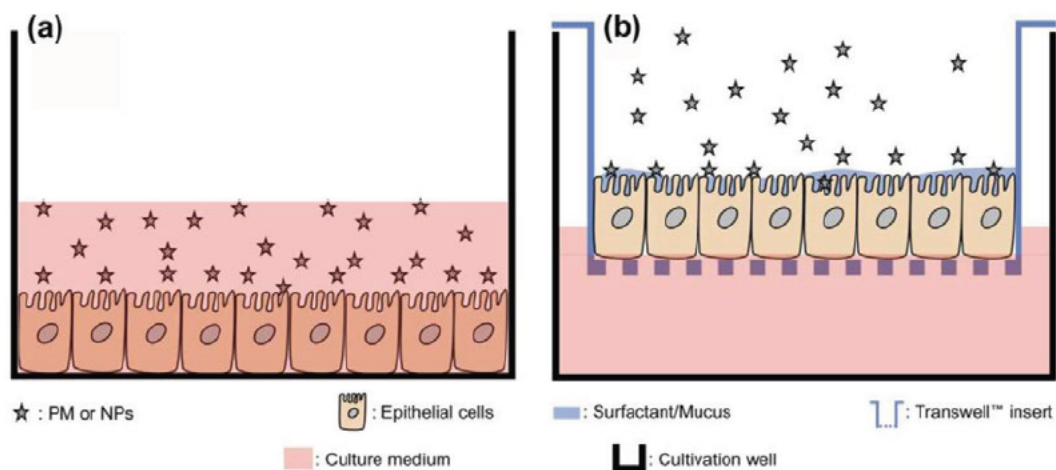


Abbildung 2: Vergleich von Submers- und ALI-Kultivierung

Darstellung (a) zeigt eine Submerskultur von Epithelzellen innerhalb einer well Platte. Abbildung (b) stellt eine ALI-Kultur von Epithelzellen innerhalb eines Transwell-Einsatzes zur Aerosolexposition dar. Quelle: Klein, et al., 2011, Seite 1520

Die ersten organotypischen ALI-Modelle wurden in den späten 1980er Jahren erzeugt. Die Abkürzung ALI steht dabei für „Air-Liquid-Interface“ und bedeutet auf Deutsch so viel wie Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche. Die ALI-Kultur ermöglicht als dreidimensionales In-vitro-Modell die funktionelle und zuverlässige Reproduktion des menschlichen Atemwegsepithels. Ein gut differenziertes Modell wird durch die Ausbildung einer pseudostratifizierten Zellschicht sowie einer guten Barrierefunktion gekennzeichnet. ALI-Kulturen kamen bereits für zahlreiche wissenschaftliche Fragestellungen zum Einsatz. So wurden sie bspw. dafür verwendet die physiologischen und pathologischen Reaktionen des Respirationstrakts sowie die Wechselwirkungen zwischen den Epithelzellen zu untersuchen. Darüber hinaus wurde das Modell bereits für die Untersuchung zahlreicher Atemwegserkrankungen verwendet. Dabei konnte gezeigt werden, dass die ALI-Kultur mit allen wissenschaftlich relevanten Substanzen, wie Aerosolen, Dämpfen und Infektionserregern in Kontakt kommen kann, ohne dass die Aussagekraft des Modells beeinträchtigt wird (Loret, et al., 2016).

1.3.2 Beurteilung der Qualität einer ALI-Kultur

Die ALI-Kultur stellt ein einzigartiges System zur Rekonstruktion der Lungenphysiologie *in vitro* dar. Zur Bewertung der Qualität des jeweiligen Modells ist es daher möglich, gewebespezifische Endpunkte zu messen. Darunter versteht man bspw. die Barrierefunktion, die Morphologie oder die Ionenkanalphysiologie. All diese Eigenschaften dienen zur Quantifizierung der *in vivo* Ähnlichkeit des Modells und sind gleichzeitig für dessen Eigenschaften ausschlaggebend (Cao, et al., 2020). Für die Quantifizierung der Barrierefunktion und der epithelialen Polarisierung einer *in vitro* erzeugten Epithelschicht können unterschiedliche Messmethoden, wie bspw. die Bestimmung des transepithelialen elektrischen Widerstandes oder der parazellulären Permeabilität zum Einsatz kommen (Strengert & Knaus, 2011). Für die Bestimmung des TEER kann entweder ein Voltohmmeter oder eine Ussing-Kammer verwendet werden. Der TEER wird am häufigsten für die Quantifizierung der epithelialen Integrität verwendet, welche innerhalb der Epithelschicht von den Tight Junctions aufrechterhalten wird. Eine veränderte Gewebeintegrität wird oftmals durch wechselhafte Umwelteinflüsse hervorgerufen, was wiederum zu einem veränderten Ionenfluss führt, welcher sich letztendlich in dem elektrischen Widerstand oder der Impedanz widerspiegelt (Srinivasan, et al., 2015). Ist eine Kultur gut differenziert, bildet diese eine Barrierefunktion mit einem Widerstand von über $200 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Die Einheit ergibt sich aus der umgekehrten Proportionalität zwischen Widerstand und der Membranfläche (PromoCell, 2021). Um die Dynamik der Tight Junctions zu kontrollieren bietet es sich zudem an visuelle Werkzeuge, wie bspw. die konfokale Mikroskopie zu verwenden (Buckley, et al., 2018). Um die Gewebemorphologie des entstandenen In-vitro-Modells untersuchen zu können und somit Hinweise über Veränderungen und Wechselwirkungen von einzelnen Zelltypen zu erhalten, bietet es sich außerdem an eine immunhistochemische Färbung durchzuführen (Xiong, et al., 2018).

1.3.3 Vergleich Mono- und Kokultursysteme

Es existieren unterschiedliche Kultivierungssysteme für Zellen *in vitro*. Hierbei unterscheidet man zwischen Mono- und Kokultursystemen. Für beide Methoden können sowohl Primärzellen als auch Zelllinien verwendet werden, wobei ersteres die arbeitsintensivere sowie zeitaufwendigere Variante darstellt. Das Monokultursystem ist dabei die klassische Kultivierungsmethode *in vitro*, bei der nur ein einziger Zelltyp betrachtet wird. Solche Systeme wurden bereits für zahlreiche toxikologische Fragestellungen verwendet, um bspw. die

Aufnahme und toxische Wirkung von Partikeln zu untersuchen. Allerdings ist dieses Modell nicht in der Lage, Zell-Zell-Interaktionen und somit die *in vivo* Situation authentisch zu rekonstruieren. Um diese Nachteile zu umgehen, wurden Kokultursysteme entwickelt, wobei mindestens zwei verschiedene Zelltypen zusammen kultiviert werden. Der Vorteil eines solchen Systems besteht in der zellulären Kommunikation sowie dem besseren Verständnis von Entzündungsprozessen. So ist es bspw. möglich, komplexe Modelle bestehend aus Epithel- und Immunzellen zu erzeugen, wodurch inhalationstoxikologische Studien durchgeführt werden können (Klein, et al., 2011). Zudem bestehen die meisten biologische Gewebe aus mehreren Zelltypen, wodurch eine Kokultur die realistischere der beiden vorgestellten Kultivierungsmethoden darstellt. Allerdings ist die Entwicklung einer Kokultur sehr zeitaufwändig und herausfordernd, da das optimale Zellverhältnis sowie die richtige Zusammensetzung des Mediums erst ermittelt werden müssen. Zudem ist es nicht immer möglich für jeden Zelltyp die optimalen Kultivierungsbedingungen zu schaffen, weshalb Variationen zwischen Serummenge und CO₂-Anteil oftmals die bestmögliche Lösung darstellen (Agu, et al., 2001).

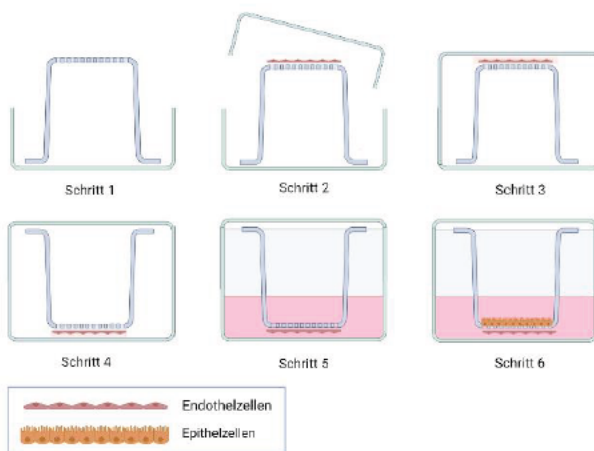


Abbildung 3: Erzeugung einer Kokultur zur Rekonstruktion der Lungenphysiologie

Für die Kokultur des Atemwegsepithels werden Endothelzellen auf invertierten und mit Kollagen beschichteten Transwell-Einsätzen ausgesät und für 2 Stunden adhärirt. Anschließend werden die Einsätze herumgedreht und Epithelzellen ausgesät. Das umliegende Well wird anschließend mit Medium befüllt und die Zellen bis zur Konfluenz kultiviert. Quelle: erstellt mittels Biorender, in Anlehnung an Wisniewska-Kruk, et al., 2012, Seite 183

Am häufigsten werden bei Gewebemodellen Kokulturen in Form eines Barrieremodells realisiert. Dabei gilt der generelle Aufbau: eine Membran sitzt in der Mitte und wird beidseitig mit unterschiedlichen Zelltypen besiedelt. Die Barrieremembran enthält Poren, damit die Zellen miteinander interagieren und kommunizieren können. Die verwendete Membran kann synthetischen oder natürlichen Ursprungs sein (Wisniewska-Kruk, et al., 2012). In der vorliegenden Arbeit soll eine Barrieremembran aus Kollagen verwendet werden.

1.4 Kollagen Typ I

Kollagen ist das wichtigste strukturgebende Protein im menschlichen Organismus. Es macht etwa ein Viertel des Gesamtproteingehalts aus und ist wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix und des Bindegewebes. Aufgrund des Kollagenpolymorphismus existieren mindestens 26 verschiedene Kollagentypen, welche sich genetisch voneinander unterscheiden und verschiedene Funktionen innerhalb des Organismus übernehmen (Sagi & Afratis, 2019). Die faserigen Eigenschaften des Biopolymers sind einerseits für die Formgebung und andererseits für die mechanische Stabilität von Organen ausschlaggebend. Besonders in Haut, Sehnen, Bändern, Plazenta, Dentin und Knochen kann man Kollagen finden. Es besitzt neben der Funktion als Stabilisator noch viele weitere wichtige Eigenschaften. So verleiht es den Knochen eine gewisse Festigkeit und Bruchsicherheit, während Sehnen besonders elastisch sind und die Fähigkeit zur Energiespeicherung besitzen. Kollagen kann aus der Haut oder anderen Geweben extrahiert und für die Herstellung kollagenbasierter Produkte, wie bspw. Folien oder Fäden verwendet werden. Besonders die Lebensmittel-, Kosmetik- und Arzneimittelindustrie ist an solchen Erzeugnissen interessiert (Bräumer, 1974). Für die Anwendung in der Zellkulturtechnik wird Kollagen hauptsächlich in Form von Membranen, Fäden oder porösen Scaffolds hergestellt.

1.4.1 Struktur

Kollagen Typ I ist optisch betrachtet eine Faser. Untersucht man die Struktur allerdings mit Hilfe eines Elektronenmikroskops fällt auf, dass Kollagen sich aus vielen einzelnen Fibrillen zusammensetzt, welche wiederum aus Kollagenmolekülen aufgebaut sind. Kollagenmoleküle werden durch drei sich umeinander windende Peptidketten gebildet, wodurch die für das Kollagen bekannte rechtsgängige Tripelhelix entsteht. Jede Peptidkette bildet hierbei eine eigene Schraube, welche sich anschließend mit den anderen beiden Ketten um die gemeinsame Hauptachse anordnet. Zur Stabilisierung der Helix, sind die einzelnen Ketten über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbunden (Sagi & Afratis, 2019). Damit ein funktionsfähiges Kollagenmolekül ausgebildet werden kann, muss ein definiertes Aminosäuremotiv eingehalten werden. Hierbei ist es wichtig, dass sich an jeder dritten Stelle die Aminosäure Glycin befindet, die zwei dazwischen liegenden Aminosäuren können immer unterschiedlich besetzt werden und somit in ihrer Anordnung stark variieren. Die Glycinreste zeigen in das Innere der Helix, während die Seitenketten nach außen ragen (Fratzl, 2008). Die Festigkeit und mechanische Stabilität der Helix ist hauptsächlich auf den Prolin- und

Hydroxyprolin-Gehalt zurückzuführen, wobei die Verteilung entlang der Kette entscheidend ist (Kühn, 1974).

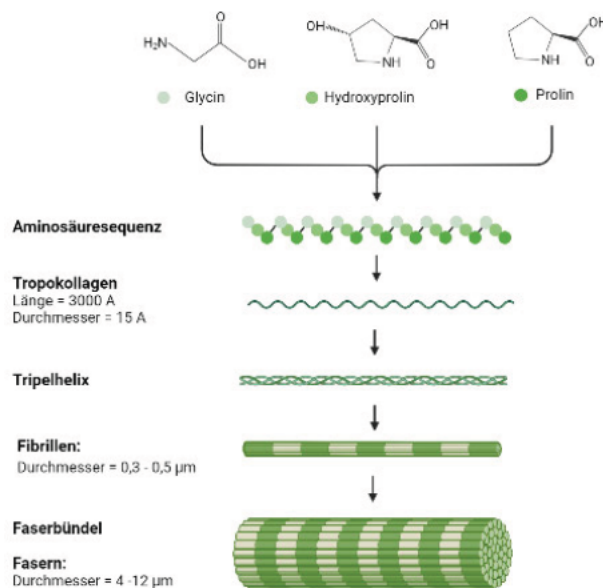


Abbildung 4: schematische Darstellung der Struktur von Kollagen

Die Struktur des Kollagens setzt sich aus einzelnen Aminosäuresequenzen zusammen, welche Peptidketten ausbilden. Der Gehalt an Prolin und Hydroxyprolin ist dabei für die Stabilität des Kollagens verantwortlich. Jede dritte Stelle ist mit Glycin besetzt und zeigt in das Innere der Helix. Die Peptidketten bilden das Tropokollagen. Sobald sich drei Ketten rechtsgängig umeinander winden, entsteht eine Tripelhelix. Die einzelnen Helices bilden über stabile Wasserstoffbrücken, fibrilliertes Kollagen aus, welches sich zu Faserbündeln zusammen lagert.

Quelle: erstellt mittels Biorender, in Anlehnung an Vogler, 2009, Seite 8

1.4.2 Erzeugung von dreidimensionalen Kollagenmatrizen für das Tissue Engineering

Die Verwendung von dreidimensionalen Kollagenmatrizen für die *in vitro* Forschung gewinnt zunehmend an wissenschaftlicher Bedeutung. Sie sind in der Lage die zelluläre Umgebung *in vivo*, das Zellwachstum und gleichzeitig die Wechselwirkungen zwischen den Zellen und der extrazellulären Matrix unter physiologisch normalen oder erkrankten Bedingungen authentisch nachzubilden (Even-Ram & Yamada, 2005). Für die Erzeugung von In-vitro-Modellen ist es wichtig, die Herstellung des jeweiligen Kollagentyps, die Konzentration und die dreidimensionale Kollagenpolymerisation zu berücksichtigen. All diese Eigenschaften sind für die Zellmorphologie und Proteinlokalisierung ausschlaggebend und beeinflussen somit auch die Korrelation zwischen den Zellen und der extrazellulären Matrix, wodurch sie eine essentielle Bedeutung innerhalb des Organismus übernehmen (Artym & Matsumoto, 2011). Hauptsächlich wird Kollagen in Form eines Hydrogels verwendet. Ausgangsmaterial ist säurelösliches Kollagen, welches durch die unmittelbare Extraktion von Bindegewebe gewonnen und mittels geeigneter Puffer zur Polymerisierung gebracht wird. Dabei entstehen Kollagenfibrillen (Vogler, 2009). Die Zusammensetzung und Morphologie der Fibrillen ist vom pH-Wert, der Ionenstärke, der Phosphatmenge, dem verwendeten Puffer und der Temperatur abhängig, wodurch unterschiedliche Matrizen mit verschiedenen Eigenschaften entwickelt werden können. Auch die Dichte und Porengröße des Kollagennetzwerkes kann variieren und ist auf die Konzentration und Menge der verwendeten Kollagenmoleküle zurückzuführen

(Gelman, et al., 1979). Wird ein Kollagenhydrogel getrocknet, entsteht eine Kollagenmembran. Für die Zellkulturtechnik sind auch Kollagenbeschichtungen von wissenschaftlichem Interesse. Hierfür wird säurelösliches Kollagen in löslicher Form auf eine Oberfläche aufgebracht, an der die Kollagenmoleküle adsorbieren, wodurch eine Anhaftung der Zellen ermöglicht wird. Im Gegensatz zur Membran ist die Kollagenbeschichtung nicht langzeitstabil und zudem nicht in der Lage die mechanischen Eigenschaften einer natürlichen EZM zu rekonstruieren. Das humane Lungenepithelgewebe setzt sich natürlicherweise aus Kollagen Typ IV zusammen, allerdings ist Kollagen vom Typ I deutlich besser untersucht, weshalb dieses bevorzugt für die *in vitro* Forschung verwendet wird.

2 Zielstellung

Das Ziel dieser Arbeit, besteht in der Etablierung eines in der Literatur beschriebenen dreidimensionalen Lungengewebemodells im zellbiologischen Labor des FILK. Das Modell soll auf einer Luft-Flüssigkeits-Grenzflächen-Zellkultur beruhen. Im Mittelpunkt des Modells steht ein funktionelles Lungenepithel, dass durch die Kultivierung von Lungenepithelzellen heranwächst. Nach der Etablierung sollen verschiedene Komponenten hinzugefügt werden, um das Modell noch physiologischer zu gestalten.

Die Funktionalität des Lungenepithels setzt eine geschlossene Zellschicht voraus, weshalb zunächst, die optimalen Kultivierungsbedingungen für die Lungenepithelzellen ermittelt werden. Im Modell soll die Lungenkarzinomzelllinie A549 und die humanen primären Bronchialepithelzellen HBEpC getestet werden. Als Anhaftungssubstrat dienen mit Kollagen beschichtete Transwell-Einsätze. Für die Erzeugung der Luft-Flüssigkeitsgrenze werden die Zellen nach Erreichen der Konfluenz auf eine ALI-Kultur umgestellt. Dafür muss der Einfluss unterschiedlicher Medien-Varianten und Waschschriffe untersucht werden. Hierbei soll zwischen Zelllinien und Primärzellen differenziert werden. Die Funktionalität des Epithels soll anschließend anhand der Produktion von Surfactant und der Ausbildung einer epithelialen Barriere nachgewiesen werden. Des Weiteren führt die langfristige Kultivierung von Epithelzellen an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche zur Expression spezieller in der Lunge vorkommender Markerproteine, welche mithilfe von Immunfluoreszenzfärbungen und einer qRT-PCR quantifiziert werden sollen. Außerdem wird untersucht, ob das Modell nach einer Behandlung mit TGF- β 1 mit einer erhöhten Durchlässigkeit reagiert, wie es für das Lungenepithel *in vivo* beschrieben ist. Zur Steigerung der physiologischen Relevanz soll nachfolgend der Einfluss einer Kokultivierung mit der Endothelzelllinie EA.hy926 bzw. den primären Endothelzellen HUVEC auf die Ausbildung des Epithels untersucht werden. Die letzte Aufgabe dieser Arbeit besteht darin, erste Untersuchungen zur Realisierung einer mechanischen Belastung der Zellen durchzuführen. Für die Rekonstruktion der Atembewegung kommt ein Gerät zum Einsatz, das vom Fraunhofer IWS entwickelt wurde. Diesbezüglich bestand das Ziel darin, die prozentuale Auslenkung der erzeugten Kollagenmembranen zu berechnen und zeitgleich erste Dehnungsexperimente mit den verschiedenen Lungenzellen durchzuführen. Hierbei sollen die Auswirkungen der mechanischen Stimulation auf das Zytoskelett der Zellen mittels verschiedener Färbemethoden sichtbar gemacht werden. Es

existiert bereits eine Vielzahl von erfolgreichen Lungen-in-vitro-Modellen für die Arzneimittelforschung. Allerdings sind die bisher entwickelten Modelle in ihrer Aussagekraft beschränkt und führen in toxikologischen Studien immernoch zu falschen Ergebnissen. Ziel ist es deshalb, ein Lungen-in-vitro-Modell mit besonders komplexer Umgebung zu entwickeln, welches noch realistischer an die Situation am Menschen angepasst ist. Hierfür sollen alle essentiellen Komponenten der Alveolen: EZM-Substrat (Kollagen Typ I), verschiedene Zelltypen (Epithel- und Endothelzellen), eine Luft-Flüssigkeitsgrenze sowie die mechanische Belastung während des Atmens miteinander vereint werden. Dadurch ist es möglich eine ideale Darstellung der pulmonalen Mikroumgebung *in vitro* zu realisieren.

3 Material

3.1 Chemikalien

Name	Hersteller	Art.-Nummer	Charge
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid (EDC-HCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG	2156.2	412325368
Essigsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG	3738.2	440302260
Fluorescein sodium salt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	F6377	1003484029
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH + Co. KG	6771.1	289283616
Salzsäure 0,01 mol/l (HCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG	P708.2	237653428

3.2 biologische Reagenzien

Name	Hersteller	Lot-Nummer	Cat.-Nummer
A549	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	564378	86012804
alpha Tubulin (B-7) mouse monoclonal IgG _{2a}	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	H0122	sc-5286
Anti-Maus-IgG Fab 2 Alexa Fluor (R) 488	Cell Signaling Technology, Inc.	12	4408
Anti-Rabbit-IgG (whole molecule)-FITC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	SLBX2002	F0328
Anti-SFTPC Antibody, clone 3F18 ZooMAb® Rabbit Monoclonal	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Q3439970	ZRB1496
AQP5 (D-7) mouse monoclonal IgG ₁	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	F0822	sc-514022
Bovine Serum Albumin Solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	SLBT3222	A7979
EA.hy926	ATCC (American Type Culture	70030244	CRL-2922
HBEpC	PromoCell GmbH	459Z013	C-12640
Human TGF- β 1	PeproTech, Inc.	0220354-1 B1220	100-21C- 100UG
HUVEC	Lonza Group AG	636880	C2519A
Normal Goat Serum	Jackson ImmunoResearch	165462	005-000-121
SLK 51	Sven Kunze, FILK Freiberg, am 17.10.2022	-	-
TopVision Agarose	Thermo Fisher Scientific Inc.	00636880	R0491
ZO-1 Polyclonal Antibody	Thermo Fisher Scientific Inc.	XK361219	40-2200

3.3 TaqMan Sonden

Name	Hersteller	Assay ID	Lot-Nummer	Cat.-Nummer
AQP5	Thermo Fisher Scientific Inc.	Hs00387048_m1	P220819-006 B01	4331182
CDH1	Thermo Fisher Scientific Inc.	Hs01023895_m1	P221007-005 A10	4331182
GAPDH	Thermo Fisher Scientific Inc.	Hs02786624_g1	P230129-001 C05	4331182
KI67	Thermo Fisher Scientific Inc.	Hs01032443_m1	P200813-002 A11	4331182
MUC1	Thermo Fisher Scientific Inc.	Hs00159357_m1	P210113-008 E11	4331182

3.4 Primersequenzen

Gen	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	PCR-Produkt
AQP5	unbekannt	unbekannt	150 bp
CDH1	unbekannt	unbekannt	170 bp
GAPDH	unbekannt	unbekannt	320 bp
KI67	unbekannt	unbekannt	140 bp
MUC1	unbekannt	unbekannt	170 bp

3.5 Kits

Name	Hersteller	Lot-Nummer	Cat.-Nummer
Colorimetric Cell Viability Kit III (XTT)	PromoCell GmbH	467P014	PK-CA20-300-1000
RiboPure™ Kit	Thermo Fisher Scientific Inc.	01274660	AM1924

3.6 Enzyme und Lösungen

Name	Hersteller	Lot-Nummer	Cat.-Nummer
0,04 % Trypsin/ 0,03 % EDTA	PromoCell GmbH	495M261	C-41010
6x DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific Inc.	00799325	R0611
Accutase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	-	A6964
Alcian Blue 8GX	MP Biomedicals, LLC	S3399	152624
Bacillo® AF	BODE Chemie GmbH	465986	973385
BCP-Phase Separation Reagent	Molecular Research Center, Inc.	923	BP151
Buffer EB	QIAGEN GmbH	169019790	1014608
Calcein AM	Biotium	10C1123-1107112	148504-34-1
CellMas™ Deep Red plasma membrane stain	Thermo Fisher Scientific Inc.	2528094	C10046
DAPI	Thermo Fisher Scientific Inc.	D1306	D1306
Dextran, 70.000 MW	Thermo Fisher Scientific Inc.	2406650	D1862
Eosin Y solution	ORSAtec GmbH	201612295	6.00.05.0003.0 7.04.01

Fluoromount™ Aqueous Mounting	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	SLCG4936	F4680
Gene Ruler Low Range DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc.	01137131	SM1191
Mayer's hemalum solution	ORSAtec GmbH	201612293	1.09249.0500
Nuklease freies Wasser	Thermo Fisher Scientific Inc.	01182279	LT-022411
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	SZBE239AV	158127
Phalloidin- Tetramethylrhodamin B-Isothiocyanat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	SLB08529	P1951
Poly-Freeze Einbettungsmedium 120 ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	SLBW5102	P0091
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	MKBV9923V	P4864
SERVA DNA Stain G	SERVA Electrophoresis GmbH	190661	39803.01
SuperScript™ IV VILO™ Mastermix mit ezDNase™-Enzym	Thermo Fisher Scientific Inc.	01244176	11766050
TaqMan™ Fast Advanced Master Mix	Thermo Fisher Scientific Inc.	2659540	4444556
TBE-Puffer	hergestellt durch Josefine Boden, FILK Freiberg, am 05.07.2023		
TNS	PromoCell GmbH	495M208	C-41110
TRI Reagent™ Solution	Thermo Fisher Scientific Inc.	00988700	AM9738
Triton® X-100	Thermo Fisher Scientific Inc.	10125065	HFH10
Trypsin/EDTA 0,05%	Lonza Bioscience	2477320	CC-5012
Twenn®20	AppliChem GmbH	0V000906	A1389,0500

3.7 Medien und Zusätze

Name	Hersteller	Lot-Nummer	Cat-Nummer
Airway Epithelial Cell Basal Medium	PromoCell GmbH	494M304	C-21260
Airway Epithelial Cell Growth Medium	PromoCell GmbH	493M005	C-21060
Air-Liquid Interface Medium (ALI- Airway)	PromoCell GmbH	495M384	C-21080
Cryo-SFM	PromoCell GmbH	497M114	C-29910
DMEM high Glucose with L- Glutamine	ATCC	80614221	30-2002
Dulbecco's Modified Eagle's Medium/ Nutrient Mixture F-12	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	RNBK4890	D5796
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	RNBL3013	D8537

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline with MgCl ₂ and CaCl ₂	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	RNBK9927	D8662
EBM™ -2 Endothelial Cell Growth Basal Medium	Lonza Group AG	0001111882	CC-3156
EGM™ -2 SingleQuots™ Supplements	Lonza Group AG	0001111882	CC-4176
Fetal Bovine Serum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	0001642052	F7524
Hepes Buffered Saline Solution	Lonza Group AG	0001083936	CC-5024
RPMI 1640 mit L-Glutamine und 25 mM HEPES	Biowest	MS01JN1004	L0495
SupplementMix Airway Epithelial Cell Growth Medium	PromoCell GmbH	493M248	C-39165
SupplementMix Air-Liquid Interface Medium	PromoCell GmbH	491M276	C-39180
SupplementPack Airway Epithelial Cell Growth Medium	PromoCell GmbH	494M001	C-39160

3.8 Material

Name	Hersteller	Lot-Nummer	Cat.-Nummer
Netwell™ Insert 440 µm Polyester Mesh 15 mm Insert	Corning Incorporated	33322006	3487
Nunc™ Lab-Tek™ Kammerschiebersystem	Thermo Fisher Scientific Inc.	13455902804	177402
Penta 20 ml Luer Lock	Pentaferte Italia s.r.l.	24B04	002022720F
Spritzenvorsatzfilter, Luer-Lock, PES-Membran, Porengröße 0,2 µm	Dr. Ilona Schubert-Laborfachhandel, Inh. Claudia Neumann	211119103	83.1826.001
Superfrost™ Plus Adhesion Microscope Slides White Tab	New Erie Scientific LLC	-	J1800AMNZ
ThinCerts™-TC Einsätze, 12 well, Porengröße 3,0 µm	Greiner Bio-One International GmbH	22090416	665630
Zellkulturflasche, 250 ml, 75 cm ² , PS, transparent, CELLSTAR®	Greiner Bio-One International GmbH	E221138C	658175
Zellkulturtestplatte, 12 well, PS, transparent, CELLSTAR® TC	Greiner Bio-One International GmbH	E22103D6	665165
Zellkulturtestplatte, 24 well, PS, transparent, CELLSTAR® TC	TPP Techno Plastic Products AG	20210289	92124
Zellkulturtestplatte, 96 well, PS, schwarz, CELLSTAR® TC	Greiner Bio-One International GmbH	E15113GK	655086
Zellkulturtestplatte, 96 well, PS, transparent, CELLSTAR® TC	Greiner Bio-One International GmbH	E21043NH	655180

3.9 Geräte

Gerät	Name	Hersteller	Seriennummer
Analysenwaage	BP221S	Sartorius AG	11503953
CO ₂ -Inkubator	Heracell™ VIOS 250i	Thermo Fisher Scientific Inc.	51033597
Dunkelkammer	UVP solo Elite	Analytik Jena GmbH+Co. KG	87230036
Elektrophoresekammer	VWR®PerfectBlue Mini S (Model: 700- 0741)	VWR International GmbH	041578
Gefrierbehälter	Mr. Frosty™	Thermo Fisher Scientific Inc.	F18844-0000
Gefriermikrotom	HM560	MICROM GmbH	20504
Laser-Scanning- Mikroskop	LSM 800	Carl Zeiss Microscopy GmbH	2640000104
Lichtmikroskop	Nikon Eclipse TS 100	Nikon Europe B.V.	565169
Nanophotometer	P330	Implen GmbH	5387
pH Messgerät	FiveEasy	Mettler-Toledo GmbH	B204647529
Platten-Reader	SpectraMax® i3x	Molecular Devices, LLC.	36370-1074
Präzisionswaage	PCB 350-3	Kern & Sohn GmbH	WD210009675
Pumpe	MPSstimulus	Fraunhofer-Institut für Werkstoff- und Strahltechnik (IWS)	2620/41680/ST GPST/22/09
Sicherheitswerkbank	ENVAIR eco®safe Comfort	CARLO ERBA Reagents GmbH	SCS1-5119
Thermoblöcke	Thermomixer comfort	Eppendorf AG	5355BJ856818
Thermocycler	CFX96™ Real- Time System	Bio-Rad Laboratories GmbH	CC003957
Trockenschrank	FP 115	BINDER GmbH	11-03777
Überkopfschüttler	neoLabLine Rotator	neoLab Migge GmbH	7-0045
Wasserbad	PURA 10	JULABO GmbH	9550510
Zählkammer	Neubauer Improved	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG	HCT40441702
Zentrifuge	UniCen MR	Herolab GmbH Laborgeräte	112802211406 0
Zentrifuge	Sigma 4-16KS	Sigma Laborzentrifugen GmbH	162827
Zentrifuge	MIKRO 185	Andreas Hettich GmbH & Co.KG	0000760-00

4 Methoden

4.1 Zellkultur

Für alle Experimente kamen die primären Nabelvenen-Endothelzellen HUVEC, die humane Lungenkarzinomzelllinie A549, die somatische Hybridzelllinie EA.hy926 sowie die humanen primären Bronchialepithelzellen HBEpC zum Einsatz. Zu Beginn wurden alle Zellen wie in Punkt 4.1.1 beschrieben aufgetaut und in ihrem jeweiligen Kulturmedium resuspendiert. Die Medien wurden zuvor mit ihren spezifischen Zusätzen versetzt und im Trockenschrank auf 37 °C temperiert. Die konkrete Zusammensetzung der einzelnen Medien und deren Medienbezeichnungen sind der Tabelle 1 zu entnehmen. Solange die Zellen nicht mit PFA fixiert wurden, erfolgten alle Arbeitsschritte unter einer sterilen mikrobiologischen Sicherheitswerkbank, um mögliche Kontaminationen zu verhindern. Zudem wurden alle Materialien mit 70 %-igen Ethanol desinfiziert. Für die Kultivierung der A549 wurde CM-Medium bestehend aus RPMI 1640 und 10 % FBS verwendet. Die Kultivierung der Primärzellen HUVEC erfolgte in EBM-Vollmedium, für die Hybridzelllinie EA.hy926 kam DMEM-Medium mit 4,5 g/l Glucose sowie 10 % FBS zum Einsatz. Für die Kultivierung der humanen primären Bronchialepithelzellen HBEpC wurde das ALI-Basalmedium verwendet, welches sich aus dem kommerziell erworbenen Airway Epithelial Cell Basal Medium und dem dazugehörigen SupplementPack zusammensetzte. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem CO₂-Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchte. Für alle Experimente wurden die Zellen bei Konfluenzen zwischen 70 % bis 80 % wie in Punkt 4.1.2 abgelöst und in frischem Kulturmedium resuspendiert.

Tabelle 1: Zusammensetzung und Bezeichnungen der Kulturmedien sowie Pufferlösungen

Zellen	Basismedium	Serum	Zusätze	Mediumbezeichnung
A549	RPMI 1640	10 % FBS	-	CM-Medium
EA.hy926	DMEM High Glucose (4,5 g/l), mit L-Glutamin	10 % FBS	-	DMEM (G)-Medium
HBEpC	Airway Epithelial Cell Basal Medium	-	SupplementPack Airway Epithelial Cell Growth Medium	ALI-Basalmedium
HUVEC	EBM™-2 Endothelial Cell Growth Basal Medium	2 % FBS	EGM™-2 SingleQuots™ Supplements	EBM-Vollmedium

Pufferlösung	Zusätze	Bezeichnung
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	-	PBS
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline mit MgCl ₂ und CaCl ₂	Calcium- und Magnesiumchlorid	PBS*

4.1.1 Auftauen und Einfrieren

Die kryokonservierten Zellen wurden bei -196 °C in einem Stickstofftank gelagert. Zum Auftauen wurde das Kryovial im Wasserbad bei 37 °C so lange erwärmt, bis keine Eisklumpen mehr ersichtlich waren. Anschließend wurde eine T-75 Zellkulturflasche mit 13 ml des zuvor vorbereiteten Kulturmediums unter einer sterilen mikrobiologischen Sicherheitswerkbank befüllt. Das aufgetaute Vial wurde mit 70 %-igen Ethanol desinfiziert und anschließend 1000 µl Zellsuspension in die bereits vorbereitete Flasche überführt. Die Flasche wurde bei 37 °C und 5 % CO₂ für 24 Stunden inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel, wobei das alte Medium verworfen und die Flasche mit 14 ml neuem Kulturmedium befüllt wurde. Anschließend wurde die Flasche wieder in den CO₂-Inkubator gestellt und die Zellen bis zur Konfluenz kultiviert.

Für das Einfrieren wurden die Zellen von 4 Flaschen zuerst wie in Punkt 4.1.2 beschrieben mit Hilfe von Trypsin/EDTA bzw. Accutase vom Flaschenboden abgelöst und zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das überschüssige Medium verworfen und das Zellpellet des ersten Falcons in 6,4 ml frischem Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurden die 6,4 ml des ersten Falcons in das zweite Falcon übertragen und das Zellpellet erneut resuspendiert. Dieser Vorgang wurde auch für das dritte und vierte Falcon wiederholt. Dem vierten Falcon wurden nach vollständiger Resuspendierung 10 % DMSO sowie 10 % FBS hinzugefügt. Anschließend wurden jeweils 1000 µl des Gemischs in acht vorbereitete Kryovials übertragen. Die Kryovials wurden anschließend für 24 Stunden in Mr. Frosty bei – 80 °C gelagert und danach in einen Stickstofftank bei – 196 °C überführt. Beim Einfrieren der EA.hy926 war darauf zu achten dem Zellsuspensionsgemisch ausschließlich 5 % FBS und kein DMSO hinzuzufügen.

4.1.2 Splitten und Zellzahlbestimmung

Während der Kultivierung wurde das Medium etwa alle 2-3 Tage gewechselt. Dafür wurde das verbrauchte Medium wie bereits im Punkt 4.1.1 beschrieben abgesaugt und durch 14 ml frisches Kulturmedium ersetzt. Die Zellkulturflaschen wurden täglich unter einem

Lichtmikroskop auf ihre Konfluenz untersucht. Bei Konfluenzen zwischen 70 % - 80 % war es notwendig die Kultur zu splitten. Hierfür wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit jeweils 10 ml und 6 ml PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen vom Flaschenboden wurden für die Zelllinien A549 und EA.hy926 2 ml Trypsin/EDTA (0,05 %) und für die Primärzellen HUVEC jeweils 2 ml Accutase auf den Zellrasen pipettiert und die Flasche für 2,5 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Zum Abstoppen der enzymatischen Reaktion wurde der Zellrasen mehrmals mit 8 ml Kulturmedium gespült. Danach wurde die Zellsuspension in ein 15 ml-Falcon überführt und für 4 Minuten bei 800 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert. Eine Ausnahme stellte die Subkultivierung der humanen Bronchialepithelzellen HBEpC dar, hierfür wurde der Zellrasen mit 10 ml HEPES-gepufferter Salzlösung gewaschen und die Zellen anschließend für 4 Minuten bei Raumtemperatur mithilfe von 2 ml 0,04 % Trypsin/0,03 % EDTA abgelöst. Die enzymatische Reaktion wurde anschließend mithilfe von 4 ml TNS abgestoppt und der Flaschenboden mehrmals gespült. Danach wurde die Zellsuspension in ein 15 ml-Falcon überführt und für 4 Minuten bei 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation verworfen und die Zellen in frischem ALI-Basalmedium resuspendiert. Das Splittingverhältnis der jeweiligen Kultur wurde an die Kultivierungsdauer sowie die Versuchsplanung angepasst. Um ein Splittingverhältnis von bspw. 1:5 zu erreichen, wurden 2 ml Zellsuspension und 12 ml Kulturmedium in eine neue T-75 Zellkulturflasche überführt. Die Flasche wurde anschließend bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Für die Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer Zählkammer vorbereitet. Dafür wurde sowohl die Zählkammer als auch das Deckgläschen angehaucht und aufeinandergesetzt, bis sich auf den Stegen der Kammer Newtonsche Ringe gebildet haben. Daraufhin wurden jeweils 10 µl Zellsuspension auf jedes Zählfeld pipettiert und unter einem Lichtmikroskop bei einer 100-fachen Vergrößerung betrachtet. Für die Bestimmung der Zellzahl wurden jeweils alle 4 Eckquadrate der beiden Zählfelder ausgezählt. Die Zellzahl konnte anschließend mittels folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Zellzahl} \left[\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right] = \frac{\text{Durchschnitt der Zellen pro B - Quadrat} \cdot 1000}{16 \cdot \text{Tiefe} \cdot \text{Fläche} \cdot \text{Verdünnungsverhältnis}}$$

4.1.3 Herstellung einer säurelöslichen Kollagenlösung

Für die Herstellung einer säurelöslichen Kollagenlösung mit einer Konzentration von 2 mg/ml kamen 100 mg SLK 51 und 45 ml einer 0,01 M Salzsäure zum Einsatz, welche für 24 Stunden

bei 6 °C mithilfe eines Überkopfschüttlers gemischt wurden. Anschließend erfolgte die Sterilfiltration der entstandenen Lösung durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm. Die steril filtrierte Kollagenlösung wurde anschließend bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt und für alle Experimente auf Raumtemperatur erwärmt.

4.1.4 Herstellung der Kollagensubstrate

Für die Beschichtung der Transwelleinsätze kam ein Gemisch aus PBS und SLK zum Einsatz, wobei eine Konzentration von 10 µg pro cm² angestrebt wurde. Die Wachstumsoberfläche des 12 well Transwelleinsatzes beträgt 1,131 cm², sodass für die Beschichtung von 10 Wells mit jeweils 500 µl Beschichtungslösung ein Gemisch aus 56 µl SLK und 4943 µl PBS hergestellt wurde. Für die Beschichtung wurden die Einsätze mit Hilfe einer sterilen Pinzette in eine 12 well Platte eingesetzt und 500 µl der Beschichtungslösung in das jeweilige Transwell pipettiert. Daraufhin erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die überschüssige Lösung abpipettiert und die Einsätze unter der Bank für 3 Stunden getrocknet. Um die Eigenschaften der natürlichen EZM nachzuahmen wurden Trans- und Netwells in späteren Versuchen mit einer Kollagenmembran beschichtet. Um eine gute Verbindung zwischen der Kollagenschicht und dem stützenden Polymernetz zu erreichen, wurden die Kollagenmembranen direkt im Trans- oder Netwell erzeugt. Zunächst erfolgte die Herstellung eines Kollagenhydrogels. Dazu wurden die Netwelleinsätze auf einer Silikonunterlage platziert. Das Hydrogel sollte eine Konzentration von 217 µg pro cm² bei einer Wachstumsoberfläche von 1,767 cm² aufweisen. Die hierfür verwendete Kollagenlösung setzte sich aus 4425 µl SLK (1 mg/ml), 885 µl 10xPBS und 61,95 µl NaOH zusammen, von der jeweils 333 µl in das jeweilige Netwell pipettiert wurden. Anschließend wurden die Einsätze zur Induktion der Kollagen-Fibrillierung in den Wärmeschrank bei 37 °C für 45 Minuten überführt. Nach Ablauf der Zeit wurde das entstandene Hydrogel in den Einsätzen, unter einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank bei reduziertem Betrieb über Nacht getrocknet. Nach 24 Stunden wurden jeweils 1000 µl steril filtriertes Wasser auf die entstandenen Membranen pipettiert, um die Salze der Pufferlösung zu entfernen. Das Wasser wurde nach ca. 5 Stunden wieder abgezogen und die Einsätze erneut für 24 Stunden über Nacht unter der Bank, bei reduziertem Betrieb getrocknet. Die Beschichtung der Transwell-Einsätze erfolgte im hängenden Zustand innerhalb einer 12 well Platte. Das Kollagenhydrogel für einen Einsatz setzte sich aus 174,8 µl SLK (1 mg/ml), 35 µl 10xPBS und 2,4 µl NaOH zusammen. Für die Beschichtung wurden die Konzentrationen 217 µg/cm² und 167 µg/cm² bei einer

Wachstumsoberfläche von $1,131 \text{ cm}^2$ an SLK angestrebt. Zur Etablierung einer optimalen Beschichtungsmethode wurden alle Einsätze mit $212 \text{ }\mu\text{l}$ ($217 \text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$) des Kollagenhydrogels beschichtet, woraufhin eine 45-minütige Kollagen-Fibrillierung bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ im Trockenschrank erfolgte. Anschließend wurden die Einsätze unter der mikrobiologischen Sicherheitswerkbank bei reduziertem Betrieb über Nacht getrocknet und am nächsten Tag für 5 Stunden mit $1000 \text{ }\mu\text{l}$ sterilem Wasser gewaschen, um überschüssige Salze zu entfernen. Danach erfolgte ein 24-stündiger Trocknungsschritt. Einige Transwells wurden noch ein zweites Mal mit $164 \text{ }\mu\text{l}$ ($167 \text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$) Kollagenhydrogel überbeschichtet. Der Beschichtung schlossen sich der bereits beschriebene Waschschrift und zwei Trocknungsschritte an. Um die Eigenschaften einer vernetzten Kollagenmembran zu untersuchen, wurden einige Kollagenschichten zusätzlich für 30 Minuten in 2 % EDC bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde das EDC verworfen, die Membranen dreimal für 20 Minuten mit sterilem Wasser gewaschen und anschließend für 24 Stunden getrocknet.

4.1.5 Zellaussaat

Sobald die Einsätze mit SLK beschichtet waren, erfolgte die Zellaussaat, wobei jeweils $500 \text{ }\mu\text{l}$ Zellsuspension in das obere Kompartiment eines Transwell-Einsatzes ausgesät wurden. Bei der Aussaat war darauf zu achten, die Platte so gering wie nur möglich zu bewegen, um ein optimales Ergebnis zu erreichen. Die Platte wurde anschließend für 45 Minuten bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das untere Kompartiment mit jeweils $1500 \text{ }\mu\text{l}$ frischem Kulturmedium befüllt und bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 bis zur vollständigen Konfluenz inkubiert. Es erfolgte alle 2 Tage ein Mediumwechsel. Für die Zellaussaat innerhalb der Netwells wurden diese mithilfe einer sterilen Pinzette von der Silikonmembran in eine 12 well Platte überführt. Das untere Kompartiment wurde mit $500 \text{ }\mu\text{l}$ und das obere Kompartiment mit $400 \text{ }\mu\text{l}$ EBM-Vollmedium befüllt, um die Membran beidseitig zu befeuchten. Anschließend wurde das Medium des oberen Kompartiments abgezogen und durch $600 \text{ }\mu\text{l}$ Zellsuspension ersetzt. Die Einsätze wurden anschließend bis zur Konfluenz bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 inkubiert.

4.1.6 Konfluenzbeurteilung

Die Konfluenzbeurteilung der Zelllinie A549 und der Primärzellen HBEpC erfolgte in Transwell-Einsätzen. Diese wurden zuerst wie in Punkt 4.1.4 beschrieben mit einem SLK-PBS-Gemisch für 30 Minuten beschichtet. Währenddessen wurden die A549 der Passage 49 und die HBEpC der

Passage 5 wie in Punkt 4.1.2 mithilfe von Trypsin/EDTA abgelöst und in 10 ml frischem Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellzahlen der entstandenen Zellsuspensionen mittels einer Neubauer Zählkammer bestimmt und die Volumina der auszusäenden Zellzahlen berechnet. Daraufhin wurden die unterschiedlichen Lösungen bestehenden aus dem jeweiligen Kultivierungsmedium und der vorbereiteten Zellsuspension hergestellt. Die genau verwendeten Volumina sind der Tabelle 2 zu entnehmen. Für die HBEpC wurde das jeweilige Volumen an Zellsuspension herunterzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 500 µl frischem ALI-Basalmedium resuspendiert. Das SLK-PBS-Gemisch wurde von den Einsätzen abgezogen und durch 500 µl der jeweiligen Zellsuspension ersetzt und für 45 Minuten bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Abschließend wurde das umliegende Well mit 1500 µl Kulturmedium befüllt und die Zellen erneut bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Es erfolgte sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden die Kontrolle der Konfluenz mithilfe eines inversen Lichtmikroskops.

Für die Konfluenzbeurteilung der Zelllinie EA.hy926 und der Primärzellen HUVEC wurden die Transwell-Einsätze invertiert und auf ihrer Unterseite mit SLK-PBS beschichtet (Punkt 4.1.4). Anschließend wurden die Zellen mithilfe von Trypsin/EDTA (EA.hy926) oder Accutase (HUVEC) abgelöst und in frischem Kultivierungsmedium resuspendiert (Punkt 4.1.2). Danach erfolgte die Zellzahlbestimmung der Lösungen und die Herstellung der einzelnen Zellsuspensionen. Für die Herstellung der Suspensionen wurden die Zellen herunterzentrifugiert und in frischem Kulturmedium resuspendiert. Die EA.hy926 wurden in 800 µl DMEM (G)-Medium und die HUVEC in 400 µl EBM-Vollmedium resuspendiert. Die genau verwendeten Volumina sind in Tabelle 2 dargestellt. Anschließend wurden jeweils 400 µl der Zellsuspension auf die invertierten Transwell-Einsätze ausgesät und für 2 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ adhärirt. Danach wurde die Platte herumgedreht, sodass sich die Einsätze hängend im Well befanden. Das Innere der Transwells wurde mit 500 µl und das äußere Well mit 1500 µl Kulturmedium befüllt. Es erfolgte eine 2-tägige Kultivierung der Zellen im CO₂-Inkubator. Sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden wurde die Konfluenz mithilfe eines Lichtmikroskops kontrolliert.

Für alle Konfluenzbeurteilungen wurden Bilder nach 24 als auch nach 48 Stunden mithilfe einer im Lichtmikroskop integrierten Kamera aufgenommen.

Tabelle 2: Volumina für die Konfluenzbeurteilung

	Zellsuspension für 1 Transwell	CM-Medium für 1 Transwell
Zellzahl A549	817.500 Zellen/ml	
132.626 Zellen/cm ²	183 µl	317 µl
176.835 Zellen/cm ²	245 µl	255 µl
221.043 Zellen/cm ²	306 µl	194 µl
265.252 Zellen/cm ²	367 µl	133 µl
	Zellsuspension für 1 Transwell	DMEM (G) – Medium für 1 Transwell
Zellzahl EA.hy926	290.000 Zellen/ml	
176.835 Zellen/cm ²	1379 µl	Resuspendierung in 800 µl
221.043 Zellen/cm ²	1724 µl	Resuspendierung in 800 µl
265.252 Zellen/cm ²	2069 µl	Resuspendierung in 800 µl
309.460 Zellen/cm ²	2414 µl	Resuspendierung in 800 µl
	Zellsuspension für 1 Transwell	ALI - Basalmedium für 1 Transwell
Zellzahl HBEpC	115.000 Zellen/ml	
221.043 Zellen/cm ²	2174 µl	Resuspendierung in 500 µl
265.252 Zellen/cm ²	2609 µl	Resuspendierung in 500 µl
309.460 Zellen/cm ²	3043 µl	Resuspendierung in 500 µl
	Zellsuspension für 1 Transwell	EBM - Vollmedium für 1 Transwell
Zellzahl HUVEC	181.250 Zellen/ml	
88.417 Zellen/cm ²	552 µl	Resuspendierung in 400 µl
132.626 Zellen/cm ²	828 µl	Resuspendierung in 400 µl
176.835 Zellen/cm ²	1103 µl	Resuspendierung in 400 µl

4.2 Erzeugung einer ALI-Kultur

Für die Erzeugung einer ALI-Kultur, wurden die Transwell-Einsätze in die Vertiefungen einer 12 well Platte eingesetzt und wie in Punkt 4.1.4 beschrieben mit einem Gemisch aus SLK und PBS beschichtet. Die A549 und HBEpC wurden wie in Punkt 4.1.2 vom Flaschenboden abgelöst und in frischem Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurde die Beschichtungslösung abgezogen und 500 µl Zellsuspension mit einer Zellzahl von 176.835 Zellen/cm² (A549) und 221.043 Zellen/cm² (HBEpC) auf die Membranen ausgesät. Die Einsätze wurden danach für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert und das äußere Well anschließend mit 1500 µl frischem Kultivierungsmedium befüllt. Die Einsätze wurden danach für 2 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Daraufhin erfolgte der Airlift der Zellen, wobei das Medium des oberen Kompartiments verworfen und das des unteren Kompartiments mit 600 µl frischem Medium ausgetauscht wurde. Für die Etablierung der optimalen Bedingungen der ALI-Kultur wurden unterschiedliche Medien-Varianten untersucht. Bei der Zelllinie A549 wurden die Zellen

zunächst in CM-Medium ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Während des Airlifts wurden die Zellen anschließend mit ALI-Medium inkubiert. Zum Vergleich wurden weitere Zellen während der Aussaat und auch nachfolgend beim Airlift entweder in CM- oder ALI-Medium kultiviert. Zusätzlich wurde untersucht, ob sich das Waschen der Zellen im oberen Kompartiment während des Airlifts positiv auf die Ausbildung eines geschlossenen Epithels auswirkt. Dazu wurden die oberen Zellen täglich mit frischem Medium gespült, um abgestorbene Zellen und Verklumpungen zu entfernen. Die Zellen wurden bis zu 7 Tagen in der ALI-Kultur gehalten. Die Primärzellen HBEPc wurden für 2 Tage bis zur vollständigen Konfluenz in ALI-Basalmedium kultiviert, der Airlift erfolgte anschließend in dem Kulturmedium sowie zusätzlich in einem speziell erworbenen Air-liquid-Interface-Medium. Zu jeder Medium-Variante wurden zusätzlich Kontrollen mitgeführt, wobei die Zellen dauerhaft mit Medium überschichtet waren und nicht der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche ausgesetzt wurden.

4.3 Erzeugung einer Kokultur

Die Transwell-Einsätze für die Kokulturen wurden zuerst beidseitig mit einem SLK-PBS Gemisch beschichtet und anschließend für 2 Stunden unter der Bank getrocknet (Punkt 4.1.4). Es wurden zwei unterschiedliche Kokulturen erzeugt. Die eine setzte sich aus den beiden Zelllinien A549 und EA.hy926 zusammen und die andere aus den Primärzellen HBEPc und HUVEC. Alle Zellen wurden wie in Punkt 4.1.2 abgelöst und in frischem Kokulturmedium resuspendiert. Das Kokulturmedium für die Zelllinien A549 und EA.hy926 war das DMEM-Medium mit Glucose und für die Primärzellen HBEPc und HUVEC wurde ein Gemisch aus EBM- und ALI-Basalmedium verwendet. Für die Aussaat wurden die beschichteten Einsätze invertiert und auf deren Unterseiten jeweils $309.460 \text{ EA.hy926/cm}^2$ und $176.835 \text{ HUVEC/cm}^2$ ausgesät. Anschließend wurden die Einsätze für 2 Stunden bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5 \% CO_2 inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Einsätze umgedreht und in die Vertiefungen einer 12 well Platte eingesetzt. Daraufhin wurden $176.835 \text{ A549/cm}^2$ und $221.043 \text{ HBEPc/cm}^2$ in das Innere der Einsätze ausgesät. Danach erfolgte eine 45-minütige Adhäsion der Zellen bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5 \% CO_2 im Inkubator. Abschließend wurde das äußere Well mit $1500 \text{ } \mu\text{l}$ des jeweiligen Kokulturmediums befüllt. Beide Kokulturen wurden für 2 Tage bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert, danach erfolgte der Airlift. Hierfür wurde ausschließlich das Medium des oberen Kompartiments verworfen und das untere mit $600 \text{ } \mu\text{l}$ frischem Medium befüllt, sodass sich die Zellen der Transwell-Unterseite dauerhaft im Medium befanden. Die Kokultur der Zelllinien (A549/EA.hy926) verblieb 7 und die der Primärzellen (HBEPc/HUVEC) für 14 Tage im Airlift.

4.4 Färbemethoden

Bei allen Färbemethoden wurden die Membranen nach erfolgreicher Färbung aus ihren Einsätzen herausgetrennt und auf einen Objektträger überführt, in Fluoromount eingedeckt und mithilfe eines Deckglases fixiert.

4.4.1 Lebend-Tod

Die Lebend-Tod-Färbung erfolgte innerhalb der Transwell-Einsätze. Hierfür wurde eine Färbelösung bestehend aus: 1000 µl des jeweiligen Kulturmediums; 0,5 µl Calcein und 2,2 µl Propidiumiodid hergestellt. Das Medium, in dem sich die Zellen befanden wurde abgesaugt und durch Färbelösung ersetzt. Das Volumen an Färbelösung variierte dabei je Platte oder verwendeten Einsatz. Die genau verwendeten Volumina sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Volumina der jeweiligen well Platten und Einsätze

Platte	Volumen je well	
96 well Platte	100 µl	
24 well Platte	400 µl	
12 well Platte	1500 µl	
6 well Platte	3000 µl	
Einsätze	oberes Kompartiment	unteres Kompartiment
Transwell-Einsatz, 12 well Platte	500 µl	1500 µl
Netwell-Einsatz, 12 well Platte	400 µl	500 µl

Die Zellen wurden zusammen mit der Färbelösung für 30 Minuten, bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend konnten die Zellen unter einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop bei 552 nm (Calcein) und 465 nm (Propidiumiodid) betrachtet werden. Für die Lagerung der Zellen wurde die Färbelösung verworfen und die Zellschicht mit Kultivierungsmedium gespült. Anschließend verblieben die Zellen in Medium und wurden weiterhin im CO₂-Inkubator kultiviert.

4.4.2 Phalloidin-DAPI

Für die Phalloidin-DAPI-Färbung wurde das Medium der Zellen abgesaugt und durch 3 %-iges PFA ersetzt. Es erfolgte eine 30-minütige Fixierung bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das PFA abgesaugt und die Zellen dreimal mit PBS* gewaschen. Um die Zellschicht vor Austrocknung zu schützen verblieb diese in PBS*. Danach wurden die Zellen für 10 Minuten mit 1000 µl einer 0,1 %-igen TritonX-Lösung permeabilisiert, welche sich aus 10 µl TritonX100

und 990 µl PBS* zusammensetzte. Für die Herstellung der Färbelösung kamen 1000 µl PBS*, 1 µl DAPI und 0,5 µl Phalloidin-TRITC zum Einsatz. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die 0,1 %-ige TritonX-Lösung abgesaugt und durch Färbelösung ersetzt. Nach 45-minütiger Inkubation im dunklen wurden die Zellen dreimal mit PBS* gewaschen. Direkt nach der Färbung, wurden die Membranen für die mikroskopische Visualisierung mithilfe eines Skalpells aus den Transwell-Einsätzen herausgeschnitten und auf einen Objektträger mit Deckglas überführt. Die Proben konnten anschließend mithilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops bei 572 nm (TRITC) und 465 nm (DAPI) betrachtet werden.

4.4.3 Hämatoxylin-Eosin

Eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung erfolgte ebenfalls nach Fixierung der Objekte mit 3 % PFA für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Proben dreimal mit PBS* gewaschen, mithilfe eines Skalpells aus den Einsätzen herausgetrennt und in eine 24 well Platte überführt. Die Objekte wurden anschließend mit einer Hämatoxylin-Lösung überschichtet und für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung verworfen und durch eine 0,1 %-ige HCl-Lösung ersetzt, welche nach 10 Sekunden entfernt wurde. Daraufhin erfolgte das Bläuen der Zellkerne unter Leitungswasser für 3 bis 5 Minuten. Anschließend wurden die Objekte mit Eosin Y-Lösung überschichtet und erneut für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Färbelösung verworfen und die Objekte solange mit Leitungswasser gespült, bis sich keine Farbe mehr herauslöste. Um eine Austrocknung der Objekte zu verhindern verblieben diese in Leitungswasser. Die abschließende optische Untersuchung erfolgte mit einem inversen Lichtmikroskop.

4.4.4 Alcianblau

Für die Alcianblau-Färbung wurde 1 % Alcianblau in 3 %-iger Essigsäure gelöst, sodass sich ein pH-Wert von 2,5 eingestellt hat. Zuerst wurde das Medium der Zellen abgesaugt und die Zellschicht anschließend für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 3 % PFA fixiert. Danach wurde das PFA verworfen und die Zellschicht dreimal mit PBS* gewaschen. Daraufhin wurde 500 µl Färbelösung auf die Zellen pipettiert und es erfolgte eine 15 minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Färbelösung verworfen und die Zellen mit PBS* gewaschen. Um die Zellen vor Austrocknung zu schützen, verblieben die gefärbten Membranen in PBS*. Für die mikroskopische Untersuchung der Membranen wurden

diese aus ihren Einsätzen herausgetrennt, auf einen Objektträger überführt und mit Fluoromount eingedeckt. Die Untersuchung erfolgte mithilfe eines inversen Lichtmikroskops.

4.4.5 CellMask Deep Red

Für die CellMask Deep Red Färbung wurde zuerst die Färbelösung bestehend aus 0,5 µl CellMask Deep Red und 500 µl Kulturmedium der jeweiligen Zellen hergestellt. Anschließend wurde das Medium der Zellen verworfen und durch 500 µl Färbelösung ersetzt, woraufhin eine 10-minütige Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ erfolgte. Daraufhin wurde die Färbelösung entfernt und die Zellschicht mit 3 % PFA fixiert. Die Fixierung erfolgte ebenfalls für 10 Minuten bei 37 °C. Abschließend wurden die Zellschicht dreimal mit PBS* gewaschen. Die Lagerung der gefärbten Membranen erfolgte in PBS* bei 4 °C. Die visuelle Untersuchung wurde mithilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops bei 651 nm (Cy5) durchgeführt.

4.4.6 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte in speziellen Nunc™ Lab-Tek™ -Färbekammern. Die mit 3 % PFA fixierten Membranen wurden mithilfe eines Skalpells aus ihren Transwell-Einsätzen herausgetrennt, in die Vertiefungen der Färbekammer überführt und zweimal für 5 Minuten in 200 µl Waschpuffer inkubiert, welcher sich aus PBS* und 0,5 % Tween20 zusammensetzte. Danach wurden die Membranen mit 0,2 % TritonX100 für 10 Minuten permeabilisiert und anschließend für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 200 µl Blockierungslösung blockiert. Die Blockierungslösung setzte sich aus Waschpuffer und 3 % Ziegen Serum zusammen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Lösung verworfen und durch 200 µl des jeweiligen Primärantikörpers ersetzt, welcher für 24 Stunden auf den Membranen verblieb. Die Inkubation erfolgte innerhalb einer feuchten Kammer, bei 4 °C, im dunklen. Danach wurden die Membranen dreimal für jeweils 5 Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend erfolgte eine 60-minütige Inkubation des Sekundärantikörpers bei Raumtemperatur, im dunklen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Membranen dreimal mit Waschpuffer gewaschen und mit DAPI, bei einer Konzentration von 1:1000 in Waschpuffer für 10 Minuten gefärbt. Abschließend wurde der überschüssige Fluoreszenzfarbstoff durch dreimaliges Waschen mit jeweils 200 µl Waschpuffer entfernt. Die Konzentrationen der verwendeten Primär- und der dazugehörigen Sekundärantikörper sind der Tabelle 4 zu entnehmen. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte immer mithilfe von Blockierungslösung. Zudem war es

wichtig für jeden Sekundärantikörper eine Kontrolle mitzuführen, wobei die Membran ausschließlich mit dem Sekundär- und nicht mit dem Primärantikörper inkubiert wurde.

Tabelle 4: Konzentrationen der Primär- und Sekundärantikörper

	Primärantikörper	Konzentration	Sekundärantikörper	Konzentration
α-Tubulin	alpha Tubulin (B-7) mouse monoclonal IgG2a	1:50	Anti-Maus-IgG Fab 2 Alexa Fluor (R) 488	1:200
AQP-5	AQP5 (D-7) mouse monoclonal IgG1	1:50	Anti-Maus-IgG Fab 2 Alexa Fluor (R) 488	1:200
SFTPC	Anti-SFTPC Antibody, clone 3F18 ZooMAb [®] Rabbit Monoclonal	1:1000	Anti-Rabbit-IgG (whole molecule)-FITC	1:100
ZO-1	ZO-1 Polyclonal Antibody	1:200	Anti-Maus-IgG Fab 2 Alexa Fluor (R) 488	1:200

4.5 Membranschnitte

Für die Anfertigung von dünnen Querschnitten der mit Zellen besiedelten Membranen wurde ein Gefriermikrotom verwendet. Die Membranen wurden zuvor mit 3 % PFA für 30 Minuten fixiert, anschließend dreimal mit PBS* gewaschen und mithilfe eines Skalpell aus den Einsätzen herausgeschnitten. Anschließend wurden die Membranen senkrecht mithilfe der Schnellfrost-Funktion direkt in das PolyFreeze-Medium bei -56 °C eingebettet. Hierbei war darauf zu achten, die Membranen möglichst gleichmäßig mit Medium zu überschichten und Luftblasen zu entfernen. Die eingebetteten Membranen wurden auf einen Metallträger aufgebracht und in die Schneidevorrichtung des Gefriermikrotoms überführt. Anschließend wurden die Membranen so lange mithilfe des Grobtriebs geschnitten, bis sich eine einheitliche Schnittfläche gebildet hatte. Die gewünschte Schnittdicke konnte mithilfe des Feintriebs eingestellt werden. Es wurden Schnitte von 20 µm Dicke angefertigt. Sobald ein Schnitt erfolgt war, konnte das Objekt direkt auf einen Objektträger überführt werden. Die Analyse der Schnitte erfolgte mithilfe eines Lichtmikroskops.

4.6 Zytotoxizitätstest

Für den Zytotoxizitätstest wurden die jeweiligen Zellen in die Vertiefungen einer 96 well Platte ausgesät. Die Zellzahl wurde dabei so gewählt, dass die Zellen nach 2-tägiger Inkubation eine Konfluenz zwischen 70 % - 80 % besaßen. Anschließend wurde nach dem Colorimetric Cell Viability Kit III (XTT) der Firma PromoCell verfahren. Zu allen Proben wurden zusätzlich eine

Positivkontrolle (TritonX100), eine Negativkontrolle (Kulturmedium ohne Probe) und ein Null-Wert (Kulturmedium ohne Zellen) mitgeführt. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenz-Absorption von 620 nm gemessen. Die Stoffwechselaktivität konnte anschließend mit folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Stoffwechselaktivität [\%]} = \frac{(OD_{\text{Probe}} - OD_{\text{0-Wert}}) \cdot 100}{(OD_{\text{Negativkontrolle}} - OD_{\text{0-Wert}})}$$

Es wurde ein Zytotoxizitätstest verwendet, um zu untersuchen wie sich die Proliferation der Zelllinie A549 auf unterschiedlichen Kollagenbeschichtungen verhält. Hierfür wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Sodass jeweils drei Vertiefungen einer 96-well Platte entweder mit SLK-PBS oder einer Kollagenmembran beschichtet wurden. Die genauen Zusammensetzungen der einzelnen Beschichtungslösungen sind Punkt 4.1.4 zu entnehmen. Anschließend wurden A549 mit einer Dichte von 8.825 Zellen/cm² innerhalb der beschichteten Wells ausgesät und für 5 Tage bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 5-tägiger Kultivierung erfolgte der Zytotoxizitätstest mithilfe des Colorimetric Cell Viability Kit III (XTT).

Für den Zytotoxizitätstest zur Etablierung des Kulturmediums der Kokultur für die Zelllinien A549 und EA.hy926 wurden die jeweiligen Zellen in ihrem Kulturmedium resuspendiert und ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte der Wechsel auf die zu untersuchenden Medien (Tabelle 5). Die A549 wurden 4 Tage und die Endothelzellen wurden 7 Tage, bis zu einer 80 %-igen Konfluenz, bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Alle zwei Tage erfolgte ein Mediumwechsel.

Für die Etablierung eines Kokulturmediums der Primärzellen HBEpC und HUVEC wurde ebenfalls ein Zytotoxizitätstest durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen in dem jeweils zu untersuchenden Medium resuspendiert und anschließend mit einer Dichte von 35.295 Zellen/cm² in die Vertiefungen einer 96 well Platte ausgesät. Die Zellen wurden für 72 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach 48 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel. Von jeder Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Anschließend erfolgte der eigentliche Zytotoxizitätstest unter Verwendung des Colorimetric Cell Viability Kit III (XTT). Die genauen Medien-Varianten der beiden durchgeführten Zytotoxizitätstests sind der Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5: Medien-Varianten zur Etablierung des Kulturmediums der Kokultur

Zellen	Kulturtyp	Basismedium	Zusätze	Bezeichnung
A549 / EA.hy926	Kokultur	DMEM high Glucose with L-Glutamine	10 % FBS	DMEM (G)
A549 / EA.hy926	Kokultur	Dulbecco's Modified Eagle's Medium/ Nutrient Mixture F-12	1 % L-Glutamin 10 % FBS	DMEM
A549 / EA.hy926	Kokultur	RPMI1640	10 % FBS	CM
A549 / EA.hy926	Kokultur	DMEM- und CM-Medium (Verhältnis 1:1)		DMEM + CM
A549 / EA.hy926	Kokultur	DMEM (G)- und CM-Medium (Verhältnis 1:1)		DMEM (G) + CM
<hr/>				
HBEpC / HUVEC	Kokultur	EBM TM -2 Endothelial Cell Growth Basal	EGM TM -2 SingleQuots TM Supplements	EBM
HBEpC / HUVEC	Kokultur	Airway Epithelial Cell Basal Medium	SupplementPack Airway Epithelial Cell Growth	ALI (Basal)
HBEpC / HUVEC	Kokultur	EBM- und ALI (Basal)-Medium (Verhältnis 1:1)		EBM + ALI (Basal)

4.7 Barrieremessung

Die Barrieremessung diente dazu, die entstandene Epithelschicht sowie das gebildete Kollagenhydrogel auf ihre Geschlossenheit zu untersuchen. Hierfür wurden zwei verschiedene Methoden angewendet: der Natriumfluorescein- und der Dextran-Durchgang.

4.7.1 Natriumfluorescein-Durchgang

Die Untersuchung der Barrierefunktion des Epithels erfolgte an Transwells, die sich in einer 12 well Platte befanden. Es wurden sowohl besiedelte als auch unbesiedelte Einsätze für die Messung verwendet. Die Zellen der besiedelten Membran wurden für 2 Tage bis zur vollständigen Konfluenz in ihrem jeweiligen Medium kultiviert. Danach erfolgte der Airlift der Zellen, wobei die in Punkt 4.2 beschriebenen Medien- und Wechsel-Varianten angewendet wurden. Von jeder Variante wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Zellen A549 und EA.hy926 befanden sich anschließend 7 und die Zellen HBEpC und HUVEC 14 Tage im Airlift, woraufhin die Messung der epithelialen Integrität erfolgte. Hierfür wurde das Medium des unteren Kompartiments verworfen und die Zellschicht zweimal mit vorgewärmtem Medium gewaschen. Daraufhin wurde ein Natriumfluorescein-Gemisch mit einer Endkonzentration von 1 mg/ml hergestellt. Hierfür wurden 50 mg Natriumfluorescein in 50 ml

Medium gelöst. Für die Messung wurden 500 μl des Gemischs in das obere Kompartiment pipettiert und 150 μl Probe in regelmäßigen Zeitabständen (0, 1, 3, 5 und 10 Minuten) aus dem unteren Kompartiment entnommen. Von den 150 μl wurden anschließend jeweils zweimal 70 μl in die Vertiefungen einer schwarzen 96 well Platte pipettiert. Das Fluoreszenzsignal wurde abschließend mithilfe eines Plattenreaders bei einer Anregungswellenlänge von 495 nm und einer Emissionswellenlänge von 519 nm detektiert. Als Kontrolle wurden immer drei mit SLK-PBS beschichtete Transwell-Einsätze ohne Zellen mitgeführt.

4.7.2 Dextran-Durchgang

Um die gebildeten Kollagenmembranen (siehe 4.1.4) auf ihre Durchlässigkeit zu untersuchen, wurde eine Dextran-Messung (70.000 Da) durchgeführt. Es wurden neun verschiedene Membranen untersucht. Sieben Membranen wurden ausschließlich mit 217 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ SLK beschichtet und zwei weitere Membranen zusätzlich mit Elastin. Für die eigentliche Messung wurden die trockenen Kollagenmembranen für 10 Minuten in Medium eingeweicht. Das Netwell wurde anschließend in eine 6 well Platte eingesetzt und das untere Kompartiment mit 5 ml Medium befüllt. Die Flüssigkeit des oberen Kompartiments wurde verworfen und durch 500 μl eines Dextran-Medium-Gemischs mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml ersetzt. Es erfolgte in regelmäßigen Zeitabständen (0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 5; 10 Minuten) die Entnahme von 150 μl Probe aus dem unteren Kompartiment. Von diesem Volumen wurden anschließend jeweils zweimal 70 μl in die Vertiefungen einer schwarzen 96 well Platte pipettiert. Die Fluoreszenz wurde abschließend mithilfe eines Plattenreaders bei einer Anregungswellenlänge von 494 nm und einer Emissionswellenlänge von 521 nm gemessen.

4.8 Auslenkungsmessung der Kollagenschichten

Für die Untersuchung der Auslenkung in Abhängigkeit zum angelegten Druck am MPSstimulus, wurde eine Auslenkungsmessung mithilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (Durchlicht) durchgeführt. Hierfür wurden dieselben Kollagenmembranen wie in Punkt 4.7.2 verwendet. Die Netwells wurden in eine 6 well Platte eingesetzt und mit einem Deckel verschlossen, wodurch eine Verbindung über Schläuche zum MPSstimulus hergestellt wurde. Das untere Kompartiment wurde mit 5 ml Medium befüllt, um die Austrocknung der Membran zu verhindern. Anschließend wurde die Platte in den Objektisch des Mikroskops eingesetzt und ein kontinuierlicher Druck am MPSstimulus eingestellt. Bei der Messung war darauf zu achten die einzelnen Gitter des PolymerNetztes auszuzählen und ein in der Mitte befindliches

Gitter für die Untersuchung zu verwenden. Die Auslenkung wurde mithilfe der Zen 2.6 blue edition (Firma: ZEISS Microscopy) detektiert. Hierfür wurde die Membran sowohl in ihrem Ausgangszustand, als auch in ihrem gedehnten Zustand fokussiert. Der Abstand der Punkte wurde mithilfe der Z-Stack-Funktion berechnet. Der Ausgangszustand der Membran wurde nur einmalig bestimmt. Der Druck wurde stetig um 10 mbar erhöht, bis zu einem Maximum von 100 mbar.

4.9 Netwell-Besiedlung und Dehnung

Die Netwells wurden im ersten Schritt mit einer Kollagenmembran ($217 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ SLK) auf einer Silikonunterlage beschichtet (Punkt 1.4.1). Für die Besiedlung wurde die Zelllinie A549 und die Primärzellen HBEpC verwendet. Diese wurden mithilfe von Trypsin/EDTA abgelöst und in ihrem jeweiligen Kulturmedium resuspendiert (Punkt 4.1.2). Es wurden $176.800 \text{ A549}/\text{cm}^2$ und $221.000 \text{ HBEpC}/\text{cm}^2$ in das Innere der Netwells ausgesät. Diese wurden anschließend für 45 Minuten, bei 37°C und $5\% \text{ CO}_2$ inkubiert. Danach wurde das äußere Well mit Kulturmedium befüllt und die Einsätze für 24 Stunden kultiviert. Im Anschluss wurden die Netwells für die Dehnung vorbereitet. Hierfür wurde ein Dichtungsring in den Rand der Netwells platziert und der Deckel aufgesetzt. An den Deckel wurde ein Schlauch angeschlossen, welcher mit dem MPSstimulus verbunden war und die Versorgung mit Druckluft gewährleistete. Das Netwell wurde anschließend in einen speziellen Einsatz des Fraunhofer Institutes eingesetzt, welcher sich auf einer 6 well Platte befand. Das untere Well wurde mit 5 ml Kultivierungsmedium befüllt und die Netwells mithilfe von Klebeband innerhalb der Platte fixiert. Danach wurden am MPSstimulus die Dehnungsparameter eingestellt. Es wurde eine zyklische Dehnung mit einer Frequenz von 12 BPM und einem Druck von 100 mbar verwendet. Hierbei war darauf zu achten den Druck anfangs zu kontrollieren und gegebenenfalls bei zu niedrigem Druck, die Druckluft etwas höher zu regulieren. Nach dem Start des Programms wurde die Dehnung unter einem inversen Lichtmikroskop überprüft. Sobald eine Blasenentwicklung erkennbar war musste das Programm gestoppt werden, da die Kollagenmembran undicht war. Die Platte wurde anschließend in einen Inkubator überführt. Die Netwells wurden sowohl nach 24- als auch nach 72-stündiger Dehnung mit $3\% \text{ PFA}$ fixiert und angefärbt.

4.10 qRT-PCR

4.10.1 RNA-Extraktion

Für die quantitative Real-Time PCR wurden die zu untersuchenden Zelltypen auf Transwell-Einsätzen (Wachstumsoberfläche 1,131 cm²) ausgesät und für 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Es wurden Mono- und Kokulturen, als auch verschiedene Medien-Varianten bezüglich ihrer Genexpression untersucht. Der Airlift der Zelllinien A549 und EA.hy926 betrug 7 Tage, während die Primärzellen HBEPc und HUVEC sich 14 Tage im Airlift befanden. Die einzelnen Proben mit ihren verwendeten Medien und Kultivierungszeiten sind der Tabelle 6 zu entnehmen. Für die Isolierung der Gesamt-RNA wurden 113,1 µl (1 ml pro 10 cm²) TRI Reagent auf den Zellrasen pipettiert. Anschließend erfolgte eine 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Das entstandene Lysat wurde nach Ablauf der Inkubationszeit mithilfe einer Pipette aufgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß übertragen. Die Lagerung erfolgte anschließend bei – 80 °C. Für die RNA-Isolation der Kokulturen wurde derselbe Schritt noch einmal für die Unterseite der Transwells wiederholt.

Tabelle 6: Probenzusammensetzung für die qRT-PCR

Zellen	Kulturtyp	Medium	Airlift Dauer
A549	Monokultur	CM-Medium	7 Tage
A549	Submerskultur	CM-Medium	7 Tage
HBEPc	Monokultur	ALI - Basalmedium	14 Tage
HBEPc	Monokultur	Air-liquid-Interface - Medium	14 Tage
HBEPc	Submerskultur	ALI – Basalmedium	14 Tage
A549/EA.hy926	Kokultur	DMEM (G) - Medium	7 Tage
HBEPc/HUVEC	Kokultur	ALI (basal) - und EBM-Medium (1:1)	14 Tage

4.10.2 RNA-Aufreinigung

Für die Aufreinigung der RNA wurden die eingefrorenen Lysate aufgetaut. Alle Arbeitsschritte erfolgten anschließend nach dem RiboPure™ Kit der Firma Thermo Fisher Scientific. Abschließend erfolgte die Konzentrationsmessung der einzelnen Proben mithilfe eines Nanophotometers, wobei die RNA-Konzentration sowie die Quotienten A260/A280 und A260/A230 ermittelt wurden.

4.10.3 cDNA-Synthese

Für das Umschreiben der RNA in cDNA wurde zuerst ein Gemisch bestehend aus 10 µl SuperScript™ IV VILO™ Master Mix und 15 µl Nuklease freiem Wasser hergestellt.

Anschließend wurden 10 µl aus diesem bereits vorbereiteten Reaktionsgemisch entnommen und mit 10 µl der aufgereinigten RNA-Probe versetzt. Im Anschluss erfolgten drei aufeinanderfolgende Inkubationsschritte, wofür die Reaktionsgefäße in bereits vorgeheizte Thermoblöcke überführt wurden. Im ersten Schritt fand das Primer Annealing für 10 min bei 25 °C statt, daraufhin erfolgte die Reverse Transkription bei 50 °C für 10 min und im letzten Schritt erfolgte die Enzym Aktivierung für 5 Minuten bei 85 °C. Die Proben konnten anschließend direkt für die qRT-PCR eingesetzt werden oder wurden bei – 80 °C gelagert.

4.10.4 qRT-PCR

Für die eigentliche PCR wurde zuerst das PCR-Reaktionsgemisch hergestellt. Das Volumen für eine Reaktion setzte sich jeweils aus 10 µl TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (2X), 1 µl TaqMan™ Assay (20X) und 7 µl Nuklease freiem Wasser zusammen, sodass sich ein Gesamtvolumen von 18 µl ergab. Das verwendete Volumen wurde jeweils an die zu untersuchende Probenmenge angepasst. Anschließend wurden dem vorbereiteten Reaktionsgemisch jeweils 2 µl cDNA hinzugefügt. Für die NTC wurde anstatt von DNA, Nuklease freies Wasser verwendet. Beim pipettieren war darauf zu achten dauerhaft auf Eis zu arbeiten und die verwendeten Materialien vor Licht zu schützen. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße mit dem PCR-Ansatz in einen Thermocycler überführt und das Real-Time PCR-Programm eingestellt. Dieses setzte sich aus drei verschiedenen Schritten zusammen, der UNG Inkubation, der Polymerase Aktivierung und der eigentlichen PCR, welche sich wiederum aus der Denaturierung sowie dem Primer-Annealing zusammensetzte und 40-mal wiederholt wurde. Der genaue PCR-Zyklus mit den dazugehörigen Temperaturen ist der Tabelle 7 zu entnehmen.

Tabelle 7: qRT-PCR-Programm

UNG Inkubation	Polymerase Aktivierung	PCR (40 Zyklen)		
Halten (50 °C)	Halten (95 °C)	Denaturierung (95 °C)	Annealing (60 °C)	Halten (4 °C)
2 Minuten	20 Sekunden	3 Sekunden	30 Sekunden	∞

Nach Ablauf der PCR wurden die Reaktionstubes bei -20 °C gelagert, um anschließend elektrophoretisch aufgetrennt zu werden. Die Real-Time PCR-Ergebnisse der untersuchten Proben wurden anschließend mithilfe der CFX Maestro Software (Firma: Bio-Rad Laboratories

GmbH) ausgewertet. Zur Berechnung der Genexpression zwischen zwei zu vergleichenden Sequenzen wurde die Livak-Methode ($\Delta\Delta Ct$) verwendet.

$\Delta\Delta Ct$ -Methode:

$$\Delta Ct (Probe) = Ct (gewünshtes Gen) - Ct (GAPDH)$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (experimentelle Sonde) - \Delta Ct (Positivkontrolle)$$

$$relative\ Veränderung\ der\ Genexpression = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

4.11 Gelelektrophorese

Um die entstandenen PCR-Produkte bezüglich ihrer Größe und Ladung zu analysieren wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Hierfür wurde ein 3 %-iges Agarosegel, bestehend aus 6 g Agarose und 200 ml TAE-Puffer hergestellt. Die Agarose und der TAE-Puffer wurden gemischt und in der Mikrowelle so lange erwärmt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Anschließend wurden 1,5 μ l eines fluoreszierenden Farbstoffes (SERVA DNA Stain G) in das Gel pipettiert und dieses nochmal geschwenkt, um den Farbstoff homogen zu verteilen. Anschließend konnten 40 ml des Gels in eine vorbereitete Gelkammer, mit 12 well Kamm gegossen werden. Danach wurde das Gel für 30 Minuten, bei Raumtemperatur abgekühlt und ausgehärtet. Der Kamm konnte anschließend herausgezogen und der Gelschlitten in eine Elektrophoresekammer überführt werden. Die Kammer wurde daraufhin bis zu der Fülllinie mit TAE-Puffer gefüllt, sodass sich das Gel vollständig in Puffer befand. Anschließend wurden die einzelnen Proben für die Beladung des Gels zusammen pipettiert. Diese setzten sich aus 5 μ l des jeweiligen PCR-Produktes und 2 μ l Auftragspuffer (6x DNA Loading Dye) zusammen. Von der DNA-Leiter (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder) wurden 1,5 μ l verwendet und mit 2 μ l Auftragspuffer resuspendiert. Das Gel wurde anschließend mit den einzelnen Proben beladen und für 30 Minuten bei 120 V laufen gelassen. Danach wurden die Gele in eine Dunkelkammer überführt und bei UV-Licht (260 nm) fotografiert.

4.12 Überprüfung der Wirksamkeit eines ALI-Modells mithilfe von TGF- β 1

Um die Wirksamkeit des erzeugten ALI-Modells zu untersuchen wurde der transformierende Wachstumsfaktor TGF- β 1 verwendet. Hierfür wurden im ersten Schritt ALI-Kulturen mithilfe der Zelllinie A549 erzeugt (Punkt 4.2). Diese befanden sich 2 Tage lang in Kultur und wurden anschließend für 7 Tage im Airlift gehalten. Ab dem 7. Tag wurden dem Medium des unteren Kompartiments 10 ng/ml TGF- β 1 hinzugefügt. Der Wachstumsfaktor wurde dafür zuvor

mithilfe von destilliertem Wasser und 0,1 % BSA auf die gewünschte Arbeitskonzentration verdünnt und daraufhin dem Medium zugesetzt. Die Behandlung mit TGF- β 1 erfolgte für 2 Tage. Danach wurden die einzelnen Airlift-Kulturen, mithilfe von Natriumfluorescein auf ihre Permeabilität untersucht und anschließend mit PFA fixiert (Punkt 4.7.1).

5 Ergebnisse

5.1 Konfluenzbeurteilung

Für die Etablierung eines zellbasierten Lungengewebemodells musste zunächst die Kultivierung der relevanten Zelltypen genauer betrachtet werden. Ziel der ersten Untersuchungen, war die Erzeugung eines konfluenten Monolayers als wesentliches Merkmal der Epithelgewebe und als grundlegende Voraussetzung für die Erzeugung einer Luft-Flüssigkeits-Grenzflächen-Zellkultur. Um herauszufinden, welche Zellen sich am besten für das In-vitro-Modell eignen, wurden Zelllinien und primäre Zellen getestet. Dazu wurden die Zellen in verschiedenen Zellzahlen in Transwell-Einsätzen ausgesät, über 2 Tage kultiviert und anschließend deren Zelldichte beurteilt. Für die Rekonstruktion eines aussagekräftigen Lungenepithelgewebes, werden verschiedene Zelltypen der pulmonalen Mikroumgebung benötigt. Die Nachbildung des Epithels, erfolgt mit Hilfe der Lungenkarzinomzelllinie A549 und den humanen primären Bronchialepithelzellen HBEPc. Für die Rekonstruktion des Endothels wurden die Primärzellen HUVEC, als auch die somatische Hybridzelllinie EA.hy926 verwendet. HUVEC lassen sich im Gegensatz zu anderen primären Zelltypen gut kultivieren und sind vergleichsweise günstig in ihrer Beschaffung, wodurch sie sich sehr gut für die *in vitro* Forschung eignen.

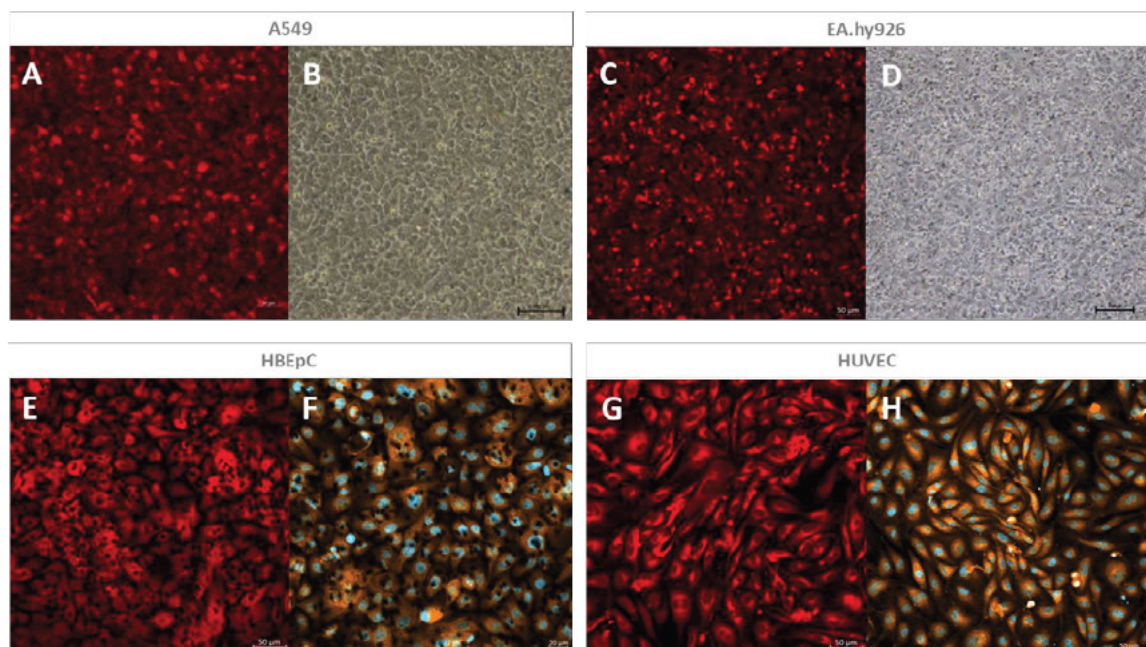


Abbildung 5: Konfluenzbeurteilung für A549, EA.hy926, HBEPc und HUVEC

Die Abbildungen dienen zur Konfluenzbeurteilung der einzelnen Zellen: Abb. A/B Karzinomzelllinie A549, Abb. C/D Endothelzelllinie EA.hy926, Abb. E/F Bronchialepithelzellen HBEPc und Abb. G/H Primärzellen HUVEC. Die Aufnahmen erfolgten nach 2-tägiger Inkubation. (A, C, E und G) CellMask Deep Red-Färbung, (B und D) lichtmikroskopische Aufnahmen und (F und H) Phalloidin-DAPI-Färbung. Maßstab = 50 µm (A, C, E, F, G und H) Maßstab = 100 µm (B und D)

Die beiden Darstellungen Abb. 5 A/B dienen zur Konfluenzbeurteilung der Karzinomzelllinie A549, bei einer Aussaatdichte von $176.835 \text{ Zellen/cm}^2$. Die Bilder Abb. 5 C/D zeigen die somatische Hybridzelllinie EA.hy926, hierbei wurde eine Zelldichte von $309.460 \text{ Zellen/cm}^2$ verwendet. Die CellMask Deep Red-Färbung (Abb. 5 A/C) dient zum Sichtbarmachen der Zellmembran. Die Abbildungen zeigen, dass die Zellen eine vollständig geschlossene Schicht mit teilweise dunkleren und helleren Stellen ausgebildet haben. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen dienen dazu, die unterschiedlichen zellulären Morphologien zu untersuchen. Es wird deutlich, dass die Zellen stellenweise so dicht liegen, dass sich einige bereits abgerundet haben. Die Darstellungen Abb. 5 E/F zeigen die primären humanen Bronchialepithelzellen bei einer Aussaatdichte von $221.043 \text{ Zellen/cm}^2$. Die Bilder Abb. 5 G/H stammen von den primären Endothelzellen HUVEC, bei einer Aussaat von $176.835 \text{ Zellen/cm}^2$. Beide Zelltypen wurden mittels der Farbstoffe CellMask Deep Red (Abb. 5 E/G) und Phalloidin-DAPI (Abb. 5 F/H) sichtbar gemacht. Bei der verwendeten Phalloidin-DAPI Färbung erscheint das Zytoskelett orange (Phalloidin) und die Zellkerne blau (DAPI). Für die morphologische Beurteilung der Primärzellen, wurden diese zusätzlich mithilfe eines inversen Lichtmikroskops untersucht. Die Ergebnisse sind der Abbildung 6 zu entnehmen. Es ist zu sehen, dass beide Zelltypen sehr dicht beieinander liegen und kaum intrazelluläre Zwischenräume erkennbar sind. Zudem wird deutlich, dass die Bronchialepithelzellen HBEpC teilweise so dicht liegen, dass sich einige Zellen bereits abgerundet haben. Die Abbildung 6 zeigt außerdem, dass beide Primärzellen eine flache Morphologie aufweisen und sich stark auf dem Untergrund ausgebreitet haben.

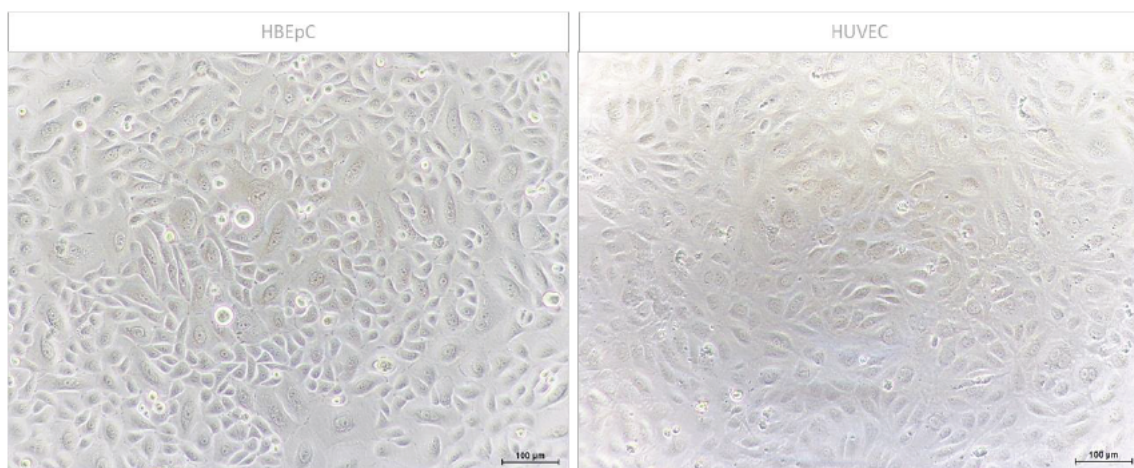


Abbildung 6: lichtmikroskopische Aufnahmen der Primärzellen HBEpC und HUVEC

Die Bilder wurden nach 2-tägiger Kultivierung aufgenommen. Für die HBEpC wurde eine Zellzahl von $221.043 \text{ Zellen/cm}^2$ und für die HUVEC eine Zelldichte von $176.835 \text{ Zellen/cm}^2$ ausgesät. Die Bilder entstanden mithilfe eines inversen Lichtmikroskops, bei 100-facher Vergrößerung, Maßstab = $100 \mu\text{m}$.

Die Ergebnisse der Konfluenzbeurteilung sind in Tabelle 8 dargestellt. Diesbezüglich wurde der jeweilige Zelltyp, mit der auszusäenden Zellzahl und der dazugehörigen Kultivierungsdauer zusammengefasst.

Tabelle 8: Zellzahlen für die Aussaat der verwendeten Zellen

Zellen	Zelltyp	Zellzahl	Dauer bis zur Konfluenz
A549	Zelllinie	176.835 Zellen/cm ²	48 Stunden
EA.h926	Zelllinie	309.460 Zellen/cm ²	48 Stunden
HBEpC	Primärzellen	221.043 Zellen/cm ²	48 Stunden
HUVEC	Primärzellen	176.835 Zellen/cm ²	48 Stunden

5.2 Experimente und Ergebnisse der Lungenkarzinomzelllinie A549

Nachdem bestimmt wurde, welche Zellzahlen zu einem konfluenten Monolayer führen, wurde die Luft-Flüssigkeits-Grenzflächen-Zellkultur mithilfe der Lungenkarzinomzelllinie A549 etabliert. Für die Kultivierung der Zellen an der Luft sind verschiedene Kulturmedien kommerziell verfügbar. Das CM-Medium ist ein Standardmedium und in der Literatur, als Kulturmedium für die A549 etabliert. Es setzt sich aus RPMI 1640 und 10 % FBS zusammen. Das ALI-Medium ist demhingegen ein spezielles serumfreies Zellkulturmedium der Firma PromoCell, das die Kultivierung menschlicher Bronchialepithelzellen an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche optimal fördern soll. Außerdem gab es einen Hinweis in der Literatur, dass ein regelmäßiges Waschen der an der Luft befindlichen Zellschicht zu einem realeren Abbild des Lungenepithels führt. In den folgenden Versuchen sollten daher die optimalen Bedingungen für den Airlift der Zellen sowie die Ausbildung einer geschlossenen Barriere und die Produktion von Lungensurfactant ermittelt werden. Hierfür wurden verschiedenste Färbungen und Querschnitte angefertigt.

5.2.1 H&E-Färbung für die Untersuchung der epithelialen Integrität

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist eine histologische Färbemethode, um Gewebe sowie Strukturen anzufärben. Hämalaun färbt die Zellkerne blau und Eosin das Zytoplasma rot. Das Ziel der Hämatoxylin-Eosin-Färbung bestand darin, herauszufinden, mit welchem Medium die dichteste Zellschicht ausgebildet werden kann bzw. ob sich das tägliche Waschen des oberen Kompartiments auf die Geschlossenheit und somit auf die zelluläre Barriere auswirkt. Hierfür wurden A549 auf mit Kollagen beschichteten Transwells ausgesät und für 2 Tage bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert. Die Zellen befanden sich anschließend für 7 Tage bei unterschiedlichen Medien-Varianten im Airlift. Die Epithelien wurden alle in CM-Medium kultiviert und anschließend entweder auf ALI- oder CM-Medium umgestellt. Zudem wurden

einige Zellschichten täglich mit frischem Medium gewaschen (Abb. 7 B und E) oder blieben unberührt (Abb. 7 A und D). Es wurden außerdem immer Kontrollen mitgeführt, wobei die Zellen submers kultiviert wurden und sich somit dauerhaft in Medium befanden (Abb. 7 C und F). Die Kontrollen wurden nicht an die Luft-Flüssigkeitsgrenze gehoben.

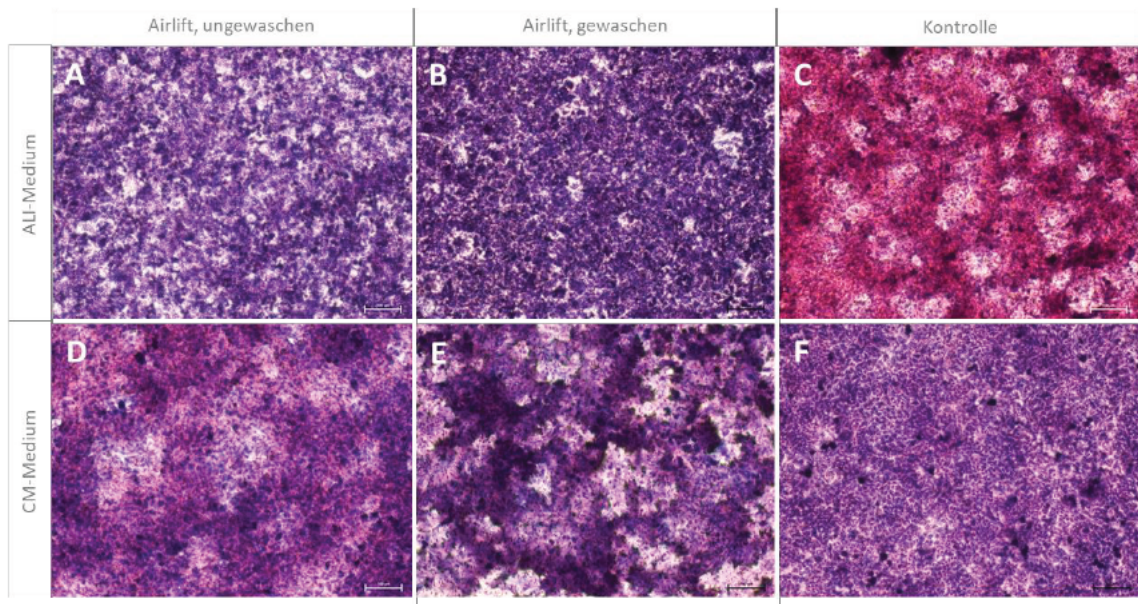


Abbildung 7: H&E-Färbung zur Untersuchung der epithelialen Integrität

Für die H&E-Färbung wurde die Zelllinie A549 auf mit Kollagen beschichteten Transwells ausgesät. Die Zellen wurden für 2 Tage kultiviert und befanden sich anschließend 7 Tage im Airlift. Es erfolgte entweder ein Waschschritt oder nicht. (A bis C) Kultivierung in CM- und Airlift in ALI-Medium, (D bis F) Kultivierung und Airlift in CM-Medium. Alle Kulturen wurden mit einer nicht an der Luft gehobenen Kontrolle (C und F) verglichen. Die Bilder entstanden mithilfe eines inversen Lichtmikroskops, bei 100-facher Vergrößerung. Maßstab = 100 μm

Anhand der Abbildung 7 wird sichtbar, dass die A549 unter allen Bedingungen eine dichte Zellschicht ausgebildet haben, allerdings existieren Unterschiede zwischen den einzelnen Varianten. Es fällt auf, dass die ungewaschenen Epithelien, die in CM-Medium kultiviert und anschließend auf ALI-Medium umgestellt wurden (Abb. 7 A und C), deutlich mehr Lücken in ihrer Zellschicht aufweisen, als bei den Zellen die sich ausschließlich in CM-Medium befanden (Abb. 7 D und F). Die gewaschene Epithelschicht des ALI-Mediums (Abb. 7 B) ist deutlich farbintensiver, geschlossener und es sind im Vergleich zu der ungewaschenen Zellschicht, deutlich weniger Lücken erkennbar. Die Kontrolle (Abb. 7 C) ist demhingegen vollständig geschlossen, homogen und im Vergleich zu allen anderen Bedingungen überwiegend rötlich angefärbt. Die gewaschene Schicht des CM-Mediums zeigt ein auffälliges, mehrschichtiges und koloniebildendes Wachstum, welches anhand der Agglomeration zu farbintensiven Zellverbänden sichtbar wird. Solch eine Koloniebildung ist auch bei der ungewaschenen

Zellschicht erkennbar, allerdings nicht so stark ausgeprägt. Die Kontrolle (Abb. 7 F) ist im Gegensatz zu den Airlift-Kulturen deutlich homogener.

5.2.2 Alcianblau-Färbung zur Untersuchung der Freisetzung von Lungensurfactant

Um zu untersuchen, ob die Zellen Schleim produzieren, wurde eine Alcianblau-Färbung durchgeführt. Alcianblau ist ein basischer Farbstoff, welcher carboxylierte, schwach saure Muzine sowie Becherzellen und schleimhaltige Glykoproteine anfärbt. Die Färbung erfolgte 7 Tage nach dem Airlift. Ziel dieser Färbemethode war es, ALI-Kulturen mit unterschiedlichen Medien-Varianten und Waschschritten auf ihre Muzinproduktion und damit auf das Vorhandensein von Becherzellen zu untersuchen. Dadurch sollte herausgefunden werden, ob das Medium bzw. das tägliche Waschen der Zellschicht für die Produktion von Lungensurfactant ausschlaggebend ist. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind der Abbildung 8 zu entnehmen.

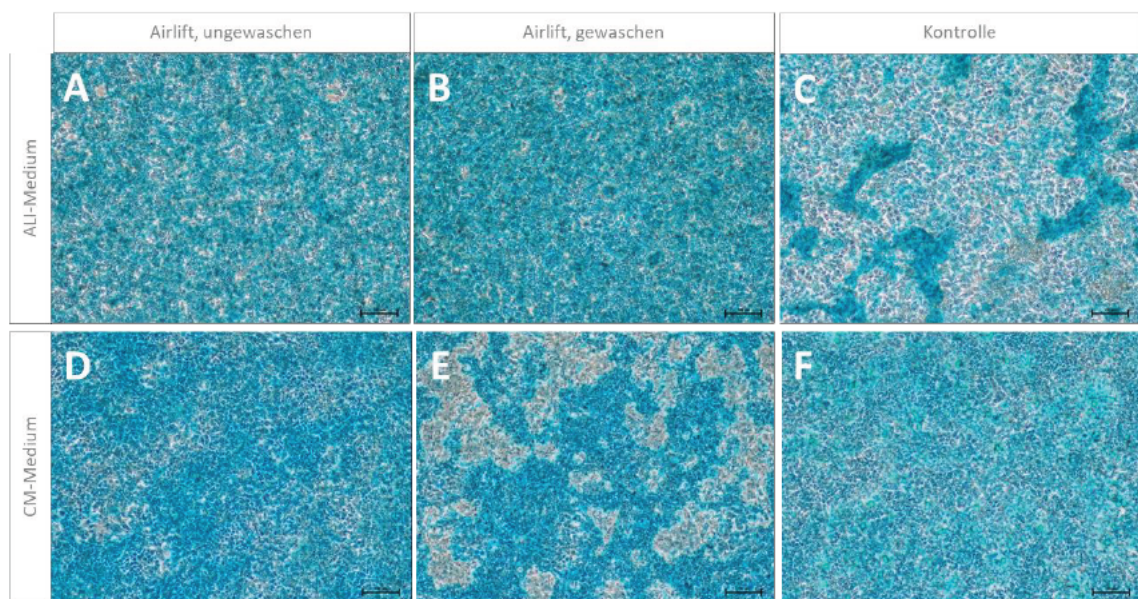


Abbildung 8: Alcianblau-Färbung zur Untersuchung der Anwesenheit von Muzin

Für die Alcianblau-Färbung wurden A549 auf mit Kollagen beschichteten Transwells ausgesät. Die Zellen wurden 2 Tage lang kultiviert und anschließend für 7 Tage an die Luft-Flüssigkeitsgrenze gehoben. (A und B) Kultivierung in CM- und Airlift in ALI-Medium (D und E) Kultivierung und Airlift in CM-Medium. Es wurden jeweils Submerskulturen (C und F) als Kontrollen mitgeführt. Die Bilder entstanden mithilfe eines inversen Lichtmikroskops, bei 100-facher Vergrößerung. Maßstab = 100 µm

Bei allen Varianten ist eine Blaufärbung erkennbar. Die Airlift-Kulturen des ALI-Mediums (Abb. 8 A und B) sind allerdings deutlich stärker gefärbt, als die Kontrolle (Abb. 8 C). Nur an einigen Stellen sind bei den Kontrollzellen dunkelblaue bzw. farbintensivere Bereiche erkennbar. Bei der Betrachtung der Zellschichten des CM-Mediums wird sichtbar, dass die

ungewaschene Epithelschicht (Abb. 8 D) und die Kontrolle (Abb. 8 F) fast vollständig blau gefärbt sind. Auffällig ist die gewaschene Zellschicht (Abb. 8 E), welche eine lückenhafte bzw. koloniebildende Färbung mit Alcianblau aufweist, sodass an einigen Stellen der Zellrasen vollständig erkennbar ist. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen der HE-Färbung (Abb. 7 E, Punkt 5.2.1) überein. Der Waschschriff scheint sich also lediglich auf Zellen im CM-Medium auszuwirken. Ob dies positiv oder negativ ist, war zu diesem Zeitpunkt noch unbekannt.

5.2.3 Membran-Querschnitte und Zellschichtdicken-Vergleich

Epithelgewebe zeichnen sich durch einen geschlossenen, oft einschichtigen Zelllayer aus. Mit Hilfe von Querschnitten und einer H&E-Färbung sollte die Ausbildung der Zellschicht in den verschiedenen Kulturen analysiert werden. Des Weiteren sollte ermittelt werden, ob durch das Spülen des oberen Kompartiments die Dicke der Zellschicht nachweislich verringert werden kann, um dem natürlichen Epithelgewebe des Körpers nahezukommen. In Abbildung 9 sind die Querschnitte der mit Hämatoxylin-Eosin angefärbten ALI-Kulturen ersichtlich.

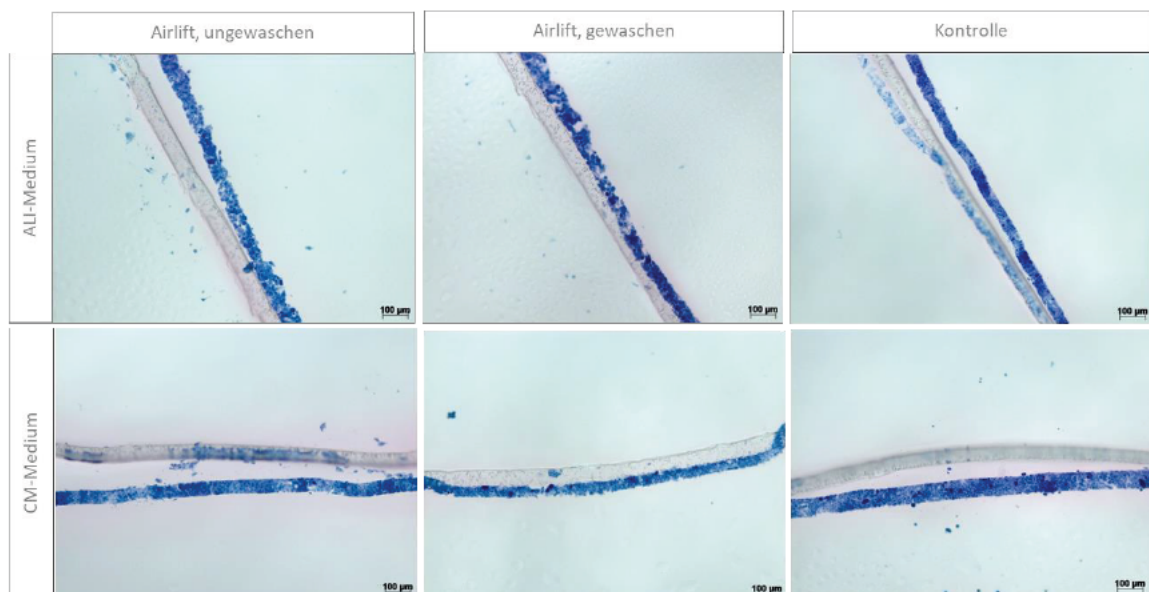


Abbildung 9: Querschnitte der unterschiedlichen Airlift-Kulturen

Die Zellschichten befanden sich 7 Tage im Airlift. Die Bilder entstanden mithilfe eines Stereomikroskops, bei 100-facher Vergrößerung. Maßstab = 100 µm.

Die farblose Schicht ist der Boden des Transwelleinsatzes und die Epithelzellen sind blau angefärbt. Häufig hat sich der Zelllayer beim Schneiden von dem Transwellboden abgelöst, dennoch ist der Zelllayer sehr gut erkennbar. Die Untersuchungen (Abb. 10) zeigen, dass die

Kultivierung in CM-Medium etwas dickere Epithelschichten ausbildet. Ein Extra-Waschschritt führte nicht zu dünneren Schichten. Die Zellschichten der in ALI-Medium kultivierten Zellen wiesen zudem deutlich mehr Lücken auf, als die Kontrolle sowie die Epithelien des CM-Mediums. Der Waschschritt verstärkt die Lücken und Ungleichmäßigkeiten in der Zellschicht des ALI-Mediums zusätzlich. Demhingegen sind beim CM-Medium durch den Waschschritt keine Lücken zwischen den einzelnen Zellen erkennbar. Der Zelllayer der Kontrolle in ALI-Medium ist sehr kompakt und weist hauptsächlich 3 übereinanderliegende Schichten auf. Die Epithelschichten in den Airlift-Kulturen bestehen überwiegend aus 3, teilweise auch aus 4 übereinander gelagerten Zellen. Die Schichtdicken der Epithelien des ALI-Mediums liegen bei ungefähr 50 μm . Die dauerhaft mit ALI-Medium überschichtete Kultur zeigt mit 40 μm die dünnste Zellschicht. Alle anderen Bedingungen unterscheiden sich nicht signifikant.

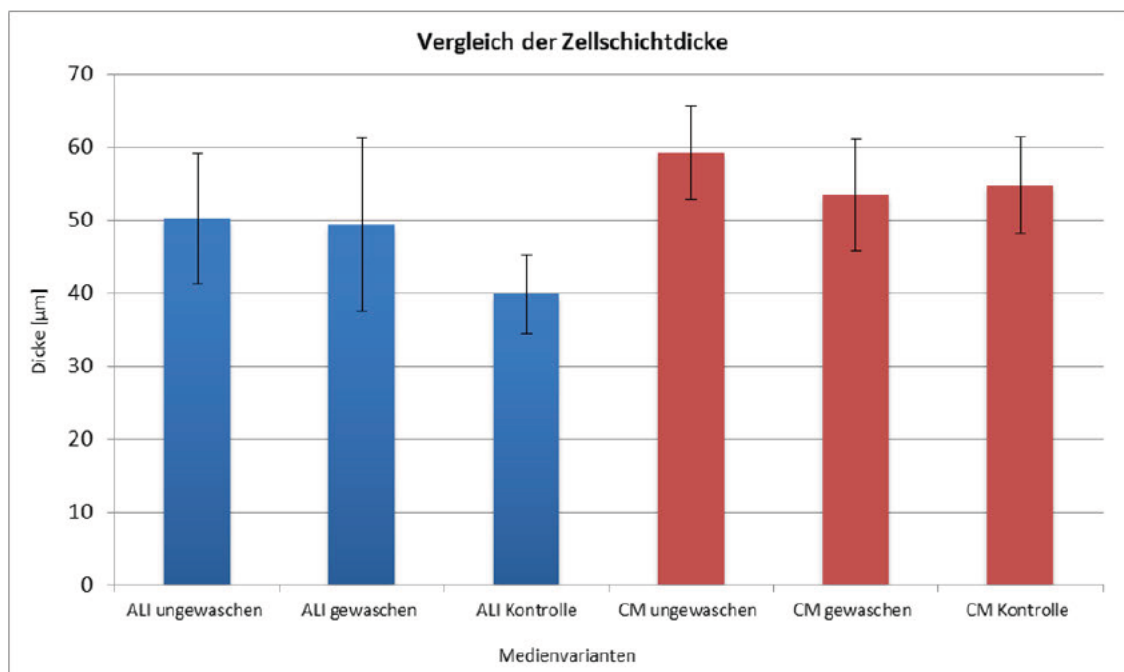


Abbildung 10: Vergleich der Zellschichtdicke

Das dargestellte Diagramm, vergleicht die Zellschichtdicken der gewaschenen und ungewaschenen Epithelien miteinander. Es wurden jeweils Kontrollen mitgeführt, die nicht an die Luft-Flüssigkeitsgrenze gehoben wurden.

5.2.4 Permeabilitätsmessung der entstandenen Epithelschicht

Eine wesentliche Eigenschaft des Epithelgewebes ist die Ausbildung einer Barrierewirkung, wodurch es zu einem reduzierten Durchgang von Molekülen durch das Epithel kommt. Die Barrierefunktion kann mittels einer Permeabilitätsmessung bestimmt werden. Hierfür wurde ein Gemisch aus Natriumfluorescein und Medium in das obere Kompartiment des Transwell-Einsatzes pipettiert und in regelmäßigen Zeitabständen Probe aus dem unteren Kompartiment

entnommen. Anschließend wurde das Fluoreszenzsignal der einzelnen Proben bestimmt, wodurch es möglich war die Durchlässigkeit des Epithels sowie des Transwellbodens zu bewerten. Für jede Variante und Kontrolle existierten drei zu untersuchende Einsätze. Ziel der Untersuchung war es, herauszufinden, welche Medien-Variante bzw. welcher Waschschritt die höchste Barriereintegrität und somit die geschlossenste Zellschicht ausbildet. Die Ergebnisse sind der Abbildung 11 zu entnehmen.

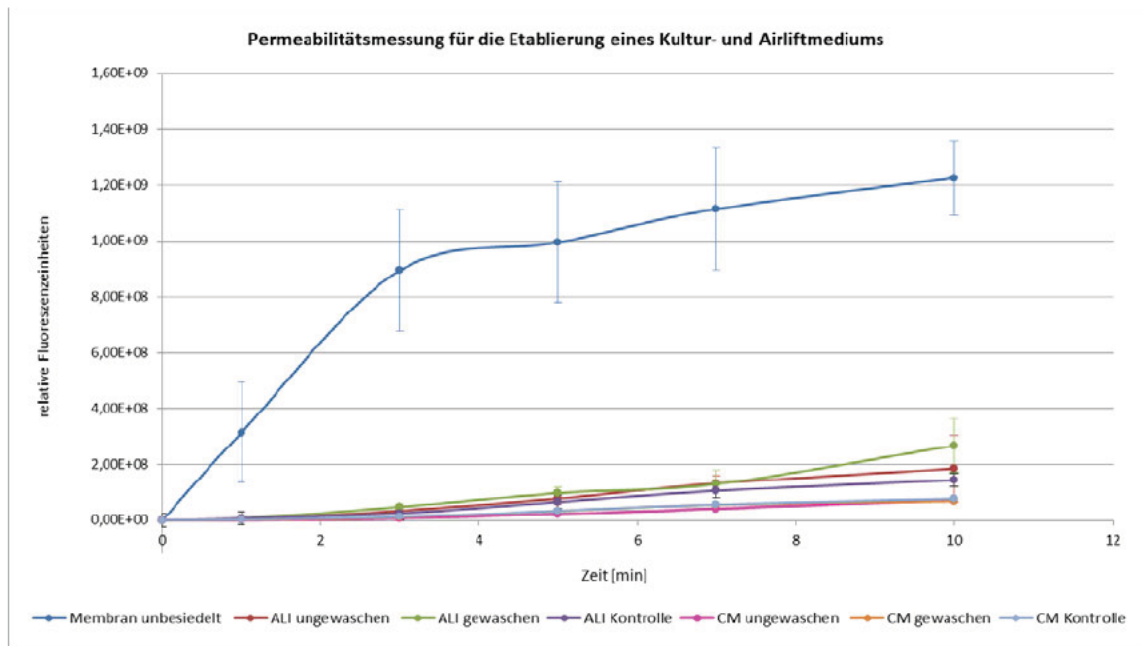


Abbildung 11: Permeabilitätsmessung der Epithelschichten

In dem Diagramm sind die Ergebnisse der Barriereemessung dargestellt. Für die Messung wurden 7-tägige Airlift-Kulturen mit verschiedenen Medien-Varianten und Wechselintervallen verwendet. Als zusätzliche Kontrolle dienten mit Kollagen beschichtete, aber unbesiedelte Transwell-Einsätze.

Anhand der Abbildung 11 ist erkennbar, dass die unbesiedelten Transwell-Einsätze im Vergleich zu den mit A549 besiedelten Transwells, eine signifikant höhere Durchlässigkeit an Natriumfluorescein besitzen, da die Poren des Transwells nicht mit Zellen verschlossen sind. Anhand des Verlaufs der anderen Funktionsgraphen wird sichtbar, dass die Zellschichten des CM-Mediums ähnliche Durchlässigkeiten aufweisen und dichter sind als die Epithelien des ALI-Mediums. Die Epithelschichten des ALI-Mediums zeigen im Gegensatz dazu deutlich höhere Durchlässigkeiten für Natriumfluorescein, wobei die Submerskultur die dichteste Barriere ausgebildet hat, gefolgt von der ungewaschenen Zellschicht. Die gewaschene Epithelschicht ist am durchlässigsten und besitzt gleichzeitig die größte Standardabweichung. Der Anstieg an relativen Fluoreszenzeinheiten verläuft bei allen Medien-Varianten nahezu linear. Zusammenfassend wird deutlich, dass das CM-Medium in den unterschiedlichen Versuchen

immer besser abschneidet. Der zusätzliche Waschschrift hat keine negative Auswirkung auf die entstandene Zellschicht und somit auf die ausgebildete Barriere, weshalb dieser zukünftig in einem geringeren Ausmaß beibehalten wird.

5.2.5 Untersuchung verschiedener Kollagensubstrate und Kultivierungstypen

Nachdem das CM-Medium als geeignetes Kultur- und Airliftmedium für die Zelllinie A549 etabliert werden konnte, galt es nun herauszufinden, welches Kollagensubstrat sich am besten für die ALI-Kultur eignet. Diesbezüglich wurden zwei verschiedene Beschichtungsvarianten untersucht. Bei der ersten Variante wurde der Transwellboden mit einem Gemisch aus SLK und PBS beschichtet, während bei der zweiten Methode eine Kollagenmembran direkt innerhalb der Einsätze erzeugt wurde. Zusätzlich zu den unterschiedlichen Kollagenuntergründen wurden Monokulturen aus A549 und Kokulturen bestehend aus A549 und EA.hy926 untersucht. Für die Aussaat der A549 wurde eine Zellzahl von 176.835 Zellen/cm² und für die EA.hy926 eine Zelldichte von 309.460 Zellen/cm² verwendet. Alle Zellen wurden für 2 Tage bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert und befanden sich anschließend für 7 Tage im Airlift. Danach wurde eine Permeabilitätsmessung mithilfe von Natriumfluorescein durchgeführt. Ziel dieser Untersuchung war es herauszufinden, welches EZM-Substrat verwendet werden muss, um eine geschlossenes Barrieremodell auszubilden. Des Weiteren sollte ermittelt werden, welcher Kultivierungstyp sich am besten für die Luft-Flüssigkeits-Grenzflächen-Zellkultur eignet. Die Ergebnisse sind der Abbildung 12 zu entnehmen. In Abbildung 12A ist sichtbar, dass die Airlift-Kulturen auf der Kollagenmembran, im Vergleich zu den Kulturen auf der SLK-Beschichtung eine höhere Durchlässigkeit an Natriumfluorescein aufweisen. Die Kultivierungstypen (Submerskultur, Mono- und Kokultur) unterscheiden sich dabei nicht (Abb. 12 B und C). Es gibt allerdings einen Trend, dass die Kokultur auf beiden Substraten die geschlossenste Barriere ausbildet. Betrachtet man ausschließlich die beschichteten Transwells (Kontrollen) wird ersichtlich, dass auch die Kollagensubstrate selbst die Durchlässigkeit für den Fluoreszenzfarbstoff mindern. Die Kollagenbeschichtung verringert den Durchgang stärker. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Barrierefunktion im direkten Zusammenhang mit dem verwendeten Kollagensubstrat steht. Die Barrierefunktion der Kollagenmembran, ist im Vergleich zur SLK-Beschichtung geringer. Die Ursache dafür ist zum bisherigen Zeitpunkt ungeklärt, allerdings besteht die Vermutung, dass die Zellen Probleme haben zu adhären.

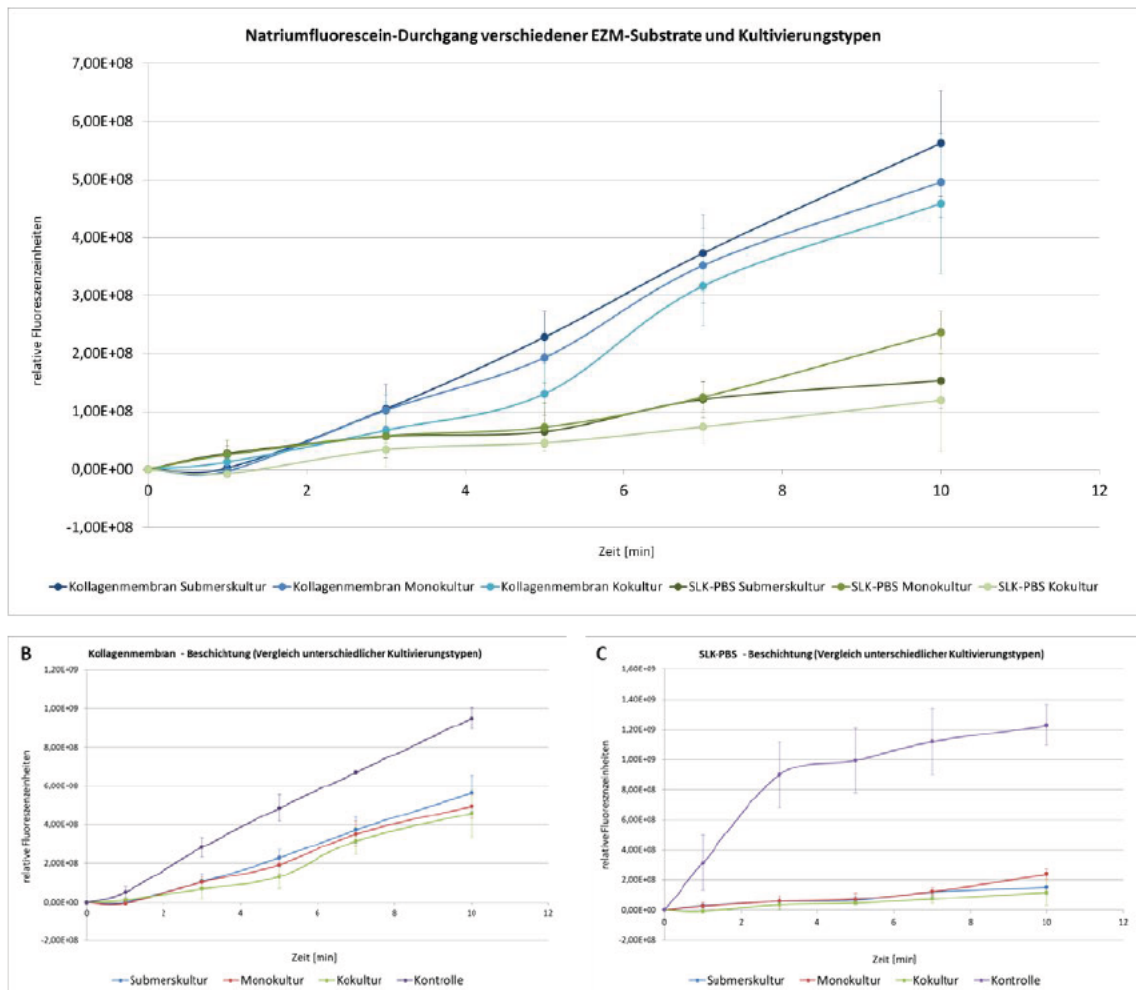


Abbildung 12: Untersuchung verschiedener Kollagensubstrate und Kultivierungstypen

In den Diagrammen A bis C sind die Ergebnisse der Permeabilitätsmessung mit Natriumfluorescein dargestellt. Für die Messung wurde die Karzinomzelllinie A549 verwendet, welche für 2 Tage kultiviert wurde und sich anschließend 7 Tage im Airlift befand. Diagramm A zeigt den Vergleich der verschiedenen Kollagensubstrate. In B und C sind die Untergründe noch einmal getrennt aufgetragen und um die Kontrolle (Submerskultur) ergänzt.

5.2.6 Auswirkungen der Kollagenvernetzung auf die Barriere

Dadurch, dass die untersuchte Kollagenmembran bei der Permeabilitätsmessung zu einer geringen Barrierefunktion führte, galt es diesbezüglich die Ursache zu ermitteln. Es bestand die Vermutung, dass die Membran als Anhaftungsuntergrund zu weich sei, wodurch die Zellen nicht in der Lage sind sich vollständig anzuhafte. Dieser Zusammenhang ist anhand der lichtmikroskopischen Aufnahmen erkennbar (Abb. 13). Es wird deutlich, dass die Zellen der Kollagenmembran eine stark abgerundete Morphologie aufweisen und nahezu keine Zellkontakte ausgebildet haben. Im Gegensatz dazu wirken die Zellen auf der SLK-Beschichtung deutlich vitaler, was anhand der vollständigen Adhäsion sowie der zahlreich ausgebildeten Zellkontakte sichtbar wird.

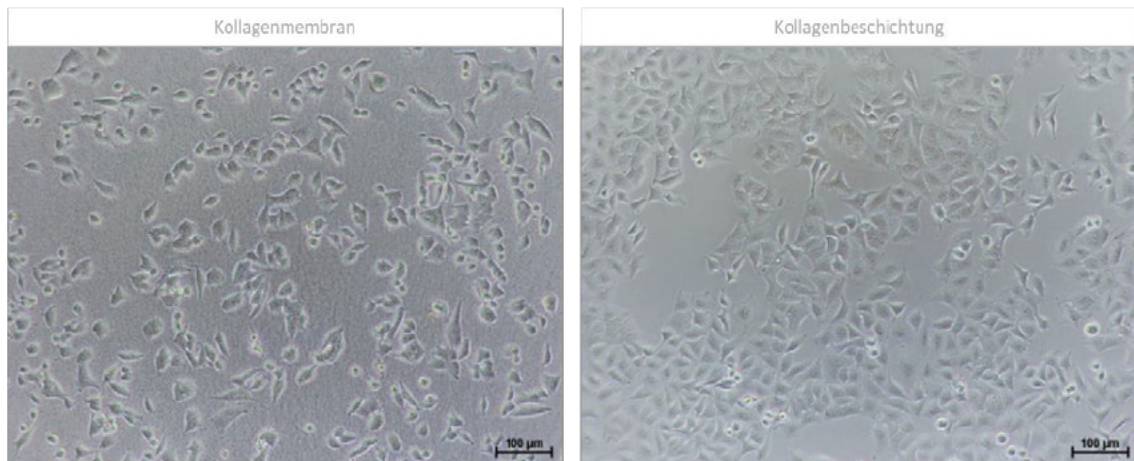


Abbildung 13: A549 auf unterschiedlichen Kollagensubstraten

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen visualisieren die Zelllinie A549 jeweils kultiviert auf der Kollagenmembran sowie auf der SLK-PBS-Beschichtung. Die Bilder wurden mithilfe eines inversen Lichtmikroskops, bei 100-facher Vergrößerung aufgenommen. Maßstab = 100 µm

Die Steifigkeit des Kollagens kann durch eine Erhöhung der Kollagenkonzentration oder durch eine Vernetzung der einzelnen Kollagenfibrillen mithilfe von 2 % EDC beeinflusst werden. Daher wurden Transwell-Einsätze mit $217 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ oder doppelt mit $384 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ SLK beschichtet. Einige dieser Membranen wurden zusätzlich mit 2 % EDC vernetzt. Auf die fertigen Kollagenmembranen wurden anschließend A549 ausgesät, welche 2 Tage lang bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert wurden und sich daraufhin 7 Tage im Airlift befanden. Es wurden zusätzlich Airlift-Kulturen auf mit SLK-PBS beschichteten Transwells, als Kontrolle mitgeführt. Eine verbesserte Zellausbreitung auf den modifizierten Substraten sollte sich in einer besseren Barriere äußern. Für die Untersuchung der entstandenen Barriere wurde eine Permeabilitätsmessung durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt. Es wird deutlich, dass alle Airlift-Kulturen entgegen der Erwartungen auf den zu untersuchenden Kollagenmembranen eine signifikant höhere Durchlässigkeit aufweisen als die Kontrollkulturen auf SLK-PBS. Betrachtet man ausschließlich die Kollagenmembranen, wird sichtbar, dass die Airlift-Kultur mit der ursprünglichen Hydrogel-Variante ($217 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, unvernetzt) am dichtesten ist. Damit wird deutlich, dass die Durchlässigkeit nicht über die Kollagenmenge oder eine Vernetzung gesteuert werden kann. Die Standardabweichungen der verschiedenen Membranen zeigen, dass die Unterschiede zwischen den einzelnen Beschichtungsmethoden nicht signifikant sind, weshalb man keine der Hydrogel-Varianten besser bewerten kann. Anhand dieser Ergebnisse ist zu sehen, dass eine Vernetzung mit EDC, die in der Regel zu einer Versteifung führt, nicht in der Lage war die Barrierefunktion des ALI-Modells zu verbessern.

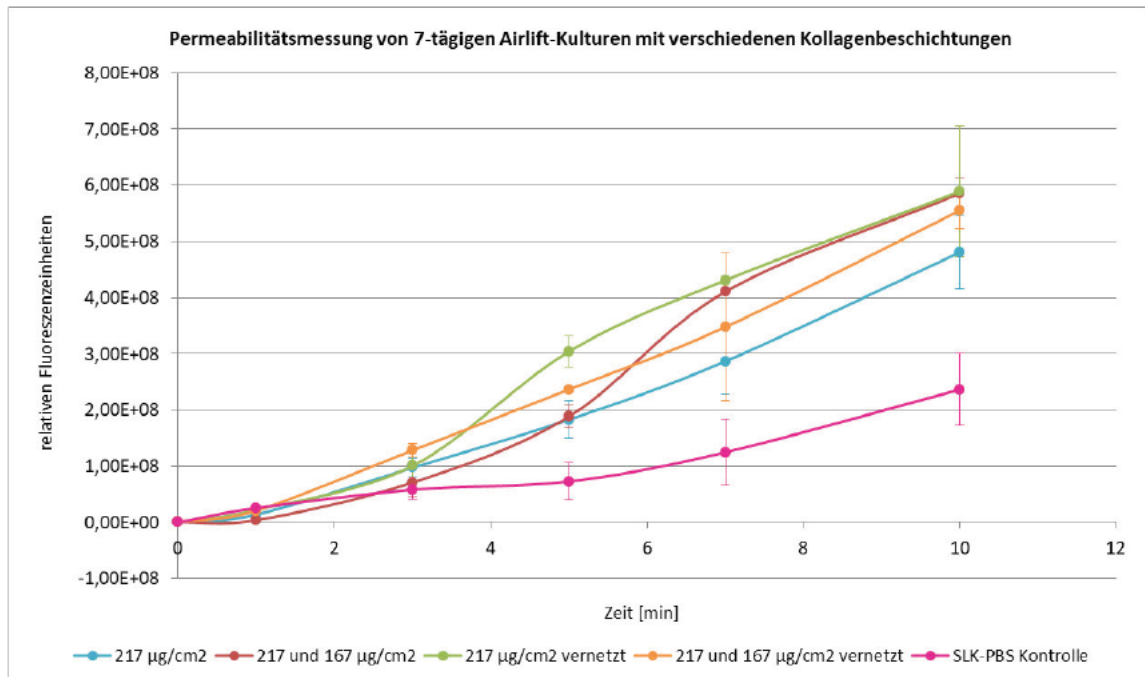


Abbildung 14: Untersuchung verschiedener Kollagenkonzentrationen und –vernetzungen

Im Diagramm sind die Ergebnisse der Permeabilitätsmessung von 7-tägigen Airlift-Kulturen dargestellt. A549-Zellen wurden auf unterschiedlichen Kollagenmembranen, mit oder ohne Vernetzung kultiviert.

5.2.7 Zytotoxizitätstest für verschiedene Anhaftungssubstrate

Ein Anhaftungssubstrat, welches die Proliferation der Zellen fördert, ist für ein erfolgreiches ALI-Modell unerlässlich. In den Ergebnissen zuvor konnte herausgefunden werden, dass sich die Kollagenmembran als EZM-Substrat nicht für die Airlift-Kultur eignet. Die Steifigkeit des Substrates war nicht der Grund. Um auszuschließen, dass die Membran für die Zellen unverträglich ist, wurde ein Zytotoxizitätstest durchgeführt. Hierfür wurden die Vertiefungen einer 96 well Platte mit den zu untersuchenden Beschichtungsvarianten (Kollagenmembran und SLK-PBS) behandelt und anschließend A549 ausgesät. Die Zellzahl wurde hierbei so gewählt, dass nach 5-tägiger Kultivierung eine Konfluenz von 80 % erreicht war. Die Stoffwechselaktivität konnte anschließend mithilfe des XTT-Tests bestimmt werden. Von jeder Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt, als Kontrolle wurden einige Zellen zusätzlich mit TritonX100 behandelt. Die Ergebnisse sind der Abbildung 15 zu entnehmen. Anhand des Diagrammes wird sichtbar, dass die Kollagenmembran als Wachstumsuntergrund mit ca. 75 % eine geringere Stoffwechselaktivität aufweist als die Beschichtung. Die Standardabweichung zeigt, dass einzelne Proben auch unterhalb der Zytotoxizitätsgrenze von 70 % liegen. Im Gegensatz dazu ermöglicht die Beschichtung mit SLK-PBS sehr hohe Stoffwechselraten über 90 %. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Kollagenmembran als Anhaftungssubstrat für die Zelllinie A549 ungeeignet ist. Die Zellen können vermutlich

schlechter adhären und dadurch wahrscheinlich auch schlechter proliferieren. Die resultierende geringere Zellzahl verhindert die Barrierebildung. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse wird zukünftig nur noch die Beschichtung mit SLK-PBS für die Transwell-Einsätze verwendet.

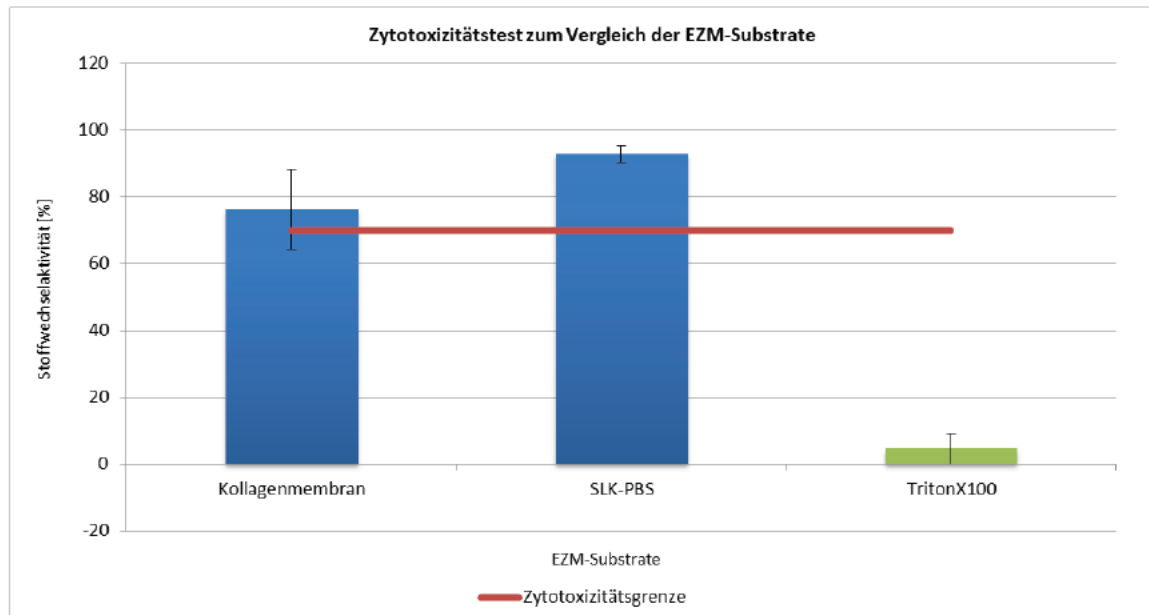


Abbildung 15: Zytotoxizitätstest zum Vergleich der Kollagensubstrate

In dem Diagramm sind die Ergebnisse des Zytotoxizitätstest für die zu vergleichenden Kollagensubstrate dargestellt. Es wurde zusätzlich eine Kontrolle mit TritonX100 mitgeführt.

5.2.8 Überprüfung der Funktionalität des entwickelten ALI-Modells mittels TGF- β 1

Es ist bekannt, dass der Wachstumsfaktor TGF- β 1 das natürliche Lungenepithel des Körpers beeinflusst. Die Behandlung mit TGF- β 1 erhöht die Durchlässigkeit des Epithels und stört somit die alveoläre Barriere. Ziel des Versuches war es deshalb herauszufinden, ob das Epithel im entwickelten ALI-Modell eine ähnliche Reaktion auf TGF- β 1 zeigt und damit ein physiologisches Verhalten aufweist. Für den Versuch wurden ALI-Kulturen mithilfe der Zelllinie A549 erzeugt. Die Zellen wurden für 2 Tage kultiviert und befanden sich anschließend 7 Tage im Airlift, um eine vollständig geschlossene Barriere auszubilden. Ab dem 7. Tag wurden dem Medium des unteren Kompartiments 10 ng/ml TGF- β 1 hinzugefügt, diese Behandlung erfolgte anschließend für 48 Stunden. Danach wurde die Barriere des Modells mittels einer Permeabilitätsmessung unter Verwendung von Natriumfluorescein überprüft. Es wurden zusätzlich Kontrollen mitgeführt, welche nicht mit TGF- β 1 behandelt wurden. Die Ergebnisse der Barriermessung sind der Abbildung 16 zu entnehmen. Es ist gut sichtbar, dass die mit TGF- β 1 behandelten ALI-Kulturen eine deutlich höhere Durchlässigkeit an Natriumfluorescein aufweisen als die

unbehandelten Kulturen. Aufgrund dessen ist davon auszugehen, dass der Wachstumsfaktor, wie erhofft, die Ausbildung der epithelialen Barriere stört. Dieses Erkenntnis bestätigt wiederum die Funktionalität des erzeugten Modells, da es in der Lage ist, die Reaktionen des *in vivo* Gewebes *in vitro* zu rekonstruieren.

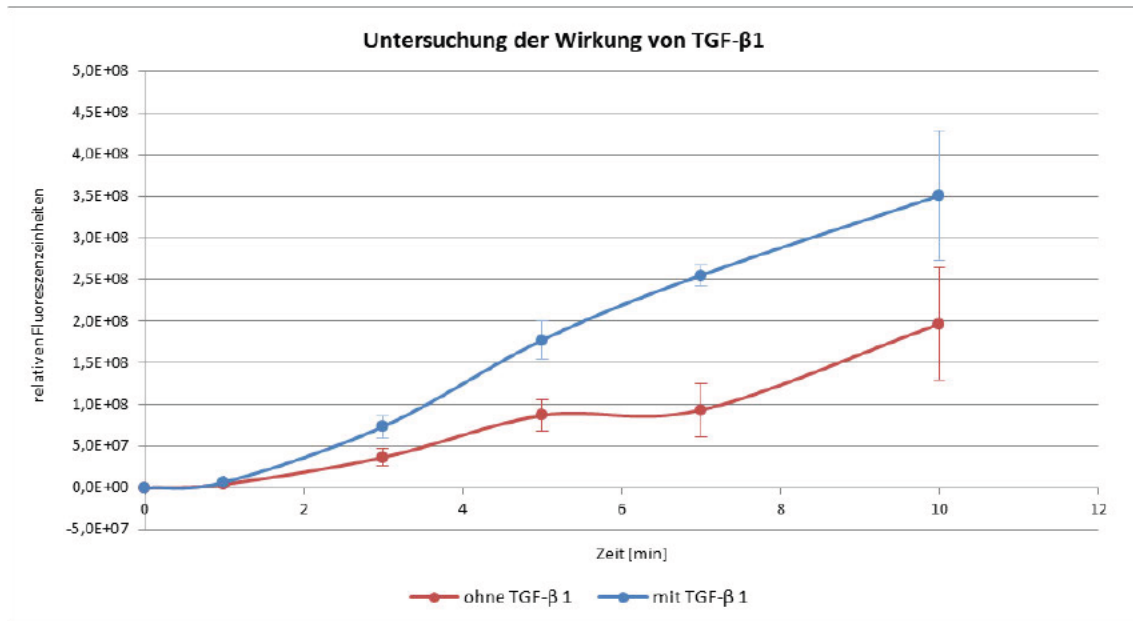


Abbildung 16: Permeabilitätsmessung einer mit TGF- β 1 behandelten ALI-Kultur

Für die Erzeugung der ALI-Kulturen, wurde die Zelllinie A549 verwendet. Diese wurden nach 7-tägigen Airlift für 48 Stunden mit 10 ng/ml TGF- β 1 behandelt. Anschließend wurden die ausgebildeten Barrieren mithilfe von Natriumfluorescein-Durchgängen bestimmt.

5.2.9 Untersuchung epithelspezifischer Markerproteine im entwickelten ALI-Modell

Die Immunfluoreszenzfärbung ist ein biochemisches Analyseverfahren, um gezielt Antigene mittels Fluoreszenz sichtbar zu machen. Sobald humane Epithelzellen in einer Monoschicht kultiviert werden, kann es zum Verlust spezieller Markerproteine kommen. Im Gegensatz dazu führt die Kultivierung von Epithelzellen an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche zur Expression zelltypspezifischer Marker. Ziel war es deshalb, das Vorkommen gewebespezifischer Proteine in der ALI-Kultur mittels Immunfluoreszenz nachzuweisen. Die aufzuzeigenden Proteine waren das Wassertransportprotein AQP5, das Tight Junction Protein ZO1, das Surfactant Protein SFTPC und das Protein α -Tubulin, welches einen wichtigen Bestandteil der an der mukoziliären Clearance beteiligten Zilien darstellt. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden Airlift-Kulturen mithilfe der Lungenkarzinomzelllinie A549 erzeugt, diese befanden sich 7 Tage im Airlift und wurden anschließend mit 3 % PFA fixiert. Daraufhin wurden die Membranen über Nacht mit ihrem Primär- und nach 24 Stunden mit dem dazugehörigen Sekundärantikörper inkubiert. Die

Visualisierung erfolgte mithilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Untersuchung sind der Abbildung 17 zu entnehmen.

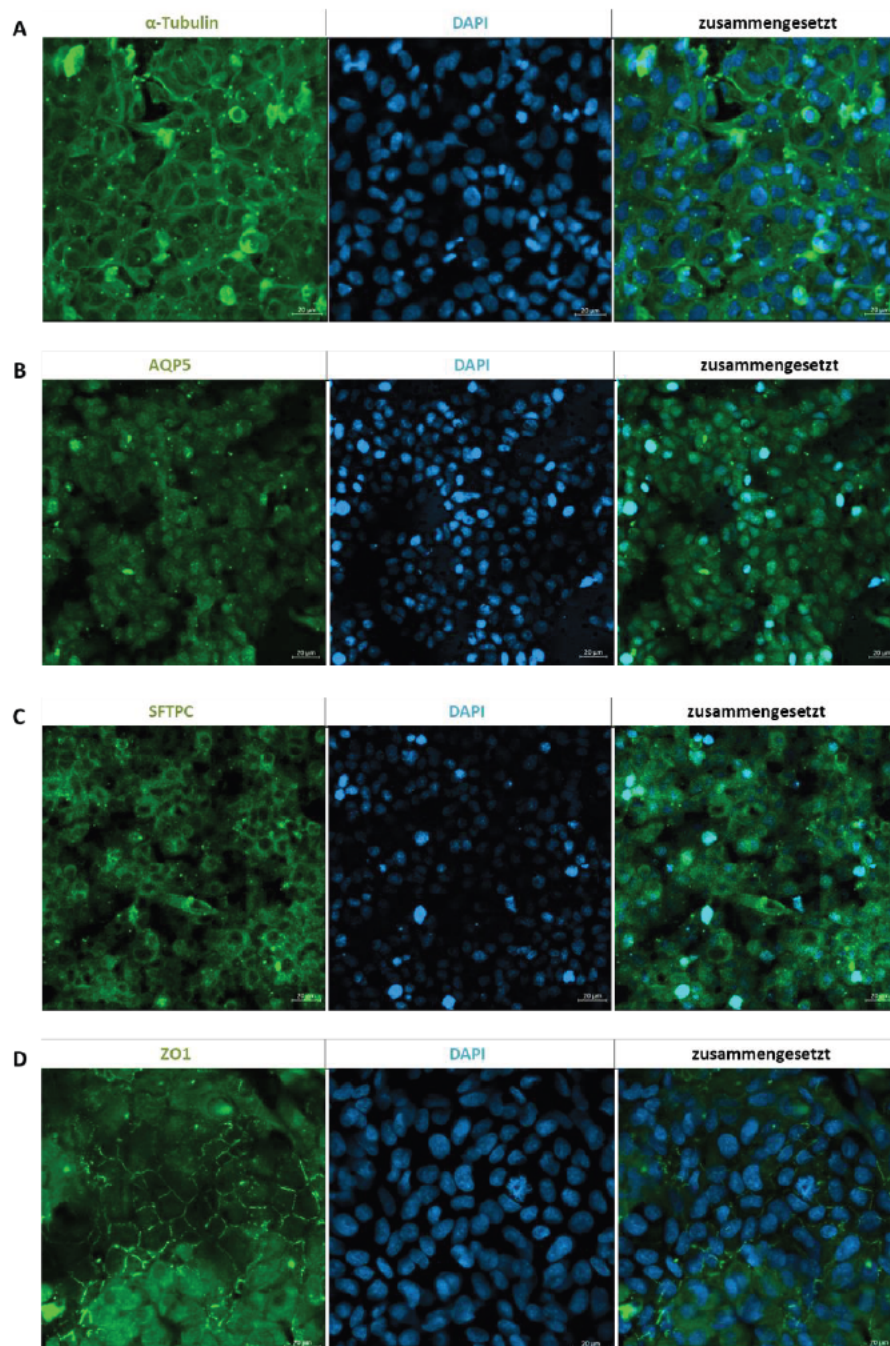


Abbildung 17: Immunfluoreszenzfärbung 7-tägiger Airlift-Kulturen

Mithilfe einer Immunfluoreszenzfärbung wurden 7-tägige ALI-Kulturen der Zelllinie A549 auf ihre Expression zelltypspezifischer Marker untersucht. Es wurden sowohl Bilder für jedes Protein, als auch für die dazugehörigen Zellkerne (DAPI) aufgenommen und diese letztendlich zusammengesetzt. (A) Zilien-Protein α -Tubulin (B) Wassertransportprotein AQP5 (C) Surfactant Protein SFTPC und (D) Tight Junction Protein ZO1. Die Bilder wurden mithilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops, bei 200-facher Vergrößerung aufgenommen, Maßstab = 20 μm .

Es ist sichtbar, dass alle untersuchten Markerproteine in den 7-tägigen Airlift-Kulturen vorzufinden sind. Das Zilien-Protein α -Tubulin wurde besonders stark exprimiert und weist ein komplexes und geschlossenes Netzwerk auf (Abb. 17 A). Im Gegensatz dazu ist die Expression des Wassertransportproteins AQP5 und des Surfactant Proteins SFTPC nur stellenweise ausgeprägt (Abb. 17 B und C). Man kann anhand dieser Bilder sehr gut erkennen, dass die Expression der beiden Proteine räumlich begrenzt ist und sich nicht über die gesamte Zellschicht erstreckt. Im Gegensatz dazu wurde das Tight Junction Protein ZO1 über die gesamte Membranoberfläche exprimiert (Abb. 17 D). Dies zeigt, dass die Zellen ein geschlossenes Netzwerk mit Zellverbindungen ausbilden, welche wiederum die Grundlage für eine dichte und geschlossene Barriere darstellen. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass mithilfe der Immunfluoreszenzfärbung die Expression spezieller, in der Lunge vorkommender Proteine nachgewiesen werden konnte. Mithilfe dieser Ergebnisse wird einerseits die Funktionalität und andererseits die Aussagekraft des erzeugten Modells bestätigt, da es in der Lage ist zelltypspezifische Marker der Atemwege zu exprimieren und somit deren Funktion *in vitro* zu rekonstruieren.

5.3 Zytotoxizitätstest für die Etablierung eines Kokulturmediums

Da bekannt ist, dass sich die Ausbildung einer guten Barrierefunktion durch eine Interaktion mit anderen Zelltypen verbessern kann, sollten die Auswirkungen einer Kokultur untersucht werden. Bei einer Kokultur werden zwei verschiedene Zelltypen, hier A549 und EA.hy926 oder HBEpC und HUVEC gleichzeitig miteinander kultiviert. Um optimale Kultivierungsbedingungen gewährleisten zu können, ist es notwendig ein Medium zu etablieren, welches von beiden Zelltypen gleichermaßen akzeptiert wird. Hierfür wurden zwei Zytotoxizitätstests mit den zu untersuchenden Medien durchgeführt und die jeweiligen Stoffwechselaktivitäten der Zellen gemessen. Für die Etablierung eines Kokulturmediums der Zelllinien A549 und EA.hy926 wurden die Standardmedien DMEM, DMEM mit Glucose und CM untersucht. Das DMEM-Medium mit Glucose ist das in der Literatur etablierte Kulturmedium für die Endothelzelllinie EA.hy926. Das CM-Medium ist das Standardmedium für die Epithelzelllinie A549. Es wurden außerdem verschiedene Medien-Varianten untersucht, um herauszufinden ob sich die Mischung spezieller Medien positiv auf das Zellwachstum auswirkt. Hierfür wurden alle Standardmedien mit CM-Medium, in einem Verhältnis von 1:1 gemischt. Die genauen Zusammensetzungen der einzelnen Medien sowie Medienbezeichnungen sind der Tabelle 4 (Punkt 4.6, Seite 35) zu entnehmen. Die Epithelzellen A549 wurden für 4 Tage und die

Endothelzellen EA.hy926 für 7 Tage mit der jeweilige Medien-Variante inkubiert und die Stoffwechselraten mittels XTT-Test bestimmt. Für die Etablierung eines Kokulturmediums der Primärzellen HBepC und HUVEC wurden ebenfalls verschiedene Medien untersucht. Einerseits das EBM-Vollmedium, welches das Standardkulturmedium der HUVEC darstellt und andererseits das ALI-Basalmedium, welches in der Literatur für die Kultivierung der HBepC beschrieben ist. Zudem wurde auch hier ein 1:1 Mischungsverhältnis der beiden Medien getestet. Die Primärzellen wurden beide für 4 Tage in den zu untersuchenden Medien kultiviert, danach erfolgte wiederum der eigentliche Zytotoxizitätstest mithilfe der XTT-Reagenz. Die Ergebnisse der Zytotoxizitätstests sind der Abbildung 18 zu entnehmen.

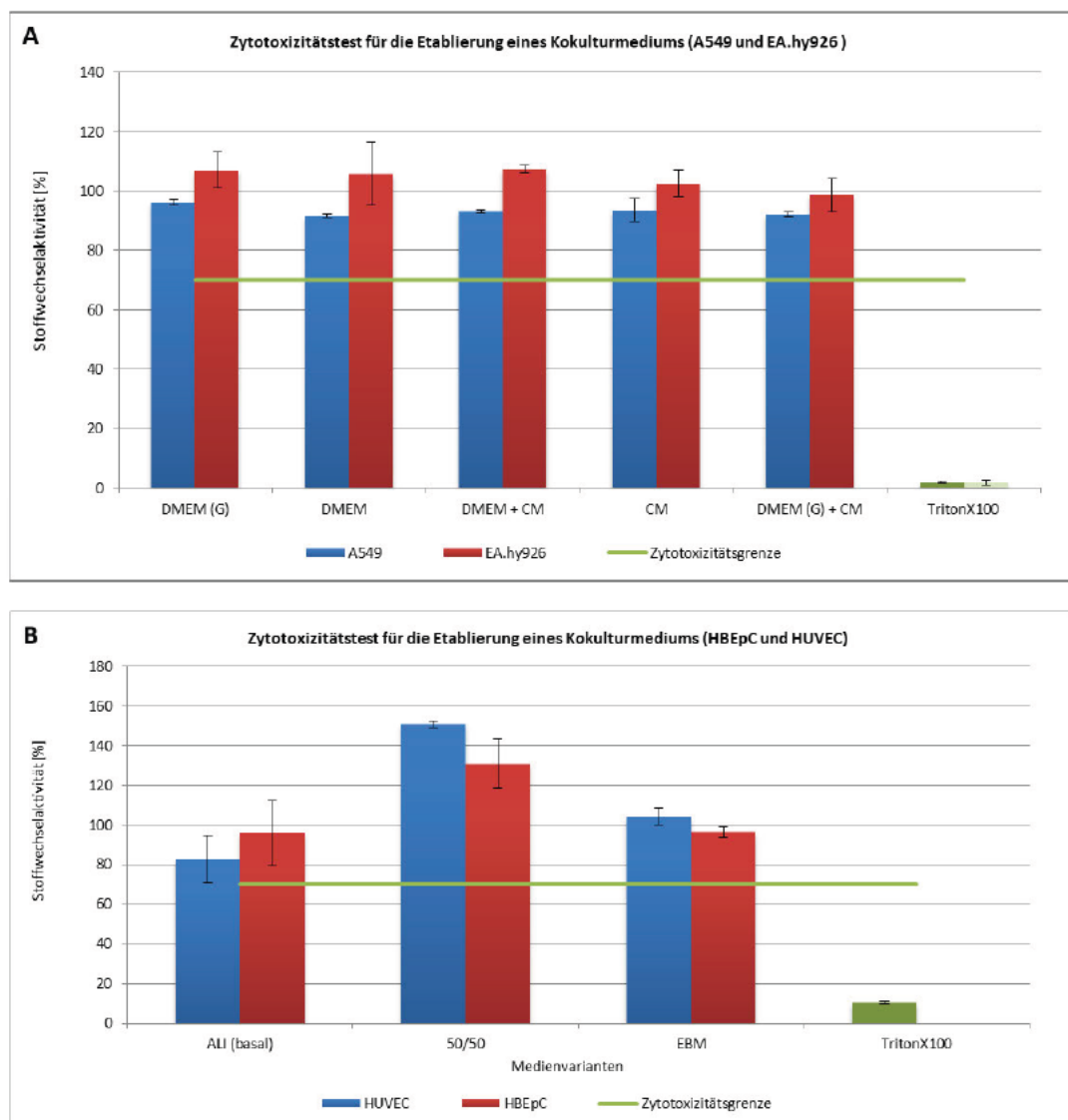


Abbildung 18: Zytotoxizitätstest für die Etablierung der Kokulturmedien

Diagramm A zeigt die Ergebnisse des Zytotoxizitätstests für die Zelllinien A549 und EA.hy926. Diagramm B visualisiert die Ergebnisse für die Primärzellen HBepC und HUVEC. Als Positivkontrolle wurden einige Zellen mit TritonX100 behandelt.

Das in Abbildung 18A dargestellte Diagramm zeigt die Stoffwechselaktivitäten der Endothelzelllinie EA.hy926 und der Karzinomzelllinie A549. Die Zellen befanden sich dazu nicht im gleichen Well. Anhand des Säulendiagramms wird sichtbar, dass die beiden Zelllinien bei allen Medien sehr hohe Stoffwechselaktivitäten, im Bereich von 87 % bis 100 % erreicht haben. Diese Stoffwechselraten liegen somit alle weit oberhalb der Zytotoxizitätsgrenze von 70 %. Das Medium mit der höchsten Stoffwechselaktivität für beide Zelltypen stellt das DMEM-Medium mit Glucose dar. Das Diagramm in Abbildung 18B zeigt die Ergebnisse des Zytotoxizitätstests für die primären Endothelzellen HUVEC und die Bronchialepithelzellen HBEpC. Anhand des Säulendiagrammes wird sichtbar, dass mit allen untersuchten Medien-Varianten sehr hohe Stoffwechselaktivitäten über 80 % erreicht werden konnten. Überraschenderweise erreichen die humanen primären Bronchialepithelzellen in ihrem eigenen Standardkulturmedium (ALI-Basalmedium) die geringsten Stoffwechselraten. Die Stoffwechselaktivitäten beider Zelltypen sind im ALI-Basalmedium am geringsten, gefolgt vom EBM-Vollmedium. Die Kultivierung der Zellen in dem 1:1-Mischungsverhältnis aus EBM- und ALI-Basalmedium ermöglichte die höchsten Stoffwechselraten, weshalb diese Medien-Variante für die zukünftige Kultivierung beider Zellen verwendet wird.

5.4 Etablierung eines Airliftmediums der primären Bronchialepithelzellen HBEpC

Nachdem eine geeignete Zellzahl für die Primärzellen etabliert werden konnte, galt es ein geeignetes Airlift-Medium zu finden. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Medien untersucht. Einerseits das Kulturmedium für die Bronchialzellen und andererseits ein Air-Liquid-Interface-Medium, welches auf den Airlift primärer Bronchialepithelzellen spezialisiert ist. Beide Medien stammen von der Firma PromoCell. Das ALI-Basalmedium ist ausschließlich für die Kultivierung von primären Lungenzellen vorgesehen. Im Gegensatz dazu enthält das Air-Liquid-Interface-Medium nur wenige Wachstumsfaktoren, um die proliferierende Zellpopulation während des Airlifts aufrechtzuerhalten. Zusätzlich sollte auch ein geeignetes Airlift-Medium für die Kokultur bestehend aus HBEpC und HUVEC gefunden werden. Diesbezüglich wurde deren Kokulturmedium, bestehend aus 50 % EBM- und 50 % ALI-Basalmedium sowie das bereits angesprochene Air-Liquid-Interface-Medium untersucht. Ein gut entwickeltes Airlift-Modell sollte letztendlich anhand der Produktion von Lungensurfactant und der Ausbildung einer geschlossenen Zellschicht festgemacht werden. Für die Untersuchung der ALI-Kulturen, wurden diese mit Hämatoxylin-Eosin und Alcianblau angefärbt. Für die Beurteilung der

ausgebildeten Barriere wurde eine Permeabilitätsmessung mithilfe von Natriumfluorescein durchgeführt.

5.4.1 Alcianblau- und H&E-Färbung zur Untersuchung der primären Epithelschichten

Um zu untersuchen welches Medium sich am besten für den Airlift der Primärzellen eignet, wurde eine Hämatoxylin-Eosin und eine Alcianblau-Färbung durchgeführt. Die beiden Farbstoffe Hämatoxylin und Eosin sind histologisch und färben das Gewebe sowie die Strukturen der Zellen an. Im Gegensatz dazu ist Alcianblau in der Lage, das von den Becherzellen abgesonderte Mucin sichtbar zu machen. Das Ziel dieser Untersuchung bestand darin, ein geeignetes Airlift-Medium sowohl für die Mono- als auch für die Kokultur zu etablieren. Die Schwerpunkte bestanden diesbezüglich in der Ausbildung einer geschlossenen Zellschicht und der Absonderung einer schützenden Surfactantschicht. Hierfür wurden 221.043 HBEpC/cm² und 176.835 HUVEC/cm² auf mit Kollagen beschichteten Transwell-Einsätzen ausgesät und für 2 Tage bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert. Die Zellen befanden sich anschließend für 14 Tage und somit doppelt so lange wie die Zelllinien im Airlift. Alle Epithelschichten der Monokulturen wurden in ALI-Basalmedium kultiviert und für den Airlift entweder auf Air-Liquid-Interface-Medium umgestellt oder nicht. Die Kultivierung der Kokulturen erfolgte in einem Medium-Gemisch, bestehend aus EBM- und ALI-Basalmedium. Der Airlift erfolgte anschließend entweder in diesem oder dem bereits angesprochenen Air-Liquid-Interface-Medium. Die Ergebnisse sind der Abbildung 19 zu entnehmen. Anhand der Bilder der Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist zu sehen, dass alle untersuchten Medien-Varianten eine geschlossene Zellschicht ausgebildet haben. Besonders die Epithelschicht des Air-Liquid-Interface-Mediums wirkt sehr geschlossen und weist keine sichtbaren intrazellulären Zwischenräume auf (Abb. 19 B). Bei der Zellschicht des ALI-Basalmediums (Abb. 19 A) sind im Gegensatz dazu die einzelnen Zellen sehr gut erkennbar, was vermutlich ein mehrschichtiges Zellwachstum ausschließt. Besonders auffällig ist die Zellschicht der Submerskultur, welche als Kontrolle fungiert und sich dauerhaft in Medium befand (Abb. 19 C). Diesbezüglich ist ein stark ausgeprägtes, koloniebildendes Zellwachstum ersichtlich. Anhand der Abbildungen der Alcianblau-Färbung wird deutlich, dass alle untersuchten Zellschichten nur eine sehr leichte Blaufärbung aufweisen. Die beiden Monokulturen (Abb. 19 A und B) wurden am stärksten angefärbt. Das Epithel, dessen Airlift in Air-Liquid-Interface-Medium erfolgte (Abb. 19 A) wirkt im Vergleich zu der Zellschicht des Kulturmediums (Abb. 19 B) homogener und farbintensiver. Die beiden Epithelschichten der Kokulturen zeigen nahezu keine Färbung (Abb. 19 D und E).

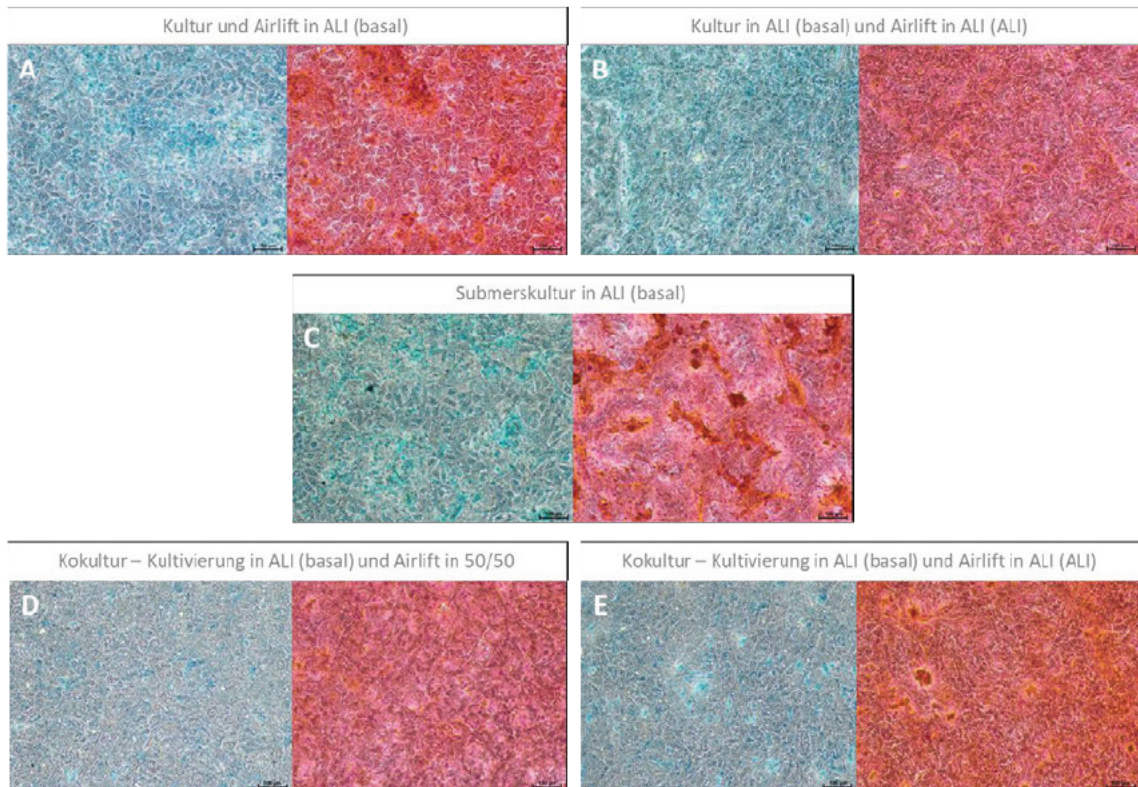


Abbildung 19: H&E- und Alcianblau-Färbung der primären Epithelien

Für die Färbungen wurden HBEpC und HUVEC auf mit Kollagen beschichteten Einsätzen ausgesät. Die Zellen wurden für 2 Tage bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert und befanden sich anschließend für 14 Tage im Airlift. (A und B) Monokulturen kultiviert in ALI-Basalmedium (C) Submerskultur dauerhaft in ALI-Basalmedium (D und E) Kokulturen kultiviert in 50 % EBM- und 50 % ALI-Basalmedium. Der Airlift erfolgte in (A) ALI-Basalmedium (B und E) Air-Liquid-Interface-Medium (D) EBM- und ALI-Basalmedium. Die Bilder wurden mithilfe eines inversen Lichtmikroskops bei 100x Vergrößerung aufgenommen. Maßstab = 100 μ m

5.4.2 Permeabilitätsmessung der primären Epithelien

Nachdem die Zellschichten der Primärzellen mittels H&E- und Alcianblau-Färbung untersucht wurden, galt es anschließend mithilfe einer Permeabilitätsmessung herauszufinden, welche Medien-Variante die geschlossenste Zellschicht und somit die beste Barriere ausbildet. Für die Messung wurden die 14-tägigen Airlift-Kulturen aus Punkt 5.4.1 verwendet. Die Ergebnisse sind der Abbildung 20 zu entnehmen. Anhand des Diagrammes wird sichtbar, dass die Monokultur des Air-Liquid-Interface-Mediums die geringste Durchlässigkeit an Natriumfluorescein aufweist und somit die geschlossenste Barriere ausgebildet hat. Überraschenderweise sind die beiden untersuchten Kokulturen deutlich durchlässiger. Diesbezüglich muss allerdings nochmal differenziert werden, da die Zellschicht des Mediengemischs eine bessere Barriere ausgebildet hat, als die des Air-Liquid-Interface-Mediums. Zusätzlich ist erkennbar, dass die Submerskultur des ALI-Basalmediums eine höhere Durchlässigkeit als die Kokulturen besitzt, diese sich aber nicht signifikant voneinander

unterscheiden. Die lückenhafteste Epithelschicht, stellt die Monokultur des ALI-Basalmediums dar, weshalb vermutlich davon auszugehen ist, dass mit diesem Medium keine geschlossene und reproduzierbare Barriere ausgebildet werden kann. Die Ergebnisse der durchgeführten Permeabilitätsmessung können mit den Erkenntnissen der zuvor durchgeführten Färbungen (siehe 5.4.1) korreliert werden. Das Air-Liquid-Interface-Medium scheint die Barriere und somit die Funktionalität der Airlift-Kultur positiv zu beeinflussen.

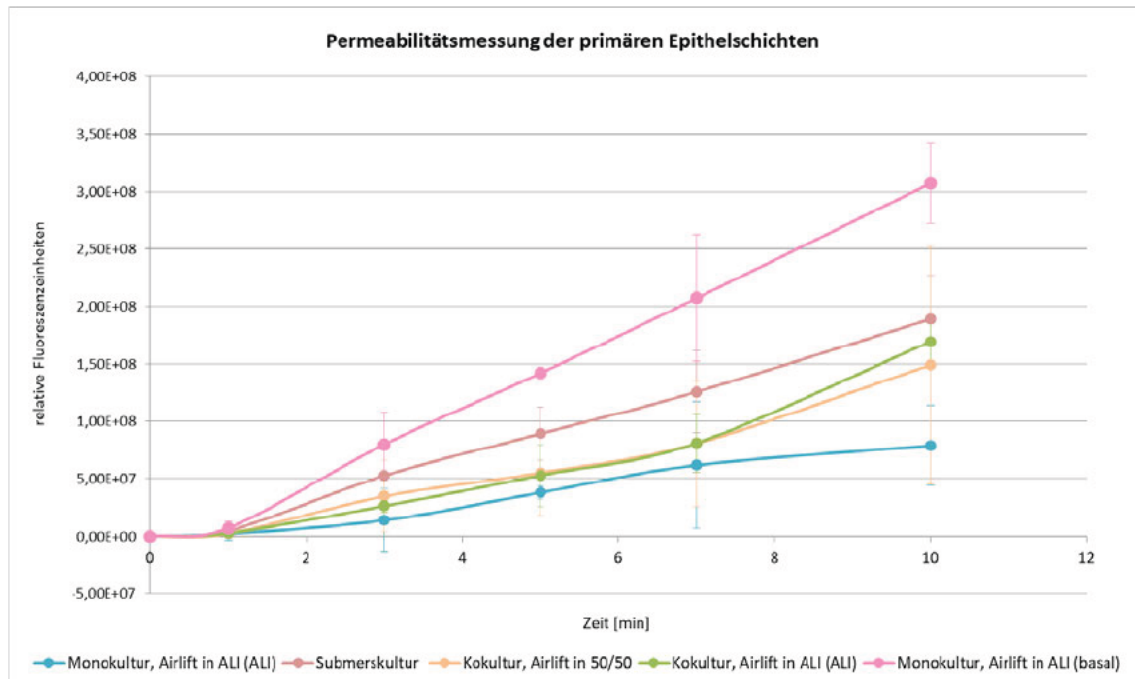


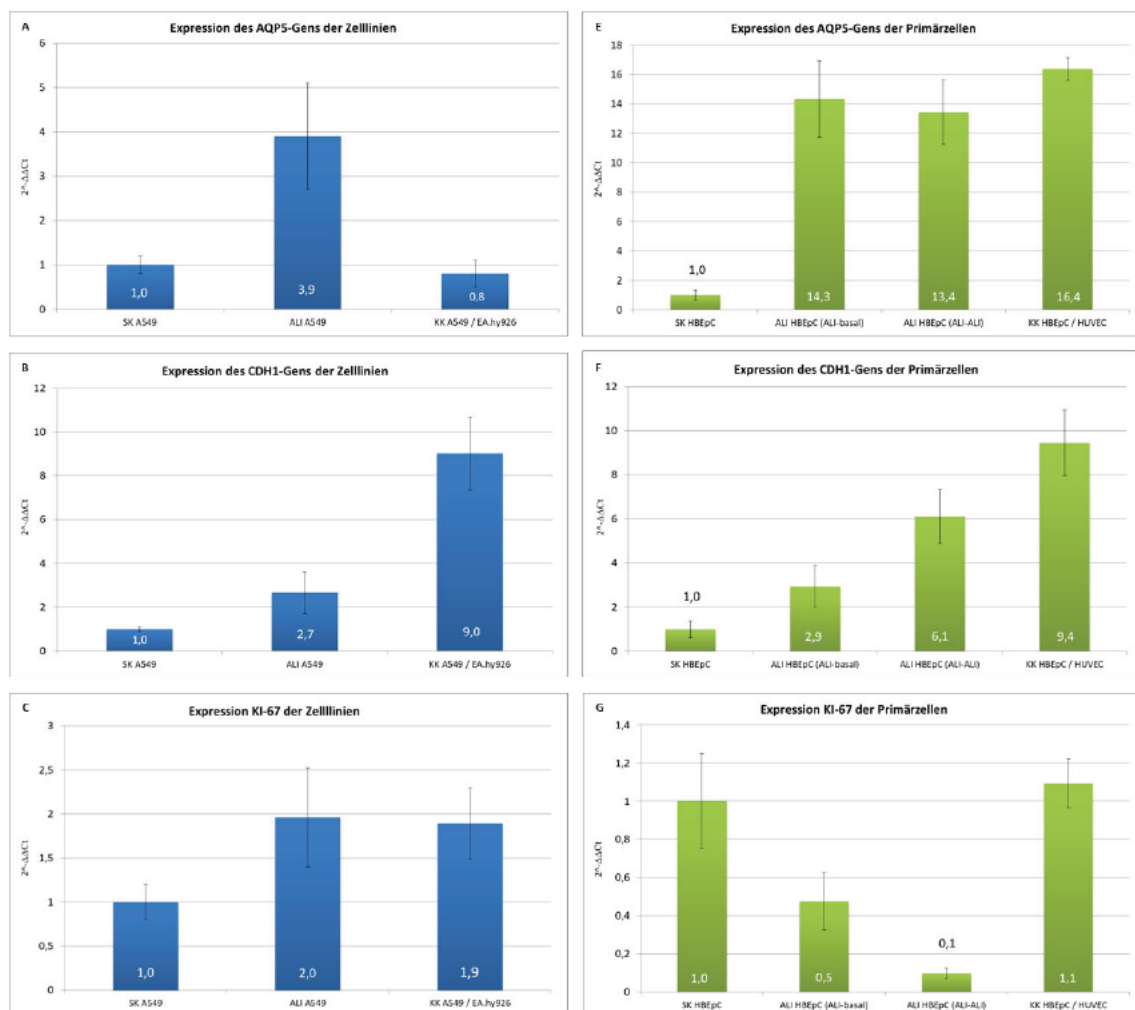
Abbildung 20: Permeabilitätsmessung der primären Epithelschichten

Für die Messung wurden 14-tägige Airlift-Kulturen verwendet. Die Abkürzungen stehen für: ALI (ALI) = Air-Liquid-Interface-Medium, ALI (basal) = ALI-Basalmedium, 50/50 = Mediengemisch aus EBM- und ALI-Basalmedium, in einem Verhältnis von 1:1.

5.5 Untersuchung der Genexpression im ALI-Modell und in Gegenwart von kokultivierten Endothelzellen

Die quantitative Real-Time PCR ist eine Vervielfältigungsmethode von Nukleinsäuren und gleichzeitig in der Lage die gewonnene DNA zu quantifizieren. Es wurden folgende Gene analysiert: das Proliferationsgen KI-67, das Wassertransportgen AQP5, das CDH-1 Gen, das Muzin-Gen und das Housekeeping-Gen GAPDH. Das Ziel bestand darin, herauszufinden, ob sich die Expression pulmonaler Gene im ALI-Modell verändert, sobald Endothelzellen hinzugefügt werden. Als zu untersuchende Proben wurden unterschiedlichste ALI-Kulturen erzeugt. Für die Rekonstruktion des Atemwegsepithels kamen die Zelllinie A549 und die primären Bronchialepithelzellen HBEpC zum Einsatz. Für die Nachbildung des Endothelgewebes der

Blutgefäße wurde die Zelllinie EA.hy926 und die Primärzellen HUVEC verwendet. Mithilfe der qRT-PCR sollten die Unterschiede zwischen Mono-, Ko- und Submerskulturen verglichen werden. Zusätzlich sollten auch die Auswirkungen des verwendeten Mediums auf die Genexpression untersucht werden. Die genauen Proben sind der Tabelle 6 zu entnehmen (Punkt 4.10.1, Seite 38). Für die PCR kamen spezifische Sonden zum Einsatz, die dabei entstandenen Produkte wurden anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Die Genexpression konnte mithilfe der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode berechnet werden. Für die Berechnung wurden Kontrollen benötigt, welche auf 1 gesetzt wurden. Hierfür kamen jeweils die Submerskulturen der Primärzellen und Zelllinien zum Einsatz. Anhand der Ergebnisse der qRT-PCR und der Elektrophorese lassen sich nicht nur Rückschlüsse auf die Menge an exprimierten Genen ziehen, sondern es kann auch die Aussagekraft des jeweiligen Modells beurteilt werden. Die Ergebnisse sind der Abbildung 21 zu entnehmen. Diesbezüglich sind die Genexpressionsprofile der Zelllinien A549 und EA.hy926 den Darstellungen A bis D und die Ergebnisse für die Primärzellen HBEPc und HUVEC den Abbildungen E bis H zu entnehmen.



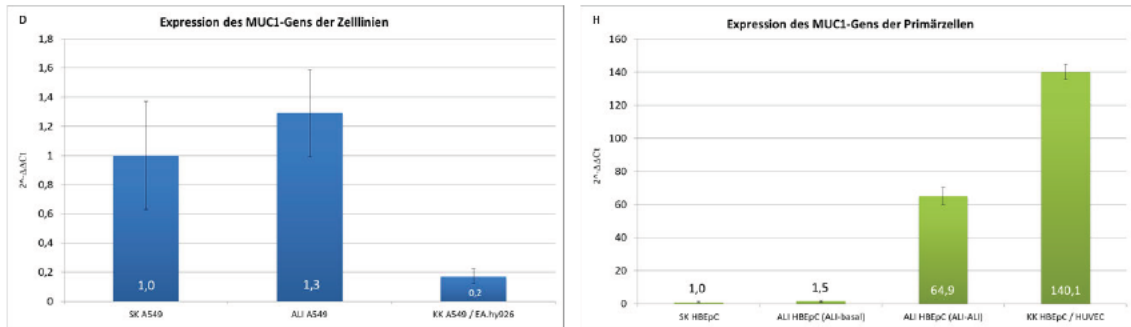


Abbildung 21: Genexpressionsprofile unterschiedlicher Airlift-Kulturen

Die Werte wurden mithilfe der $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet. Die Ergebnisse der jeweiligen Gene sind in den folgenden Abbildungen zu entnehmen: AQP5 (Abb. A und E), CDH1 (Abb. B und F), KI-67 (Abb. C und G) und MUC1 (Abb. D und H). Die Darstellungen A bis D zeigen die Expressionsprofile der Zelllinien A549 und EA.hy926. Die Diagramme E bis H beinhalten die Ergebnisse für die Primärzellen HBEpC und HUVEC.

Anhand der Ergebnisse für die Zelllinien A549 und EA.hy926 (Abb. 21 A bis D) fällt auf, dass die Expression pulmonaler Gene in den Airlift- und Kokulturen, im Vergleich zu der Submerskultur häufig hochreguliert ist. Das Wassertransportgen AQP5 wurde in der Airlift-Kultur etwa 4-mal so hoch exprimiert, wie in der Submerskultur (Abb. 21 A). Allerdings wies die Kokultur eine deutlich geringe Expression an AQP5 auf, welche mit der Expression innerhalb der Submerskultur gleichzusetzen ist. Das CDH1 Gen wurde im Gegensatz dazu, bei beiden Kultivierungstypen erhöht exprimiert (Abb. 21 B). Diesbezüglich konnte bei der Kokultur eine sehr hohe Expression an CDH1 festgestellt werden, welche etwa 9-mal oberhalb der Submerskultur lag. Die Airlift-Kultur wies eine 3-fach höhere Expression als die Submerskultur auf, welche wiederum im Vergleich zu der Kokultur sehr gering ist. Die Expression des Proliferationsmarkers KI-67 war sowohl in der Airlift- als auch in der Kokultur etwa doppelt so hoch, wie bei der Submerskultur (Abb. 21 C). Bezüglich der Standardabweichungen sind keine signifikanten Unterschiede zwischen Airlift- und Kokulturen erkennbar. Das MUC1 Gen wurde ausschließlich in der Airlift-Kultur erhöht exprimiert, allerdings sind die Unterschiede zwischen der Airlift- und der Submerskultur nicht signifikant, weshalb ungewiss ist, ob wirklich von einer Hochregulierung auszugehen ist (Abb. 21 D). Innerhalb der Kokultur konnte nahezu keine Expression des MUC1-Gens festgestellt werden. Die Ergebnisse für die Primärzellen HBEpC und HUVEC (Abb. 21 E bis H) zeigen, dass die Expression pulmonaler Gene nicht ausschließlich auf den Kultivierungstyp sondern auch auf das verwendete Medium zurückzuführen ist. Das Wassertransportgen AQP5 wurde diesbezüglich in allen Proben sehr hoch exprimiert (Abb. 21 E). Die Kokultur zeigte eine etwa 16-fach höhere Expression an AQP5, im Vergleich zur Submerskultur. Die beiden Airlift-Kulturen wiesen eine ca. 14-fach erhöhte Expression auf.

Anhand der Fehlerbalken ist allerdings erkennbar, dass diese Unterschiede nicht signifikant sind. Das CDH1 Gen wurde ebenfalls in allen Proben vermehrt exprimiert, diesbezüglich wurde die höchste Expression innerhalb der Kokultur festgestellt, welche etwa 10-fach gesteigert vorlag (Abb. 21 F). Gefolgt von der Airlift-Kultur des Air-Liquid-Interface-Mediums mit einer 6-fachen und der des ALI-Basalmediums mit einer 3-fach erhöhten CDH1-Expression. Diese Werte sind mit den Ergebnissen für die Zelllinien A549 und EA.hy926 gleichzusetzen (Abb. 21 B). Der Proliferationsmarker KI-67 wurde wie erwartet in allen Kulturen nur sehr gering exprimiert (Abb. 21 G). Die höchsten Expressionen wurden diesbezüglich sowohl in den Submers- als auch in den Kokulturen festgestellt. Die beiden Kultivierungstypen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Die geringste Expression wurde in der Airlift-Kultur des Air-Liquid-Interface-Mediums nachgewiesen, welche im Vergleich zu der Submerskultur etwa 10-mal geringer war. Das MUC1-Gen wurde besonders in der Airlift-Kultur des Air-Liquid-Interface-Mediums sowie der Kokultur exprimiert (Abb. 21 H). Die MUC1-Expression der Kokultur lag etwa 140-fach und die des Air-Liquid-Interface-Mediums etwa 65-mal gesteigert vor. Die Airlift-Kultur des ALI-Basalmediums wies nur eine leichte Erhöhung der Genexpression auf. Die entstandenen PCR-Produkte wurden letztendlich elektrophoretisch aufgetrennt. Dadurch, dass alle Gene in den untersuchten Proben vorzufinden waren, führte die Auftrennung zu immer gleichen Ergebnissen, weshalb für die Darstellung (Abb. 22) immer nur ein Beispielbild verwendet wurde.

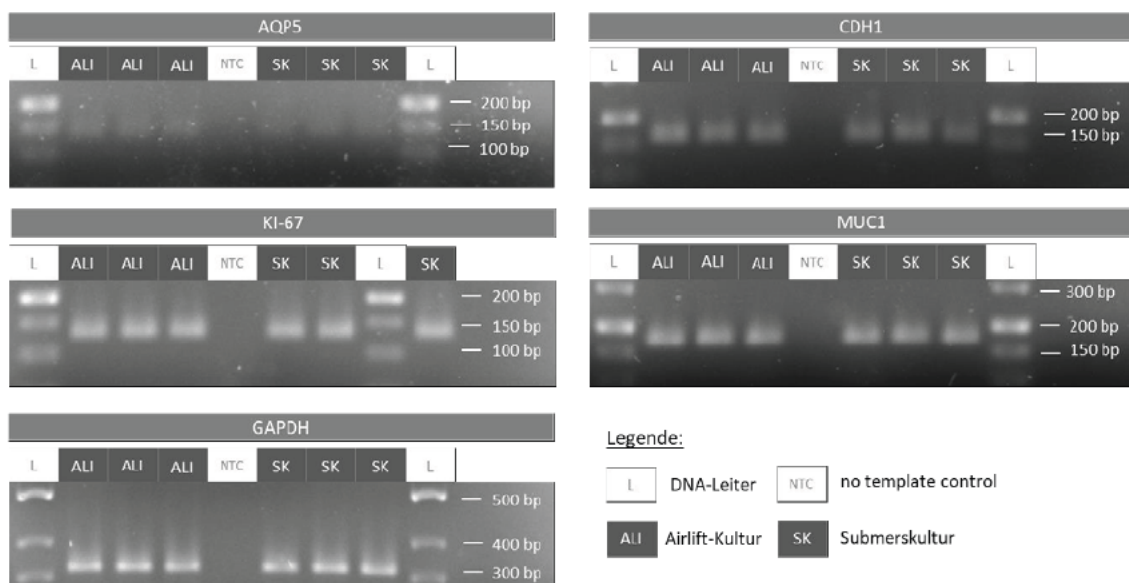


Abbildung 22: Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte. Die Bilder entstanden in einer Dunkelkammer und wurden mithilfe von UV-Licht (260 nm) fotografiert. Alle untersuchten ALI-Kulturen wurden mithilfe der Zelllinien A549 und EA.hy926 und den Primärzellen HBEPc und HUVEC erzeugt.

Anhand dieser Bilder ist erkennbar, dass für alle Gene das zu erwartende PCR-Produkt amplifiziert wurde. In den Spuren der no-template-control sind keine Banden vorzufinden, wodurch Verunreinigungen im Master Mix und Wasser ausgeschlossen werden können. Die Größe der PCR-Produkte beträgt für: AQP5 150 bp, CDH1 und MUC1 170 bp, KI-67 140 bp und GAPDH 320 bp. Diese gewonnenen Ergebnisse widerlegen die Annahme, dass ausschließlich die an der Luft-Flüssigkeitsgrenze kultivierten Zellen in der Lage sind zelltypspezifische Marker der Atemwege zu exprimieren. Trotz alledem konnte festgestellt werden, dass die Expression pulmonaler Gene in den Airlift- und Kokulturen teilweise signifikant hochreguliert ist.

5.6 Erste Untersuchungen mithilfe des MPSstimulus

Neben der Interaktion mit anderen Zelltypen ist die mechanische Stimulation des Lungenepithels ein weiterer wichtiger Aspekt, der die Funktionalität des Gewebes beeinflusst. Auch dieser Einflussfaktor sollte in der vorliegenden Arbeit zumindest kurz beleuchtet werden. Für das Nachstellen der Atembewegung innerhalb der Lungenbläschen stand das MPSstimulus-System vom Fraunhofer IWS zur Verfügung. Hierbei handelt es sich um ein Gerät, das durch Aufbringen von Druckluft auf ein elastisches Material, eine Auslenkung (Beugung) der Oberfläche bewirkt. Es wurde für die Verwendung mit Transwell-ähnlichen Einsätzen konzipiert, welche auch als Netwells bezeichnet werden. Diese Netwells wurden mit einem Kollagenhydrogel beschichtet (Punkt 4.1.4), welches zu einer Kollagenmembran fibrillierte.

5.6.1 Überprüfung der Durchlässigkeit von Kollagenmembranen

Eine vollständig geschlossene Kollagenmembran ist eine wichtige Voraussetzung für die zukünftig angestrebten Dehnungsversuche, da Lücken Angriffspunkte für Risse und Verletzungen darstellen. Zudem kann die *in vivo* Situation nur durch eine geschlossene EZM-Schicht rekonstruiert werden, da diese als Anhaftungssubstrat der Zellen fungiert und in der Lage ist eine gute Barrierefunktion zu gewährleisten. Für die Durchlässigkeits-Untersuchung wurden verschiedene Kollagenmembranen verwendet. Für sieben Kollagenbeschichtungen wurden ausschließlich $217 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ SLK und für zwei weitere, ein Gemisch aus SLK und Elastin verwendet. Elastin stellt ein essentielles Faserprotein des menschlichen Körpers dar, welches für die Struktur und Formgebung von Geweben verantwortlich ist. Es erhöht die Dehnungsfähigkeit und ist somit eine wichtige Voraussetzung für die Rekonstruktion der dynamischen Bewegung während des Atmens. Das Ziel dieser Untersuchung bestand darin, festzustellen, wie sich die Zusammensetzung der einzelnen Kollagenschichten auf deren

Durchlässigkeit und somit auf die Barriereintegrität auswirkt. Zudem galt es herauszufinden, ob die mit Elastin behandelten Membranen vollständig undurchlässig für TRITC-Dextran sind und sich somit wiederum für die angestrebten Dehnungsversuche eignen. Für die Messung wurde in das obere Kompartiment der Netwells, ein Gemisch aus TRITC-Dextran und Medium pipettiert. Es erfolgte in regelmäßigen Zeitabständen eine Probenentnahme aus dem unteren Kompartiment. Die Proben wurden anschließend auf ihren Gehalt an fluoreszierenden Molekülen untersucht. Die Ergebnisse des Dextran-Durchgangs sind dem Diagramm (Abb. 23) zu entnehmen.

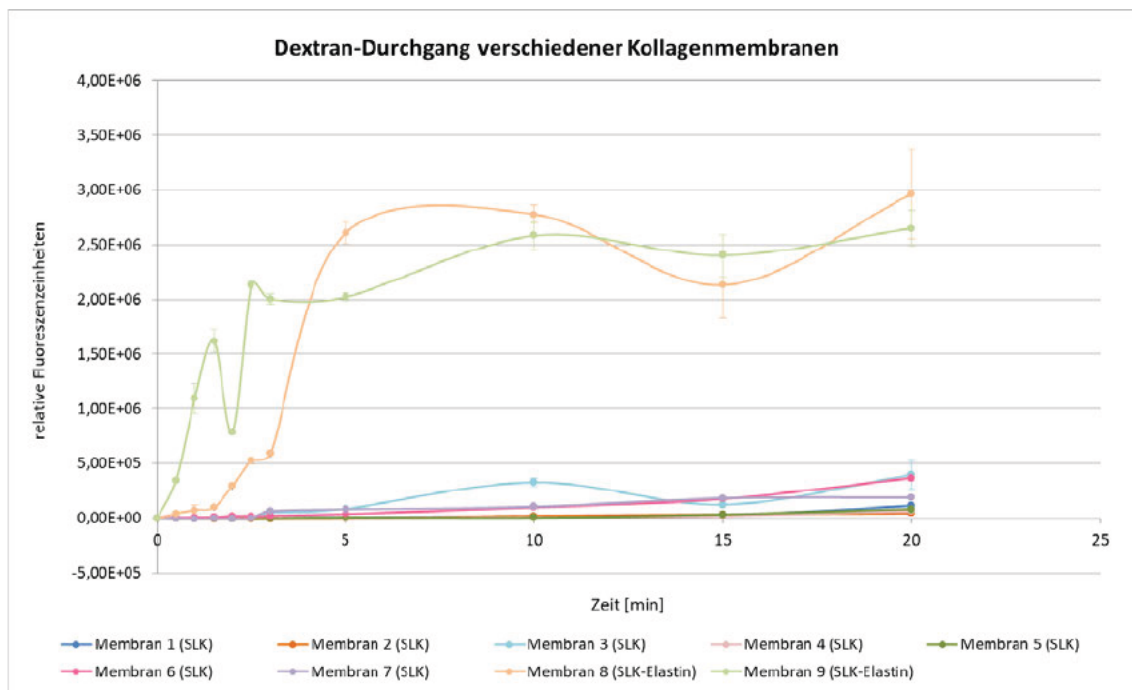


Abbildung 23: Dextran-Messung verschiedener Kollagenmembranen

Für die Messung wurden verschiedene Kollagenmembranen erzeugt. Einige SLK-Membranen wurden zusätzlich mit Elastin behandelt.

Anhand des Verlaufs der Funktionsgraphen wird sichtbar, dass die Membranen welche mit SLK und Elastin beschichtet wurden eine deutlich höhere Durchlässigkeit an Dextran aufweisen, als die ausschließlich mit SLK beschichteten Einsätze. Betrachtet man insbesondere die SLK-Membranen fällt auf, dass diese sich in ihrer Durchlässigkeit nicht signifikant voneinander unterscheiden. Nur zwei der angesprochenen Membranen weisen eine etwas höhere Permeabilität auf. Allerdings ist davon auszugehen, dass in jedem der sieben Fälle eine geschlossene Barriere ausgebildet wurde. Im Vergleich dazu besitzen die SLK-Elastin-Membranen eine deutlich höhere Permeabilität. Diesbezüglich ist anzunehmen, dass das verwendete Elastin das Kollagennetzwerk destabilisiert, wodurch keine Barriere ausgebildet

werden kann. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass der Zusatz von Elastin zu den Kollagenmembranen von Nachteil ist, da die wichtigste Voraussetzung für eine funktionierende und reproduzierbare mechanische Stimulation, eine geschlossene Beschichtung des Polymernetzes ist. Aufgrund dessen kommt zukünftig nur noch die SLK-Membran für die Beschichtung der Netwells zum Einsatz.

5.6.2 Auslenkungsexperimente der Kollagenmembranen

Nachdem bestimmt wurde, welche Kollagenschicht geeignet ist, um ein dichtes Anhaftungssubstrat zu bilden. Sollte untersucht werden, ob sich ein mit Kollagen beschichtetes elastisches Substrat auslenken lässt. Zudem sollte der Zusammenhang zwischen der Durchlässigkeit und der maximal erreichbaren Auslenkung festgestellt werden. Für die Untersuchung wurden sieben verschiedenen und mit Kollagen beschichteten Einsätze verwendet und anschließend im MPSstimulus-System geprüft (Membranen aus Punkt 5.6.1). Für die Messung der einzelnen Auslenkungen, wurden unterschiedliche Drücke am MPSstimulus angelegt, welche stetig um 10 mbar, bis zu einem Maximalwert von 100 mbar erhöht wurden. Die Messwerte sind dem Diagramm (Abb. 24 A) zu entnehmen. Das Diagramm zeigt die Auslenkungen der einzelnen Membranen. Es wird deutlich, dass zwischen den SLK-Membranen starke Unterschiede bezüglich der Auslenkung existieren. Einige Membranen lassen sich bei einem Druck von 100 mbar sehr stark auslenken, wie bspw. Membran 5 und einer Auslenkung von ca. 345 μm und andere nur sehr geringfügig, wie die Membran 6 mit 120 μm . Es fällt auf, dass die meisten Kollagenmembranen ihre maximale Auslenkung bei Drücken zwischen 60 mbar und 80 mbar erreichen. Danach verläuft die Auslenkung entweder konstant oder fällt stark ab. Um zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen der Geschlossenheit und der Auslenkung der Kollagenmembranen besteht, wurden die Ergebnisse des Dextran-Durchgangs ausschließlich für die SLK-Membranen in Diagramm B (Abb. 24) dargestellt. Anhand dieser Ergebnisse und den Messwerten aus Diagramm 24A wird sichtbar, dass die Geschlossenheit der Kollagenschicht nicht im direkten Zusammenhang mit der maximal möglichen Auslenkung steht. Allerdings ist die Ursache diesbezüglich ungeklärt. Trotz alledem konnte gezeigt werden, dass die Membranen derselben Beschichtungsvariante nicht immer gleichermaßen ausgelenkt werden können, wodurch eine Verallgemeinerung für die prozentuale Auslenkung eine Herausforderung darstellt.

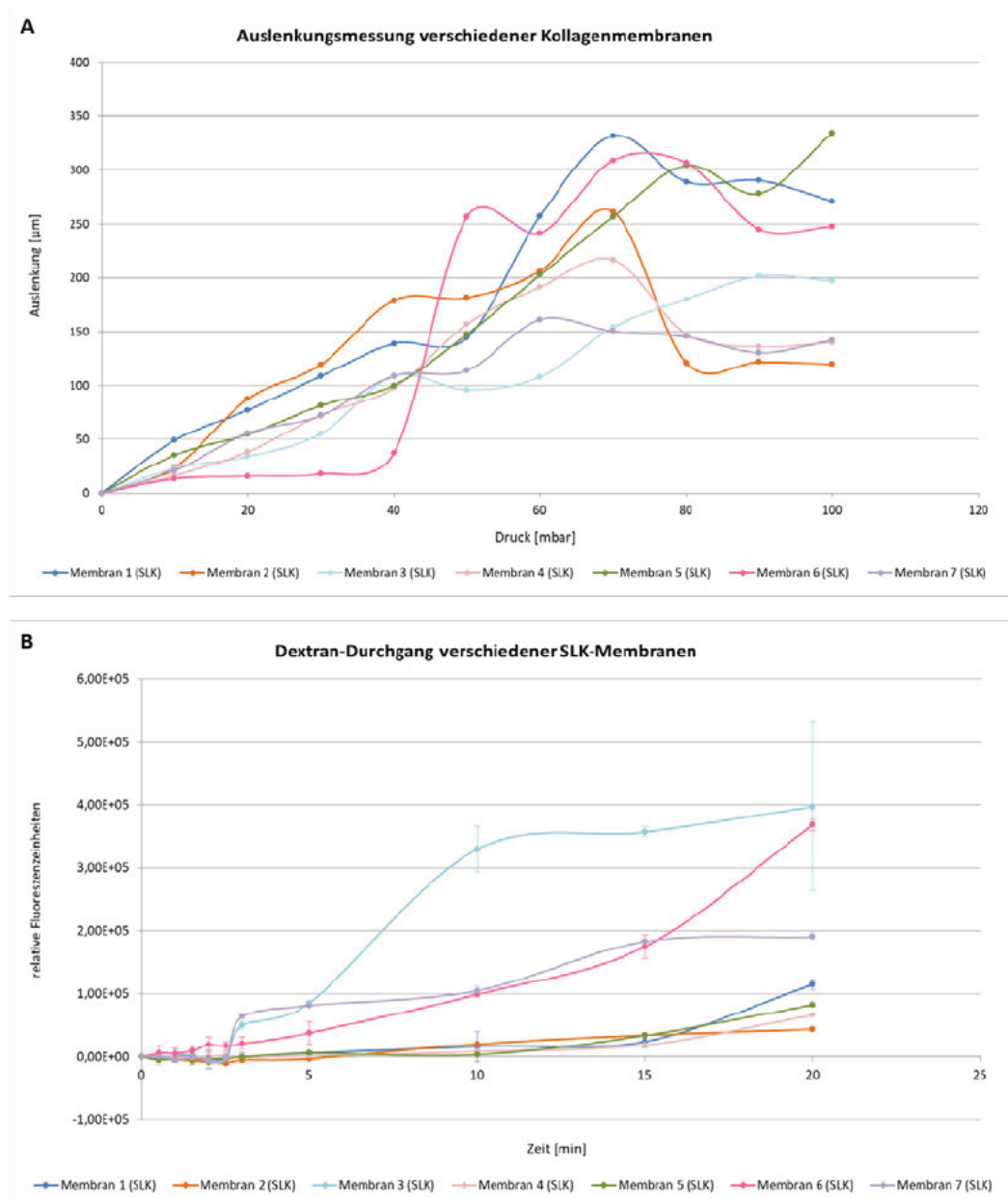


Abbildung 24: Auslenkungsmessung verschiedener Kollagenmembranen

In Diagramm A sind die Messwerte für die Auslenkungen aller untersuchten SLK-Membranen dargestellt. In Diagramm B wurden die Ergebnisse der Permeabilitätsmessung ausschließlich für die SLK-Membranen aufgetragen, um den Zusammenhang von Durchlässigkeit und der maximal erreichbaren Auslenkung zu untersuchen.

5.6.3 Berechnung der Kollagenmembran-Auslenkung

Das pulmonale Gewebe unterliegt einer mechanischen Dehnung von 8 % bis 12 %. Allerdings war bisher nicht bekannt, wie viel Druck am MPSstimulus angelegt werden muss, um die Zellen der genannten physiologischen und zyklischen Dehnung auszusetzen. Aufgrund dessen wurde ein Rechenansatz mithilfe der experimentell ermittelten Auslenkungen aufgestellt.

Diesbezüglich wurde die prozentuale Auslenkung mithilfe von Integralrechnung, über die Bogenlänge einer parabelförmigen Funktion berechnet.

Die Auslenkungen der einzelnen Kollagenmembranen (5.6.2) wurden wie in Punkt 4.8 beschrieben detektiert. Die Berechnung beruhte auf der Annahme, dass die Ausdehnung der Membran parabelförmig verläuft. Mithilfe der Wachstumsoberfläche des Netwells, ließ sich mittels folgender Formel der Radius des Einsatzes berechnen.

$$r = \sqrt{\frac{A}{\pi}} = \sqrt{\frac{1,767 \text{ cm}^2}{\pi}} \approx 0,750 \text{ cm} = 750 \mu\text{m}$$

Der Radius des Netwells beträgt 750 μm , mithilfe dessen konnten die Nullstellen der Funktion mit $P_1 (-750/0)$ und $P_2 (750/0)$ festgelegt werden. Anschließend wurde von den gemessenen Auslenkungen (Punkt 5.6.2) der Mittelwert berechnet, welcher als Scheitelpunkt der Funktion angenommen werden konnte. So konnte bei einem Druck von 100 mbar eine durchschnittliche Auslenkung von 342,857 μm festgestellt werden. Dadurch hatte man wiederum zwei unterschiedliche Punkte $P_1 (750/0)$ und $P_2 (0/-342,857)$ auf dem Funktionsgraphen und konnte diese in die Scheitelpunkt-Funktion einsetzen, wodurch die Streckung der Parabel berechnet werden konnte.

$$y = a \cdot (x - d)^2 + e \quad 0 = a \cdot (750 - 0)^2 + (-342,857) \quad a = 6,095 \cdot 10^{-4}$$

$$f(x) = 6,095 \cdot 10^{-4} \cdot x^2 - 342,857$$

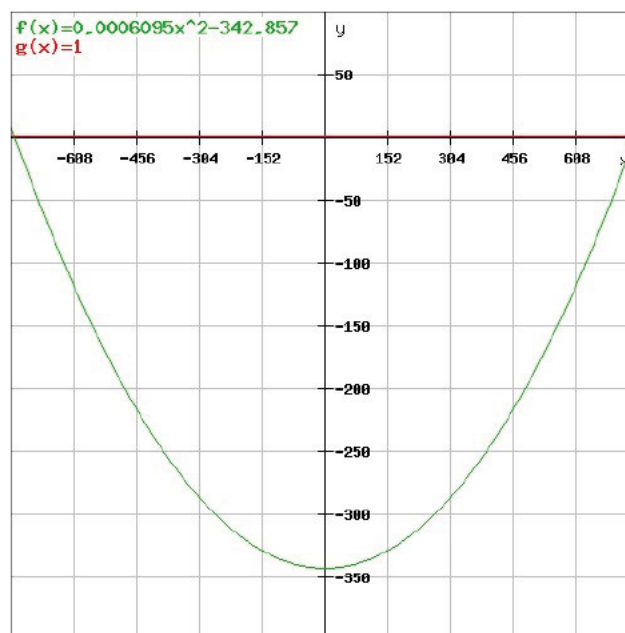


Abbildung 25: Funktionsverlauf für die Berechnung der Kollagenmembran-Auslenkung

Die rote Linie im Diagramm (Abb. 25) zeigt die Ausgangslage des Netwells, solange es sich in seinem Ruhezustand befindet. Die grüne Funktion zeigt das Netwell in seinem gedehnten Zustand bei 100 mbar. Um die prozentuale Dehnung zu erhalten, musste daher die Bogenlänge der gedehnten Funktion mithilfe von Integralrechnung berechnet werden. Hierfür wurde zuerst die erste Ableitung der Funktionsgleichung gebildet und diese anschließend in die Formel zur Berechnung der Bogenlänge, mit den Grenzen -750 und 750 eingesetzt. Von dieser Funktion wurde abschließend die Stammfunktion gebildet und die Grenzen eingesetzt. Zum Schluss wurde das Ergebnis der oberen Grenze von der unteren subtrahiert, wodurch man die Bogenlänge erhielt. Die Länge des Ausgangszustandes war durch die beiden Nullstellen mit 1500 μm festgelegt und wurde als 100 % angenommen. Dieser Zusammenhang wurde anschließend mit der berechneten Bogenlänge ins Verhältnis gesetzt, sodass die prozentuale Ausdehnung berechnet werden konnte.

$$f'(x) = 1,219 \cdot 10^{-3} x$$

$$\text{Bogenlänge} = \int_{-750}^{750} \sqrt{1 + (1,219 \cdot 10^{-3} x)^2} dx = \int_{-750}^{750} \sqrt{1 + 1,486 \cdot 10^{-6} \cdot x^2} dx$$

$$\begin{aligned} SF &= \frac{x \cdot \sqrt{5 \cdot (734 \cdot x^2 + 5 \cdot 10^8)}}{1 \cdot 10^5} + \frac{5000 \cdot \sqrt{3715} \cdot \ln(|7430 \cdot x + 10 \cdot \sqrt{743 \cdot x^2 + 5 \cdot 10^8}|)}{743} \\ &\left[\frac{750 \cdot \sqrt{5 \cdot (734 \cdot 750^2 + 5 \cdot 10^8)}}{1 \cdot 10^5} + \frac{5000 \cdot \sqrt{3715} \cdot \ln(|7430 \cdot 750 + 10 \cdot \sqrt{743 \cdot 750^2 + 5 \cdot 10^8}|)}{743} \right] - \\ &\left[\frac{-750 \cdot \sqrt{5 \cdot (734 \cdot (-750)^2 + 5 \cdot 10^8)}}{1 \cdot 10^5} + \frac{5000 \cdot \sqrt{3715} \cdot \ln(|7430 \cdot (-750) + 10 \cdot \sqrt{743 \cdot (-750)^2 + 5 \cdot 10^8}|)}{743} \right] \\ &= 7252,242 - 5563,827 \approx 1688 \mu\text{m} \quad \text{Ausdehnung: } \frac{1500 \mu\text{m}}{1688 \mu\text{m}} = \frac{100 \%}{112,5 \%} = 12,5 \% \end{aligned}$$

Mithilfe des aufgezeigten Rechenansatzes konnte herausgefunden werden, dass ein zyklischer Druck von 100 mbar am MPSstimulus angelegt werden muss, um die Kollagenmembran in einem physiologischen Bereich von ca. 12 % auszulenken.

5.6.4 Untersuchung der mechanischen Belastung auf die Zellmorphologie

Die Atembewegung spielt eine essentielle Rolle bei der Differenzierung von in der Lunge befindlicher Alveolarzellen. Für die Realisierung der dynamischen Belastung wurden Netwells mit einer Kollagenmembran beschichtet und anschließend mit Lungenzellen besiedelt. Diesbezüglich muss erwähnt werden, dass Netwells ausschließlich mit einer Kollagenmembran ausgestattet werden können, da der Gitterabstand des Polymernetzes für die etablierte Kollagenbeschichtung zu groß und dadurch nicht realisierbar ist. Die verwendeten Netwells besitzen eine Gittergröße von 440 μm , während die Poren der Transwells nur einen Durchmesser von 3 μm aufweisen. Die synthetischen Membranen der Net- und Transwells sind der Abbildung 26 zu entnehmen.

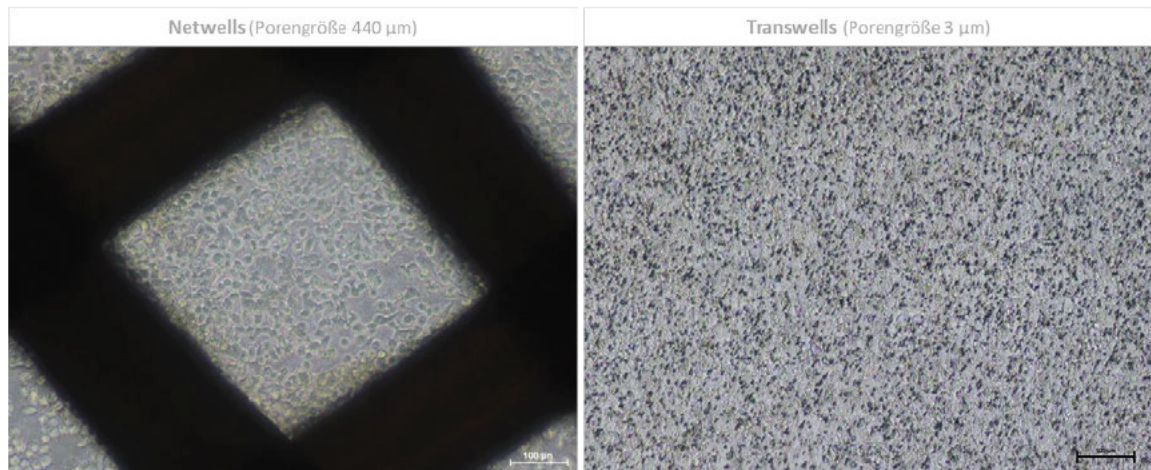


Abbildung 26: Vergleich der synthetischen Membranen von Net- und Transwell-Einsätzen

Für den Vergleich der verwendeten Einsätze wurden diese mithilfe eines inversen Lichtmikroskops bei 100-facher Vergrößerung fotografiert. Maßstab = 100 μm

Es ist zu sehen, dass die Poren der Netwells deutlich größer sind, als die der Transwells. Zudem sind die einzelnen Gitterstrukturen der Netwells quadratisch und werden von einem dehnungsfähigen Polyesternetz umgeben. Die Poren der Transwells sind nur anhand von kleinen schwarzen Punkten erkennbar, welche sich über die gesamte Membran verteilen.

Für die Besiedlung der Netwells kamen sowohl die Lungenzelllinie A549, als auch die primären Bronchialepithelzellen HBEpC zum Einsatz. Die besiedelten Netwells wurden in das MPSstimulus-System eingebracht und anschließend folgenden Dehnungsparametern ausgesetzt: maximaler Druck 100 mbar, minimaler Druck 0 mbar und einer Frequenz von 12 BPM. Die mit A549 besiedelten Netwells wurden sowohl für 24, als auch für 72 Stunden gedehnt, während die HBEpC ausschließlich für 24 Stunden physiologisch stimuliert wurden. Es

wurden zusätzlich immer Kontrollen mitgeführt, welche nicht gedehnt wurden, sich allerdings im selben Kultivierungsstadium befanden. Die Visualisierung erfolgte anschließend mithilfe der CellMask Deep Red-Färbung, welche die Plasmamembran der Zellen sichtbar macht. Mit dem Versuch sollte festgestellt werden, ob die Zellen auf eine physiologische und zyklische Dehnung reagieren. Die Veränderungen wurden anhand der Zellmorphologie bewertet. Abbildung 27 zeigt, dass sich die Zellen nach 24-stündiger Dehnung immernoch auf der Membran befinden. Zudem kann bei beiden Zelltypen die verstärkte Ausbildung von F-Aktin-Zytoskelettfilamenten und Tight Junctions beobachtet werden. Dieser Zusammenhang ist bei der Zelllinie A549 noch etwas stärker ausgeprägt, als bei den Primärzellen HBEpC. Alle Zellen weisen eine lang gestrecktere Morphologie auf. Ein beträchtlicher Unterschied ist nach 72-stündiger Dehnung der A549 (Abb. 27 A) ersichtlich, es befinden sich im Vergleich zur Kontrolle viel weniger Zellen auf der Membran. Zudem besitzen sie eine abgerundete Zellform und es sind keine Zellverbindungen mehr erkennbar. Die Zellen haben sich vom Untergrund abgelöst. Die Ursache ist bis zum jetzigen Zeitpunkt ungeklärt. Trotz alledem sind die bisherigen Ergebnisse vielversprechend und zeigen, dass die Zellen durch die Ausprägung eines verstärkten Zytosketts, auf die mechanische Stimulation reagieren. Zudem sind die verwendeten Dehnungsparameter in der Lage die Zellen für mindestens 24 Stunden physiologisch zu dehnen, ohne dass Ablösungserscheinungen erkennbar sind.

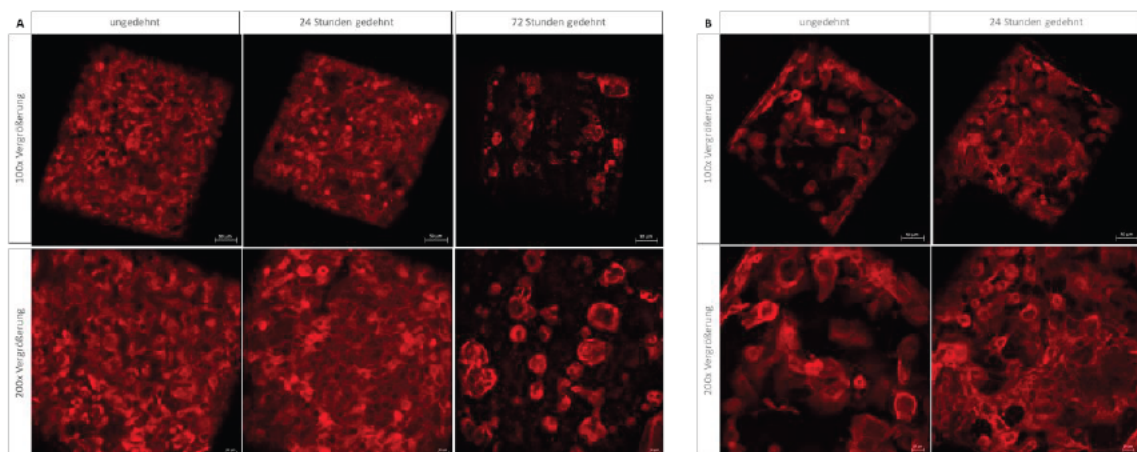


Abbildung 27: CellMask Deep Red-Färbung gedehnter Zellen

In Abbildung A ist die Zelllinie A549 nach 24- und 72-stündiger Dehnung dargestellt. Darstellung B zeigt die primären Bronchialepithelzellen HBEpC nach 24-stündiger Stimulation. Zusätzlich wurden immer ungedehnte Kontrollen mitgeführt, welche sich im selben Kultivierungszustand befanden. Die Dehnung erfolgte in Netwells, mithilfe des MPSstimulus (Fraunhofer IWS). Die Zellen wurden bei einem Druck von 100 mbar und einer Frequenz von 12 BPM gedehnt. Die Aufnahmen erfolgten mithilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops. Die Bilder wurden bei 100-facher (Maßstab = 50 µm) und 200-facher Vergrößerung (Maßstab = 20 µm) aufgenommen.

6 Diskussion

Mausmodelle reichen heutzutage nicht mehr aus, um die *in vivo* Situation der Lunge vollständig zu rekonstruieren. Aufgrund dessen bestand das Ziel dieser Arbeit in der Etablierung einer physiologisch relevanten Lungenepithelzellschicht für die Grundlagenforschung in Form einer Luft-Flüssigkeits-Grenzflächen-Zellkultur. Die Verwendung von Zellkulturen für die *in vitro* Forschung, stellt eine hochdurchsatzfähige, robuste und gleichzeitig kostengünstige Plattform für toxikologische Untersuchungen zur Beurteilung der Arzneimittelsicherheit dar. Für die Erzeugung des Airlift-Modells wurden zwei unterschiedliche Epithelzellen der Atemwege verwendet. Einerseits die Karzinomzelllinie A549 und andererseits die primären humanen Bronchialepithelzellen HBEpC. Die Nutzung von Zelllinien ist zwar stark umstritten, allerdings für die Etablierung eines Modells unerlässlich, da diese leicht passagiert und kultiviert werden können. Zelllinien sind zudem sehr homogen, bilden allerdings ausschließlich Monoschichten und sind nicht in der Lage ihre differenzierten Phänotyp langfristig aufrecht zu erhalten, weshalb die *in vivo* Situation nur eingeschränkt rekonstruiert werden kann (Klein, et al., 2011). Die verwendete Karzinomzelllinie A549 gehört zu einer der am häufigsten verwendeten Lungenzelllinien. Sie besitzt besondere Merkmale und ist in der Lage, die Eigenschaften der alveolären Epithelzellen Typ II, einschließlich der Sezernierung von Schleim an der apikalen Seite der Zellen authentisch nachzubilden (Barosova, et al., 2021). Die Epithelzellen Typ II gehören zu den wichtigsten Zellen der pulmonalen Mikroumgebung, mit der Hauptaufgabe eine schützende Muzinschicht zu produzieren, um Krankheitserreger und Fremdstoffen einzufangen. Zudem fungieren sie als Vorläufer für beide Arten von Alveolarzellen. Im Gegensatz zu Zelllinien, werden Primärzellen aus Biopsien oder überschüssigen biologischen Material von gesunden oder erkrankten Spendern gewonnen. Die verwendeten Bronchialepithelzellen stammen aus dem Oberflächenepithel menschlicher Bronchien, welches ein wichtiges Ziel für Toxine und Medikamente darstellt [URL-3]. Die Isolierung solcher Zellen ist oftmals mit einem großen Zeit- und Arbeitsaufwand verbunden, weshalb deren Anschaffung sehr kostenintensiv ist. Des Weiteren sind Primärzellen bezüglich ihrer Kultivierung sehr anspruchsvoll und gleichzeitig in ihrer Proliferation verlangsamt, weshalb die korrekte Zellhandhabung eine Herausforderung darstellt und die Standardisierung erschwert wird. Trotz alledem sind Primärzellen hochgradig differenziert und in der Lage diesen Phänotyp langfristig aufrecht zu erhalten, weshalb sie bevorzugt für die Erzeugung aussagekräftiger In-vitro-Modelle verwendet werden (Klein, et al., 2011).

6.1 Charakterisierung geeigneter Aussaat-Bedingungen

Das humane Lungenepithelgewebe ist vollständig geschlossen, einzellschichtig und fungiert als Barriere zwischen der Atmosphäre und dem flüssigkeitshaltigen Gewebe. Die wichtigste Eigenschaft eines authentischen Lungen-in-vitro-Modells ist daher die Aufrechterhaltung bzw. Rekonstruktion der epithelialen Integrität. Voraussetzung dafür ist das Vorhandensein einer vollständig geschlossenen Zellschicht, welche anschließend an der Luft-Flüssigkeitsgrenze kultiviert werden kann (Moreira, et al., 2021). Ziel der Konfluenzbeurteilung war es deshalb, herauszufinden, welche Zellzahl an A549 und HBEpC auf mit Kollagen beschichteten Transwell-Einsätzen ausgesät werden muss, um nach möglichst kurzer Kultivierungsdauer eine vollständig konfluente Zellschicht auszubilden. Mittels unterschiedlicher Färbemethode konnte herausgefunden werden, dass die Aussaat von $176.835 \text{ A549/cm}^2$ und $221.043 \text{ HBEpC/cm}^2$ eine optimale Kultivierung an der Luft-Flüssigkeitsgrenze ermöglicht (Abb. 5). Umgerechnet sind das 200.000 und 250.000 Zellen je 12 well Einsatz. Hierbei lässt sich bereits sehr gut der Unterschied zwischen Zelllinien und Primärzellen erkennen, Primärzellen sind in ihrer Proliferation deutlich langsamer, weshalb mehr Zellen benötigt werden, um innerhalb derselben Kultivierungsdauer eine konfluente Zellschicht auszubilden. Die Zellzahl der Zelllinie A549 ist im Vergleich zu Ren et al. sehr hoch, da dieser nur 100.000 Zellen für dasselbe Transwell-Format verwendete. Der wesentliche Nachteil einer geringen Startzellzahl besteht in den damit einhergehenden Kosten. Die Zellen benötigen länger, bis sie eine vollständig konfluente Zellschicht ausgebildet haben. Das kostet wiederum Arbeitszeit, Medium und Strom für den Inkubator. Aufgrund dessen wurde eine etwas höhere Zellzahl gewählt. Der Vorteil besteht demzufolge in einer verkürzten Kultivierungszeit und das die Zellen nicht schon vor dem Airlift differenzieren. Zudem ist anhand der CellMask Deep Red-Färbung eine für die Epithelzellen typische säulenförmige Morphologie erkennbar, weshalb nicht davon auszugehen ist, dass die Zellen zu dicht sind (Abb. 5A).

Das Lungenepithel soll zukünftig im Modell mit Endothelzellen zusammen kultiviert werden. Es wurde daher auch eine Konfluenzbeurteilung für die somatische Hybridzelllinie EA.hy926 und die primären Endothelzellen HUVEC durchgeführt. Genauso wie bei den Lungenzellen ist für die Endothelzellen die Ausbildung eines konfluenten Monolayers essentiell und gleichzeitig eine wichtige Voraussetzung für ein funktionierendes Kokultur-System. Eine konfluente Zellschicht ermöglicht die Ausbildung von Zellkontakten sowie zellulärer Kommunikation (Klein, et al., 2011). So konnte mithilfe der Cell Mask Deep Red- und der Phalloidin-DAPI-

Färbung herausgefunden werden, dass 309.460 EA.hy926/cm² und 176.835 HUVEC/cm² nach 2-tägiger Inkubation eine konfluente Zellschicht ausgebildet haben. Das sind umgerechnet 350.000 und 200.000 Zellen je 12 well Format. Die Endothelzellschicht wird sich in der Kokultur selbst während des Airlifts in Medium befinden.

6.2 Etablierung eines geeigneten Anhaftungssubstrates für die Airlift-Kultur

Heutzutage werden In-vitro-Modelle benötigt, bei denen physiologische Veränderungen beobachtet und Parameter leicht manipuliert werden können. Die bisher entwickelten Zell- und Tiermodelle sind nicht in der Lage, die *in vivo* Situation des pulmonalen Gewebes vollständig zu rekonstruieren. Allerdings besitzen Zellkulturen ein großes Potential, die pathologischen Eigenschaften bestimmter Krankheiten zukünftig sowohl auf Gewebe-, als auch auf Organebene realitätsnah zu untersuchen. Für diesen Zweck werden Transwell-Einsätze verwendet, welche sich aus einer semipermeablen Membran zusammensetzen. Dieser Aufbau ermöglicht die Kultivierung von mehreren Zelltypen gleichzeitig an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche. Die verwendeten Membranen bestehen üblicherweise aus synthetischen Stoffen, wie Polyester oder Polycarbonat und ähneln somit nicht der *in vivo* vorkommenden EZM (Arik, et al., 2021). Ziel dieser Untersuchung war es deshalb, den synthetischen Charakter der Membranen durch die Beschichtung mit dem Protein Kollagen Typ I zu minimieren und dadurch eine verbesserte *in vivo* Ähnlichkeit zu schaffen. Kollagen Typ I ist das häufigste im Menschen vorkommende Protein und gleichzeitig wichtiger Bestandteil der EZM, welche wiederum eine essentielle Komponente des Bindegewebes darstellt. Die EZM setzt sich neben Kollagen aus einer Vielzahl verschiedener Moleküle zusammen und ist für mechanische, strukturelle sowie biochemische Funktionen verantwortlich (Sagi & Afratis, 2019). Für die Erzeugung der ALI-Kultur wurden transluzente Einsätze mit einer Porengröße von 3 µm verwendet. Die semipermeable Membran ermöglicht dabei den Austausch löslicher Signalstoffe und gleichzeitig die Ernährung der Zellen mit den im Medium befindlichen Zusätzen. Des Weiteren verhindert die Membran, die Migration von Zellen und führt zu einer Kompartimentierung, wodurch Grenzen zwischen unterschiedlichen Geweben ausgebildet werden können. Es wurden zwei verschiedene Beschichtungsvarianten untersucht, einerseits die Kollagenbeschichtung (SLK-PBS) und andererseits die Benetzung mit einem Kollagenhydrogel, welches letztendlich zu einer dünnen Kollagenmembran getrocknet wird. Kollagen wird in der Zellkultur bevorzugt als Anhaftungssubstrat verwendet, da sich die Zellen auf diesem Untergrund besonders gut ausbreiten und proliferieren können. Des Weiteren wird

die Verankerungsfähigkeit der Zellen erhöht und die Membran bioaktiver. Darüber hinaus haben die Eigenschaften des verwendeten Substrates, Auswirkungen auf die zelluläre Differenzierung und somit auf das entstandene Modell. Für die Untersuchung wurden die beschichteten Transwell-Membranen mit der Zelllinie A549 besiedelt und anschließend auf ihre ausgebildete Barriere mithilfe einer Permeabilitätsmessung untersucht. Was hierbei auffiel war, dass die mit der Kollagenbeschichtung besiedelten Transwells eine deutlich dichtere Barriere aufwiesen, als die Einsätze mit der Kollagenmembran (Abb. 12). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im Anschluss ein Zytotoxizitätstest durchgeführt, um die Stoffwechselaktivitäten auf den unterschiedlichen Kollagensubstraten zu untersuchen (Abb. 15). Hierbei wurde sichtbar, dass die Zelllinie A549 auf der Kollagenbeschichtung mit etwa 95 % eine deutlich höhere Stoffwechselaktivität erreichen konnte, als auf der Kollagenmembran mit nur etwa 76 %. Zudem zeigten die mikroskopischen Aufnahmen (Abb. 13), dass sich die Zellen auf der Kollagenmembran nicht ausgebreitet haben. Die abgerundeten Zellen bildeten keine Zell-Zellkontakte aus, was wiederum mit der erhöhten Permeabilität einhergeht. Als Ursache für diese Ergebnisse wurden vorerst die weichen Eigenschaften der Kollagenmembran angenommen, da vermutet wurde, dass die Zellen Probleme haben sich anzuhafte und dadurch nicht in der Lage waren ausreichend zu proliferieren. Aufgrund dieser Vermutung wurde zusätzlich der Einfluss der Kollagenvernetzung mit 2 % EDC untersucht (Abb. 14). Diesbezüglich wurde vermutet, dass sich die Membran durch die Vernetzung versteift und dadurch für die Zellen attraktiver wird. Jedoch war genau das Gegenteil der Fall, da die Permeabilität durch die Vernetzung nur noch mehr erhöht wurde und somit mit einer Verschlechterung der Barriere einherging. Mögliche Gründe sind, dass toxische Rückstände des Vernetzers nicht ausreichend herausgewaschen wurden oder die Vernetzung selbst nicht effizient genug war. Die Steifigkeit der Membran wurde nicht überprüft. Allerdings werfen die Ergebnisse trotzdem Fragen auf, da andere Wissenschaftler mit derselben unvernetzten Membran in der Lage waren, proliferierende Zellpopulationen sowie konfluente Zellschichten auszubilden (Arik, et al., 2021). Vermutlich ist der Anhaftungs- und Proliferationserfolg von den verwendeten Zellen abhängig, wodurch die gewonnenen Ergebnisse nicht auf andere Zelltypen übertragen werden können. Somit wäre es notwendig die durchgeführten Untersuchungen nochmal für Primärzellen zu wiederholen. Trotz alledem konnte herausgefunden werden, dass die Kollagenbeschichtung eine sehr gute Variante darstellt, um den synthetischen Charakter der semipermeablen Membran zu minimieren. Mithilfe dieser Beschichtung war es möglich hohe Stoffwechselaktivitäten sowie

geschlossene und proliferierende Zellschichten auszubilden. Für zukünftige Untersuchungen würde es sich zusätzlich anbieten weitere EZM-Proteine, wie Laminin oder Kollagen IV in die Beschichtungsherstellung zu integrieren, um eine noch repräsentativere Basalmembran zu erzeugen. Zudem wäre es möglich für die Vernetzung das Enzym Clostripain zu verwenden, da dieses die Membranpermeabilität durch Ausbildung eines Gelatinefilms nachweislich verringern kann (Arik, et al., 2021). Allerdings ist Gelatine nicht langzeitstabil und würde durch die Zellen schnell verstoffwechselt werden.

6.3 Identifizierung eines geeigneten Mediums für eine Kokultur

Die alveoläre Mikroumgebung unterliegt einem komplexen und dynamischen Aufbau, welcher einerseits für den Gasaustausch und andererseits für die Immunantwort verantwortlich ist. Die Epithelauskleidung bildet hierbei die erste Barriere gegen eingeatmete Fremdstoffe und setzt sich aus vier verschiedenen und essentiellen Zelltypen zusammen (Sengupta, et al., 2022). Um dieses Zusammenspiel authentisch rekonstruieren zu können, werden heutzutage bevorzugt Kokulturen für die Forschung verwendet. Bei dieser Art der Kultivierung werden mehrere Zelltypen gleichzeitig miteinander kultiviert, wodurch die *in vivo* Situation authentisch rekonstruiert werden kann. Für ein aussagekräftiges Lungen-in-vitro-Modell ist die Kombination verschiedener, in der Lunge vorkommender Zelltypen, wie bspw. Epithel- und Endothelzellen unerlässlich. Die Etablierung eines Kokulturmodells bringt allerdings auch Einschränkungen mit sich, da die optimalen Kultivierungsbedingungen oftmals erst ermittelt werden müssen. Zudem ist es nicht immer möglich für alle Zelltypen die bestmöglichen Bedingungen zu schaffen, weshalb Kompromisse bezüglich des verwendeten Mediums sowie den dazugehörigen Zusätzen eingegangen werden müssen (Klein, et al., 2011). Daran lässt sich erkennen, dass die Erzeugung einer Kokultur, mit einem hohen Zeit- und Arbeitsaufwand verbunden ist. In der Arbeit sollten zwei Kokulturen und die dazugehörigen Medien etabliert werden. Die eine Kokultur setzte sich aus den beiden Zelllinien A549 und EA.hy926 zusammen und die andere aus den Primärzellen HBEpC und HUVEC. Die beiden Lungenzellen A549 und HBEpC dienen diesbezüglich zur Rekonstruktion der pulmonalen Epithelauskleidung, während die Endothelzellen EA.hy926 und HUVEC das Gewebe innerhalb der Blutgefäße nachbilden. Für die Etablierung der jeweiligen Kulturmedien wurden zwei Zytotoxizitätstests sowohl für die Primärzellen als auch für die Zelllinien unabhängig voneinander durchgeführt. Die untersuchten Medien-Varianten sind der Tabelle 5 (Seite 35) zu entnehmen. Mithilfe des Zytotoxizitätstest konnte herausgefunden werden, dass sich das DMEM-Medium mit Glucose

am besten als Kokulturmedium für die Zelllinien A549 und EA.hy926 eignet (Abb. 18 A). Beide Zelllinien konnten in diesem Medium eine nahezu 100 %-ige Stoffwechselaktivität erreichen. Überraschenderweise führten alle anderen Medien ebenfalls zu hohen Stoffwechselaktivitäten im Bereich von 87 % - 100 %. Aufgrund der Ergebnisse ist davon auszugehen, dass die beiden Zelllinien sehr ähnliche Kultivierungsansprüche besitzen, was die gemeinsame Kultivierung innerhalb einer Kokultur begünstigt. Mithilfe des Zytotoxizitätstest für die Primärzellen HBEpC und HUVEC konnte herausgefunden werden, dass sich das Mediengemisch aus EBM- und ALI-Basalmedium für die Kokultur am besten eignet (Abb. 18 B). Beide Zelltypen konnten weitaus höhere Proliferationsraten als 100 % erreichen. Allerdings sind zu hohe Stoffwechselaktivitäten mit großem Stress verbunden und können sich dadurch negativ auf die Zellen auswirken, weshalb die Ergebnisse kritisch betrachtet werden müssen. Bei der mikroskopischen Untersuchung waren allerdings keine negativen morphologischen Veränderungen erkennbar, weshalb trotz der hohen Stoffwechselaktivität das Mediengemisch verwendet wurde. Das Ziel der entwickelten Kokulturen besteht darin, die Kommunikation verschiedener Zelltypen nachzuvollziehen. Zellen kommunizieren über die Ausschüttung spezieller Wachstumsfaktoren und Zytokinen, welche eine elementare Rolle bei krankheitsauslösenden Prozessen einnehmen.

6.4 Etablierung der Airlift-Kultivierung für die Lungenkarzinomzelllinie A549

Für die Erzeugung einer Luft-Flüssigkeits-Grenzflächen-Zellkultur werden sowohl ein Kultur-, als auch ein Airliftmedium benötigt. Die Funktion des Kulturmediums besteht darin, die Proliferation der Zellen und die Ausbildung einer konfluenten Zellschicht bis zum Airlift zu fördern, während das Airliftmedium dazu dient, die Zellpopulation aufrechtzuerhalten und die Differenzierung der Zellen zu unterstützen. Als Kulturmedium für die Zelllinie A549 wurde das CM-Medium, bestehend aus RPMI1640 und 10 % FBS verwendet. Dieses war in der Lage eine konfluente Zellschicht mit überwiegend lebenden Zellen auszubilden. Das verwendete ALI-Medium hingegen, ist vermutlich aufgrund von zu wenigen essentiellen Wachstumsfaktoren als Kulturmedium ungeeignet. Die Zelllinie A549 neigt dazu, sobald sie an der Luft-Flüssigkeitsgrenze kultiviert wird, mehrschichtig zu wachsen. Dies ist allerdings für die Rekonstruktion des einzellschichtigen Lungenepithels nachteilig. Ziel war es deshalb herauszufinden, ob das tägliche Spülen des Monolayers, das mehrschichtige Wachstum der Zellen mindert (He, et al., 2021). Allerdings konnte dieser Effekt mithilfe der durchgeführten Untersuchungen nicht bestätigt werden.

Es galt zusätzlich noch herauszufinden, welches Medium sich am besten für die Kultivierung des Lungenepithels an der Luft eignet. Diesbezüglich war erkennbar, dass alle Epithelzellschichten des ALI-Mediums dünner waren, als die des CM-Mediums (Abb. 10). Jedoch wiesen die Epithelien des ALI-Mediums sehr viele Lücken auf, was sich wiederum nachteilig auf die Barriereintegrität auswirken kann (Abb. 9). Die Epithelschichten des CM-Mediums waren hingegen geschlossen und kompakt in Bezug auf ihre Zellverteilung. Diese Beobachtungen konnten auch mithilfe der Hämatoxylin-Eosin-Färbung der gesamten Epithelschicht bestätigt werden (Abb. 7). Die submers kultivierten Zellschichten (Kontrollen) zeigten sowohl in ALI- als auch in CM-Medium eine homogene und geschlossene zelluläre Verteilung. Dies galt auch für die ungewaschene Airlift-Kultur des CM-Mediums. Die täglich gespülte Epithelschicht zeigte hingegen ein stark ausgeprägtes, koloniebildendes Zellwachstum (Abb. 7 E). In der Literatur gibt es Hinweise, dass diese Beobachtung kein Nachteil ist, sondern auf eine heterogene Zellverteilung unterschiedlicher Zelltypen und somit auf ein pseudostratifiziertes Epithelgewebe zurückgeführt werden kann (Bluhmki, et al., 2020). Wie bereits in den Querschnitten beobachtet wurde, wiesen die Zellschichten des ALI-Mediums deutlich mehr Lücken auf. Die stärksten Unregelmäßigkeiten fanden sich dabei in den ungewaschenen Airlift-Kulturen. Die Ergebnisse lassen somit vermuten, dass ein Spülen des an der Luft befindlichen Epithels Vorteile bringt, das ALI-Medium aber für die Zelllinie A549 ungeeignet ist. Die Veränderungen der Zellschichten decken sich mit den Ergebnissen der durchgeführten Permeabilitätsmessung (Abb. 11). Besonders die Zellschichten des CM-Mediums wiesen alle eine sehr geringe Durchlässigkeit und damit eine gute Barrierefunktion auf. Im Gegensatz dazu waren die Epithelien des ALI-Mediums deutlich undichter. Diesbezüglich stellte die Submerskultur die dichteste Epithelschicht dar, gefolgt von der ungewaschenen und anschließend von der gewaschenen Airlift-Kultur. Die gewaschene Kultur in ALI-Medium zeigte in der H&E-Färbung eine relativ homogene Zellschicht. Im Querschnitt wurden allerdings sehr viele Lücken sichtbar, die wahrscheinlich auch die schlechteren Resultate in der Permeabilitätsmessung erklären. Damit wird auch deutlich, dass eine mikroskopische Aufsicht auf den Zellrasen trotz H&E-Färbung nicht ausreicht, um die Qualität der Epithelschicht zu bewerten. Aus der Abbildung 11 wird dennoch ersichtlich, dass die Permeabilität der mit Kollagen beschichteten Transwells grundsätzlich deutlich größer ist, wenn keine Zellen aufgesiedelt sind. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass alle untersuchten Epithelien, gewissermaßen eine Barriere ausgebildet haben. Grundsätzlich besteht während

des Waschens die Gefahr der Beschädigung. Diese könnte die Lücken bzw. Unregelmäßigkeiten innerhalb der Zellschichten erklären. Da sich aber die gewaschene CM-Kultur als die beste Barriere herausstellte, sollte der Waschschrift zukünftig in einem geringeren Ausmaß beibehalten werden.

Die Ausbildung einer funktionierenden Barriere gegenüber Fremdschubstanzen, wie bspw. inhalierten Medikamenten, ist die wichtigste Determinante eines erfolgreichen und aussagekräftigen Lungeneithelgewebes. Gebildet wird diese Barriere zwischen dem subepithelialen Gewebe und dem Atemwegslumen, durch Tight- und Adherens Junctions. Tight Junctions setzen sich überwiegend aus Transmembranproteinen zusammen und bilden einen schützenden Ring um die Epithelzellen. Demhingegen sind die Adherens Junctions mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden und bestehen hauptsächlich aus E-Cadherin und mehreren Cateninen (Bluhmki, et al., 2020). Auf Grundlage dieses Wissens und den Ergebnissen der Permeabilitätsmessung kann geschlussfolgert werden, dass die Zellschichten des CM-Mediums funktionierende Tight- und Adherens Junctions in den Zellzwischenräumen ausgebildet haben, wodurch eine sehr dichte Barriere gewährleistet werden konnte. Diese Ergebnisse widersprechen allerdings Ren et al., welcher auf Grundlage seiner Untersuchungen behauptet, dass die Zelllinie A549 nicht in der Lage sei funktionierende Tight Junctions auszubilden. Grund dafür können eventuell die Unterschiede bezüglich der Zellhandhabung sein. Es ist nämlich schwierig die Ergebnisse unterschiedlicher Labore miteinander zu vergleichen, da die morphologischen und phänotypischen Eigenschaften eines ALI-Modells sehr stark von den Kultivierungsbedingungen sowie der Zellhandhabung und Passagenzahl abhängen (Barosova, et al., 2021).

Betrachtet man zusätzlich die Standardabweichungen der einzelnen Medien-Varianten, fällt auf, dass die Epithelien des ALI-Mediums, im Vergleich zu den Zellschichten des CM-Mediums, deutlich größere Unterschiede bezüglich ihrer Durchlässigkeiten aufweisen (Abb. 11). Eine wichtige Voraussetzung für authentische Lungen-in-vitro-Modelle ist es allerdings, dauerhaft reproduzierbare Ergebnisse zu gewährleisten. Diese können nach den bisherigen Beobachtungen, allerdings nur durch die Epithelschichten des CM-Mediums aufrechterhalten werden. Die Zellschichten des ALI-Mediums sind aufgrund zu großer Variationen, inkonsistent und somit für toxikologische Studien ungeeignet.

Was anhand der Alcianblau-Färbung sichtbar wird ist, dass die an der Luft-Flüssigkeitsgrenze kultivierten A549 große Mengen an lipidhaltigen Lungensurfactant absondern (Abb. 8). Allerdings treten diesbezüglich, wie bereits schon mithilfe von anderen Färbemethoden festgestellt wurde, Unterschiede zwischen den einzelnen Medien-Varianten und Waschschritten auf. Alcianblau ist ein basischer Farbstoff, welcher in der Lage ist die von den Becherzellen produzierten sauren Muzine anzufärben. So sezernieren die Epithelien des ALI-Mediums eine homogene und große Menge an Lungensurfactant. Bei der ungewaschenen Schicht, ist allerdings eine etwas geringe Surfactantproduktion erkennbar, welche wiederum auf die Lücken zwischen den Zellen zurückzuführen ist (Abb. 8 A). Das gleiche galt auch für die ungewaschene Zellschicht des CM-Mediums. Im Gegensatz dazu wies die gewaschene Epithelschicht eine stark ausgeprägte, fleckenartige Sezernierung an Surfactant auf (Abb. 8 E). Diese Erkenntnis könnte wie bereits zuvor in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung, auf eine heterogene Verteilung verschiedener Zelltypen sowie auf ein funktionierendes Ziliarsystem zurückgeführt werden, welches in der Lage ist, den Schleim auf der apikalen Seite zu entfernen (Bluhmki, et al., 2020). Diesen Prozess bezeichnet man auch als mukoziliäre Clearance, welcher für den Abtransport von Fremdstoffen aus den Atemwegen essentiell ist (Moreira, et al., 2021). Die Zellschichten der Submerskulturen (Kontrollen) wurden entgegen der Erwartungen, sowohl beim CM- als auch beim ALI-Medium großflächig angefärbt. Eigentlich wurde erwartet, dass die submers kultivierten Epithelschichten keinen Schleim sezernieren, da die Entstehung von Muzin auf die Kultivierung von Zellen an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche zurückzuführen ist (Moreira, et al., 2021). Allerdings ist auch bekannt, dass die Färbung nicht nur ausschließlich auf Muzin, sondern auch auf das Stroma der Zellen zurückgeführt werden kann [URL-1]. Jedoch ist auch nicht auszuschließen, dass sich die Zelllinie A549 über eine längere Kultivierungsdauer in verschiedenste Zelltypen unter anderem auch Becherzellen differenziert. Die Ergebnisse anderer Forscher haben gezeigt, dass diese erst nach 4-wöchiger Kultivierung eine Sezernierung von Lungensurfactant feststellen konnten (Bluhmki, et al., 2020).

6.5 Überprüfung der Funktionalität des erzeugten Modells mithilfe von TGF- β 1

Chronisches Asthma gehört mit etwa 339 Millionen Erkrankten zu einer der häufigsten Lungenerkrankungen weltweit. Die Auslöser für Asthma können ganz unterschiedlich sein und sind häufig auf Allergene wie Blütenpollen oder Hausstaubmilben zurückzuführen. Bei adäquater Behandlung können die Symptome weitestgehend gelindert oder sogar unterdrückt werden. Im schlimmsten Fall kann es allerdings zu einer Asthma-Exazerbation kommen,

welche eine akute Verschlimmerung des Gesundheitszustandes darstellt und auf eine Vireninfection zurückzuführen ist [URL 2]. Das Lungenepithel bildet eine parazelluläre Barriere, welche am Wasser- und Ionentransport beteiligt ist und gleichzeitig die Diffusion gelöster Stoffe gewährleistet. Gebildet wird diese Barriere mithilfe von Tight Junctions, welche den parazellulären Spalt zwischen den Epithelzellen abdichten und sich hauptsächlich aus Occludinen und Claudinen zusammensetzen. Besonders der Claudin-Gehalt ist für die Eigenschaften der Tight Junctions ausschlaggebend. Die Epithelreparatur ist bei Asthmatikern fehlreguliert, wodurch es zur Anreicherung weißer Blutkörperchen und zum Umbau der Atemwege kommt. Diese strukturelle Veränderung ist gefährlich und gleichzeitig Auslöser für zahlreiche Erkrankungen, wie bspw. die submuköse Fibrose (Schilpp, et al., 2021). Bei pulmonalen Erkrankungen, wie der Lungenfibrose wird TGF- β 1 vermehrt ausgeschüttet, wodurch die epitheliale Barriere nachweislich gestört wird. In der Arbeit wurde untersucht, ob sich dieses Verhalten am In-vitro-Modell nachstellen lässt. Hierfür wurden 7-tägige Airlift-Kulturen der Zelllinie A549 für 48 Stunden mit 10 ng/ml TGF- β 1 versetzt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Barriere mithilfe einer Permeabilitätsmessung (Abb. 16). Alle behandelten ALI-Kulturen zeigten eine erhöhte Permeabilität und somit eine gestörte alveoläre Barriere. Grund dafür ist, dass TGF- β 1 die funktionellen Tight Junctions direkt beeinflusst und deren Permeabilität erhöht. Diesbezüglich wird vermutet, dass TGF- β 1 in der Lage ist die epithelial-mesenchymale Transition auszulösen. Dies ist ein komplizierter Mechanismus, bei dem Epithelzellen, als Reaktion auf Stress und Verletzungen einen mesenchymalen Phänotyp annehmen. Dieser führt wiederum zum Verlust von Zellkontakten, was mit der Umverteilung bzw. der Beeinträchtigung der beiden Junction-Proteine Cadherin und ZO-1 einhergeht (Sengupta, et al., 2022). Gleichzeitig konnte in anderen Publikationen die verstärkte Expression der mesenchymalen Proteine EDA, Fibronectin, A-Aktin und Vimentin nachgewiesen werden (Hackett, et al., 2009). Andere Forscher haben wiederum erkannt, dass TGF- β 1 zudem für den Transport von Claudin3 aus den Tight Junctions in die Zellkerne verantwortlich ist, was ebenfalls mit dem Verlust der epithelialen Integrität einhergeht (Schilpp, et al., 2021). Mithilfe von TGF- β 1 konnte nachgewiesen werden, dass die Epithelschicht im Modell auf externe Stimuli ähnlich reagiert, wie das Lungengewebe *in vivo*. Gleichzeitig verdeutlicht die Untersuchung, dass auch pathologische Prozesse mit dem Modell abgebildet werden können. Für weitere Untersuchungen würde es sich zusätzlich anbieten die Konzentration an TGF- β 1 zu verringern, um die Sensitivität des Modells quantifizieren zu können. Zudem wäre es wichtig den Versuch noch einmal mit Primärzellen zu wiederholen.

6.6 Auswirkungen der Verwendung von Primärzellen im Modell

Das Bronchialepithel gehört zu einem der wichtigsten Barrieregewebe des menschlichen Körpers, welches bei Erkrankungen pathologisch verändert wird. Die meisten bisher bekannten Lungenerkrankungen sind auf Funktionsstörungen der Epithelzellen zurückzuführen. Das Bronchialepithel ist ein hochorganisiertes Gewebe aus unterschiedlichen Zelltypen. Viele Studien haben gezeigt, dass Bronchialepithelzellen auch *in vitro* während der Kultivierung an der Luft-Flüssigkeitsgrenze *in vivo* ähnlichere Genexpressionsprofile und sekretorische Eigenschaften aufwiesen (Rayner, et al., 2019). Dies ist bei Primärzellen stärker ausgeprägt als bei Zelllinien. Im Rahmen dieser Arbeit konnten ebenfalls Unterschiede bei der Verwendung der primären Zellen beobachtet werden. Die H&E-Färbung diente dazu die Geschlossenheit der einzelnen Zellschichten zu überprüfen. Das Epithel der A549-Zellen zeigte vor allem in Gegenwart des ALI-Mediums eine eher lückenhafte und inhomogene Zellschicht nach der Kultivierung an der Luft-Flüssigkeitsgrenze. Die Primärzellen wiesen im Gegensatz dazu eine sehr homogene und geschlossene zelluläre Verteilung in Gegenwart des Air-Liquid-Interface-Mediums auf. Die Zellschicht des ALI-Basalmediums wirkte demhingegen inhomogener und undichter, da die einzelnen Zellen noch sehr gut erkennbar waren (Abb. 19 A). Das ALI-Basalmedium stellt das Standardmedium für die Bronchialepithelzellen dar, welches nicht für den Airlift geeignet ist. Bei der Submerskultur, die als Kontrolle fungierte, war bereits eine Agglomeration der Zellen zu Kolonieverbänden erkennbar, was auf ein mehrschichtiges Wachstum zurückzuführen ist (Abb. 19 C). Die Zellschichten wurden nicht nur mittels H&E-Färbung charakterisiert. Es wurden zusätzlich Permeabilitätsmessungen durchgeführt (Abb. 20). Eine geschlossene Barriere ist wie bereits angesprochen, die wichtigste Determinante eines aussagekräftigen Lungen-in-vitro-Modells. Deren Funktion nicht nur darin besteht die parazelluläre Permeabilität zu senken, sondern gleichzeitig auch den Ionentransport essentieller Moleküle zu gewährleisten. Die spezifischen Barriereigenschaften sind auf die Proteinzusammensetzung der epithelialen Verbindungskomplexe zurückzuführen (Ren, et al., 2016). Mithilfe der Permeabilitätsmessung konnte herausgefunden werden, dass die Zellschicht des Air-Liquid-Interface-Mediums die geschlossenste und beste Barriere ausgebildet hat. Vergleicht man die Messwerte zusätzlich mit den Ergebnissen für die Zelllinie A549 wird deutlich, dass die ausgebildete Barriere noch geschlossener ist, als die Epithelien des CM-Mediums. Was aus dem Diagramm (Abb. 20) ebenfalls hervorgeht, ist, dass der Zelllayer des ALI-Basalmediums keine dichte Barriere ausbilden konnte, was die Ergebnisse der H&E-Färbung bestätigt. Im Gegensatz zu den A549-Zellen bildete sich keine sehr dichte Barriere

unter den Submers-Bedingungen aus. Die beiden Kokulturen sind ebenfalls vergleichsweise deutlich dichter, als die Kokulturen mit den A549-Zellen. Mithilfe der Untersuchung konnte gezeigt werden, dass das speziell für den Airlift erworbene Air-Liquid-Interface-Medium lediglich bei der Verwendung von primären Zellen eingesetzt werden sollte. Dort ist es in der Lage, die Ausbildung einer dichten Barriere zu fördern. Eine vollständig geschlossene Barriere sollte allerdings nicht entstehen, da der Transport von Molekülen und Signalstoffen immernoch gegeben sein muss (Ren, et al., 2016). Es wurde zusätzlich noch eine Alcianblau-Färbung durchgeführt, um die Anwesenheit einer schützenden Muzin-Schicht zu untersuchen (Abb. 19). Die primären Epithelien wurden nur sehr leicht angefärbt. Zudem war keine fleckenartige Sezernierung von Surfactant wie bei den A549 erkennbar, welche auf ein pseudostratifiziertes Epithelgewebe hingedeutet hätte. Die meiste Blaufärbung war bei den Monokulturen ersichtlich. Die Submerskultur, wurde wie zuvor bei der Zelllinie A549 ebenfalls angefärbt. Die Kokulturen wiesen nur eine sehr geringe Färbung auf, zudem war auch hier kein Unterschied bezüglich der verwendeten Medien erkennbar. Dadurch, dass bekannt ist, dass Alcianblau nicht nur das von den Becherzellen sezernierte Muzin, sondern auch das Stroma der Zellen anfärbt, kann anhand der Färbung keine genaue Aussage bezüglich der Anwesenheit von Schleim getroffen werden. Fremdstoffe die in die Atemwege gelangen werden zunächst durch die schleimartige Oberflächenflüssigkeit eingefangen und anschließend durch die mukoziliäre Clearance mithilfe der Flimmerzellen aus der pulmonalen Umgebung entfernt. Becherzellen sondern eine etwa 30 µm dicke Muzinschicht auf der apikalen Seite des Epithels ab. MUC1 stellt dabei ein transmembranes Glykoprotein dar, welches hauptsächlich von Pneumozyten Typ II freigesetzt wird (Sengupta, et al., 2022). Das MUC1-Gen wurde bei den Zelllinien besonders innerhalb der Airlift-Kultur exprimiert. Dies bestätigt die Alcianblau-Färbung.

Die Etablierung eines Airlift-Mediums für die primäre Kokultur ist anhand der bisherigen Ergebnisse nicht eindeutig, da beide Medien eine ähnliche Barrierefunktion ausgebildet haben. Auch die Analyse der lungenspezifischen Gene brachte hier keine weitere Erkenntnis. Vermutlich könnten auf Grundlage der bisherigen Ergebnisse beide Medien für den Airlift verwendet werden. Bei den Zelllinien A549 und EA.hy926 stellte die Kokultur die geschlossenste Barriere dar, gefolgt von der Submerskultur und anschließend von der Monokultur (Abb. 12 C). Ein ganz anderes Ergebnis war bei den Kulturen der Primärzellen erkennbar, diesbezüglich stellte die Monokultur des Air-Liquid-Interface-Mediums die

geschlossenste Barriere dar, gefolgt von der Kokultur und letztendlich von der Submerskultur (Abb. 20). Es wurde angenommen, dass die Kultivierung von zwei Zelltypen gleichzeitig zu einer verbesserten Barriere führt. Ein Grund dafür ist die beidseitige Besiedlung des Transwells und die damit einhergehende erhöhte Zelldichte. Außerdem sollte sich die Anwesenheit eines zweiten Zelltyps positiv auf die Differenzierung des Lungenepithels auswirken. Weiterhin wurde erwartet, dass die Monokultur im Vergleich zu der Submerskultur eine deutlich bessere Barriere ausbildet, da es während des Airlifts zur verstärkten Ausprägung von Zellkontakten kommt. Diese verschiedenen Annahmen konnten nur zum Teil und jeweils nur von einem der Zelltypen bestätigt werden. Vermutlich ist der Differenzierungs- und Proliferationserfolg stark auf das verwendete Medium und somit auf spezielle Zusätze zurückzuführen. Zudem sind anscheinend auch die eingesetzten Zellen für dieses Ergebnis verantwortlich, da sich Primärzellen und Zelllinien sehr stark voneinander unterscheiden. Aufgrund dessen müssen zukünftig weitere Untersuchungen angestellt werden, um die Ursache für diese Ergebnisse zu ermitteln.

6.7 Beurteilung der Aussagekraft und Funktionalität der erzeugten Airlift-Kulturen

Die Atemwege fungieren nicht nur als physikalische Barriere, sondern sie sind auch für die angeborene Immunität und Homöostase verantwortlich. Aufgrund dieser zahlreichen Funktionen setzt sich das menschliche Atemwegsepithel aus einer gemischten Population von Flimmer-, Basal- und sekretorischen Zellen zusammen. Der Differenzierungszustand des menschlichen Atemwegsepithels ist besonders für Infektionen durch Atemwegserreger, wie bspw. SARS-CoV-2 ausschlaggebend (Cao, et al., 2020). Aus der Literatur war bekannt, dass Zellen die an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche kultiviert werden in der Lage sind eine zelluläre Differenzierung zu durchlaufen und somit ein *in vivo* ähnliches Transkriptionsprofil anzunehmen. Aufgrund dessen wurde die Expression von bestimmten Epithelzellmarkern sowohl auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene mithilfe einer qRT-PCR sowie einer Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Hierbei wurden die Proteine AQP5, SFTPC, α -Tubulin und ZO1 innerhalb der Airlift-Kultur nachgewiesen. Mithilfe der quantitativen Real-Time PCR wurde die Expression der Gene AQP5, CDH1, KI-67 und MUC1 untersucht.

Mithilfe der Immunfluoreszenz wurden 7-tägige Airlift-Kulturen der Zelllinie A549 auf das Vorhandensein pulmonaler Proteine untersucht. So konnte bspw. das Protein ZO1 nachgewiesen werden. ZO1 stellt eines der wichtigsten Proteine der Atemwege dar, welches

für die Ausbildung von Tight Junctions verantwortlich ist (Wang, et al., 2018). Tight Junctions sind wiederum wichtiger Bestandteil, um den parazellulären Durchgang von Molekülen und damit die Barrierefunktion zu regulieren. Allerdings ist ZO1 nicht nur für die Permeabilität bzw. eine geschlossene Barriere verantwortlich, sondern gleichzeitig auch ein essentieller Bestandteil der angeborenen Immunität. Diese Funktion ist essentiell, da die Atemwege die erste Barriere gegenüber eingeatmeten Fremdstoffen darstellen (Cao, et al., 2020). Neben ZO1 wurde auch das Protein α -Tubulin innerhalb der Airlift-Kulturen nachgewiesen. Dieses stellt einen speziellen Marker für die in der Lunge vorkommenden Flimmerzellen dar. Flimmerzellen machen etwa 50 % – 70 % der gesamten Epithelzellpopulation und besitzen um die 200 bis 300 Zilien. Eine Zilie ist etwa 6 μ m lang und eine auf Mikrotubuli basierende Struktur (Cao, et al., 2020). Flimmerzellen sind in der Lage ihre Bewegungskraft zu nutzen, um im Schleim eingeschlossene Fremdstoffe aus den Atemwegen zu entfernen. Die Kraft für die mukoziliäre Clearance wird dabei durch die in den Mitochondrien erzeugte Energie angetrieben. Das Protein α -Tubulin ist in der Abbildung 17A zu sehen, wobei es sich um die Zellkerne angeordnet hat. Allerdings befinden sich Flimmerzellen üblicherweise auf der apikalen Seite der epithelialen Oberfläche, weshalb die mikroskopischen Aufnahmen nicht optimal sind. Es wäre zukünftig von Vorteil Querschnitte bzw. Ortho-Aufnahme der Airlift-Kulturen anzufertigen, um die Lage des Proteins α -Tubulin besser charakterisieren zu können (Rayner, et al., 2019). Des Weiteren wurde auch das Surfactant-Protein C (SFTPC) mithilfe der Immunfluoreszenz nachgewiesen. SFTPC ist ein hydrophobes Protein, welches hauptsächlich in Lungensurfactant vorzufinden ist. Die Funktion des Surfactant-Proteins besteht in der Aufrechterhaltung der Oberflächenspannung und somit der Stabilität des Lungengewebes. Die mikroskopischen Aufnahmen (Abb. 17 C) zeigen ein fleckenartiges Vorhandensein von SFTPC, wie es auch schon bei der Alcianblau-Färbung sichtbar war. Die Anwesenheit von SFTPC untermauert somit die Ergebnisse der Alcianfärbung. Die Zelllinie A549 ist in der Lage, Surfactant zu produzieren. Auch andere Forscher waren in der Lage die Schleimproduktion der A549-Zellen bereits nach 3-tägigen Airlift festzustellen. Die höchste Expression an SFTPC konnte nach 14-tägigem Airlift nachgewiesen werden (Wu, et al., 2017).

Mithilfe der quantitativen Real-Time PCR wurden die Genexpressionsprofile unterschiedlicher Airlift-Kulturen untersucht. Das Wassertransportgen AQP5 wurde sowohl bei den Airlift-Kulturen der beiden Zelllinien A549 und EA.hy926 als auch bei den Primärzellen HBEpC und HUVEC nachgewiesen. AQP5 (Aquaporin-5) wird im Alveolarepithel exprimiert und dient dazu

den osmotisch angetriebenen Wassertransport durch die apikale Membran zu erleichtern (Ren, et al., 2016). Bei den Zelllinien wurde das AQP5-Gen in den Airlift-Kulturen am höchsten exprimiert. In den Kokulturen war allerdings keine Hochregulation erkennbar. Der Grund dafür ist bisher noch ungeklärt. Es besteht allerdings die Vermutung, dass die beiden Zelllinien A549 und EA.hy926 keine gute Kombination darstellen. Möglicherweise ist der Nährstoffentzug aus dem Medium, aufgrund der hohen Zellzahl ein potentieller Störfaktor für die Kokultur. Zudem wurde beim Vergleich von Zelllinien und Primärzellen sichtbar, dass die Kulturen der Primärzellen signifikant höhere Expressionen an AQP5 aufwiesen. Begründen könnte man diese Beobachtung vermutlich damit, dass Zelllinien nur eingeschränkt in der Lage sind die Eigenschaften von Alveolarepithelzellen *in vitro* zu rekonstruieren (Barosova, et al., 2021). Die Primärzellen zeigten durchschnittlich eine 15-fache Steigerung der AQP5-Expression gegenüber der Submerskultur. Daran ist zu erkennen, dass bei den Primärzellen sowohl mit der Airlift- als auch der Kokultur eine signifikante Steigerung des Wassertransportgens AQP5 erreicht werden konnte.

Neben des Wassertransportgens AQP5 wurde auch die Expression von E-Cadherin (CDH1) innerhalb der Airlift-Kulturen untersucht. Die Funktion der epithelialen Barriere ist auf das Vorhandensein von adhärenenten Verbindungen zurückzuführen. E-Cadherin ist solch ein essentielles Verbindungsprotein und gleichzeitig für die Ausbildung von Adherens Junctions verantwortlich. Zudem ist es wichtiger Bestandteil des Aktin-Zytoskeletts, welches die Zelle stabilisiert und Bewegung ermöglicht. Darüber hinaus bildet E-Cadherin Zellkontakte zwischen benachbarten Epithelzellen und ist gleichzeitig an der Aufrechterhaltung der apikalen-basalen-Polarität beteiligt, welche für ein aussagekräftiges Lungen-in-vitro-Modell ausschlaggebend ist. Des Weiteren haben Forscher herausgefunden, dass CDH1 zusätzlich in der Lage ist die Proliferation und Differenzierung des Atemwegsepithels gezielt durch die Unterdrückung spezieller Signalwege zu regulieren (Post, et al., 2018). Somit besitzt E-Cadherin zahlreiche essentielle Funktionen, weshalb der Nachweis für die Untersuchung der Funktionalität der entwickelten Modelle unerlässlich ist. E-Cadherin wurde in allen untersuchten Proben exprimiert. In den A549 und HBEpCs konnte die erhöhte Expression an CDH1 sowohl in den Airlift- als auch in den Kokulturen festgestellt werden. Zudem ist sichtbar, dass die Expression in den Kokulturen nochmal deutlich höher ist. Bezüglich der Primärzellen konnte zusätzlich festgestellt werden, dass die Expression an CDH1 und somit die Ausbildung von Adherens Junctions mithilfe des Air-Liquid-Interface-Mediums gesteigert werden konnte. Diese erhöhte

Expression von E-Cadherin unter Verwendung des Air-Liquid-Interface-Mediums stützt die Ergebnisse der Permeabilitätsmessung. Die gute Barrierefunktion in Gegenwart dieses Mediums wird vor allem durch das komplexe Netzwerk an Zellkontakten realisiert.

Die biphasigen Kultivierungsbedingungen einer Airlift-Kultur dienen dazu, die Zellen einerseits der Luft auszusetzen und andererseits mit den im Medium befindlichen Zusätzen zu versorgen. Der wichtigste Schritt bei der Erzeugung eines ALI-Modells stellt der Airlift der Zellen dar, ab diesem Zeitpunkt soll die Proliferation vermieden und die Differenzierung in zelltypspezifische Marker gefördert werden (PromoCell, 2021). Aufgrund dessen ist die Etablierung eines geeigneten Airlift-Mediums unerlässlich, welches sowohl in der Lage ist die Zellpopulation aufrechtzuerhalten und gleichzeitig die Differenzierung zu unterstützen. KI-67 ist ein Proliferationsmarker. In der Arbeit konnte herausgefunden werden, dass die Airlift-Kultur der Karzinomzelllinie A549 eine doppelt so hohe Expression von KI-67 im Vergleich zur Submerskultur aufweist. Dies widerspricht allerdings der zuvor aufgestellten Annahme. Der Grund dafür könnte sein, dass sich das CM-Medium ausschließlich als Kultur- und nicht als Airlift-Medium eignet. Die hohe Zellproliferation könnte sich negativ auf die Differenzierung auswirken, was wiederum die geringe Expression an AQP5 erklären könnte. Die Kokulturen der Zelllinien zeigen ebenfalls eine doppelt so hohe Expression an KI-67. Da für die PCR-Untersuchung die Zellen auf beiden Seiten der Transwellmembran lysiert wurden, kann nicht unterschieden werden ob KI-67 in den Endothelzellen hier einen bedeutenden Anteil ausmacht. Die Airlift-Kulturen der Primärzellen wiesen im Gegensatz zu den Submerskulturen eine verminderte KI-67 Expression auf. Hier muss man allerdings nochmal zwischen den verwendeten Medien differenzieren, da das Air-Liquid-Interface-Medium die Proliferation noch besser einschränken konnte. In der Kokultur konnte keine Runterregulation gemessen werden. Hier ist aber wieder der Anteil des endothelialen KI-67 nicht bekannt. Daran ist zu erkennen, dass der „Proliferationserfolg“ eines Airlift-Modells sowohl von den Zellen als auch von dem verwendeten Medium abhängt. Somit konnte die Proliferation während des Airlift am besten mithilfe der Primärzellen unter Verwendung des Air-Liquid-Interface-Mediums gehemmt und die Differenzierung gefördert werden.

Die Kokultur der Primärzellen weist die höchste Expression an MUC1 auf, gefolgt von der Airlift-Kultur des Air-Liquid-Interface-Mediums. Die Zellschicht des ALI-Basalmediums wies nur eine sehr geringe Expression an MUC1 auf. Anhand dieser Ergebnisse ist wiederum zu sehen,

dass die Expression von dem verwendeten Medium abhängt und durch das Air-Liquid-Interface-Medium gefördert werden kann. Trotz alledem sind die Ergebnisse unerwartet, da die Kokultur aus HBEPc und HUVEC bei der Alcianblau-Färbung einen geringen Muzin-Gehalt, allerdings bei der qRT-PCR die höchste MUC1-Expression aufwies. Grund dafür ist wahrscheinlich, dass sich die Alcianblau-Färbung genauso wenig wie die H&E-Färbung für die korrekte Beurteilung der Aussagekraft eines Airlift-Modells eignet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Differenzierungserfolg einer Airlift-Kultur von den verwendeten Zellen und dem eingesetzten Medium abhängt. Mithilfe der humanen primären Bronchialepithelzellen unter Verwendung des Air-Liquid-Interface-Mediums sowie der Kokultivierung mit den primären Endothelzellen HUVEC, konnten die höchsten Expressionen pulmonaler Gene nachgewiesen werden. Aufgrund dessen ist davon auszugehen, dass die Aussagekraft und *in vivo* Ähnlichkeit dieser Modelle am größten ist und sich daher für zukünftige toxikologische Fragestellungen am besten eignen. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Airlift- als auch die Kokulturen in der Lage waren Flimmerzellen, eine schützende Muzinschicht sowie geschlossene Zellkontakte für die mukoziliäre Clearance auszubilden. Des Weiteren konnten die erzeugten Kulturen den Wassertransport durch die semipermeable Membran rekonstruieren und dadurch die Versorgung mit ausreichend Flüssigkeit sicherstellen. Vermutlich kann die Aussagekraft des Primärzellen-Modells mit zunehmender Kultivierungsdauer bis zu maximal 28 Tagen zusätzlich gesteigert werden. Allerdings war die Realisierung solch eines Zeitraumes nicht möglich, weshalb es wichtig ist, die Genexpressionsprofile sowohl nach 21 als auch nach 28 Tagen zu untersuchen. Dadurch kann der optimale Zeitpunkt für das ALI-Modell ermittelt werden.

6.8 Erste Untersuchungen zur mechanischen Stimulation des Lungenmodells

Die Lunge ist einer kontinuierlichen mechanischen Dehnung ausgesetzt, welche einerseits auf die rhythmische Atembewegung und andererseits auf die durch den Blutfluss erzeugte Scherspannung zurückzuführen ist. Diese mechanischen Reize wirken auf die umliegende Gefäßwand und führen wiederum zum Umbau der Endothelbarriere. Besonders das flache und einzellschichtige Epithel der Lungenbläschen ist von dieser Kontraktion stark betroffen. Es wird davon ausgegangen, dass mechanischer Stress zu physiologischen, morphologischen und biochemischen Genexpressionsveränderungen führt. Dabei ist allerdings die Höhe der Stimulation ausschlaggebend. Aufgrund der komplexen Verteilung der Dehnungsmuster, ist es

schwer die mechanische Belastung innerhalb der Atemwege exakt zu bestimmen, weshalb man bisher dieselbe Dehnung wie im Alveolarepithel annimmt. Diesbezüglich geht man von einer zyklischen Dehnung zwischen 8 % bis 12 % und einer Frequenz von 12 BPM bis 20 BPM aus (Zeinali, et al., 2021). Die mechanische Belastung kann *in vitro* mit Hilfe von Zelldehnungsgeräten simuliert werden. Allerdings basieren alle bisher entwickelten Modelle auf zweidimensionalen Zellkulturplattformen, welche nicht in der Lage sind die komplexe Dreidimensionalität des Epithelgewebes nachzuahmen. Aufgrund dessen wurde eine neue Entwicklung vom Fraunhofer IWS verwendet, das MPSstimulus. Es ermöglicht die Dehnung einer elastischen Membran, die von beiden Seiten mit Medium überschichtet sein kann. Die Dehnung der Membran wird nur durch die Beaufschlagung mit Druckluft realisiert. Das System ist für die Verwendung von Transwell-ähnlichen Einsätzen ausgelegt. Die elastische Membran befindet sich dabei am Boden der Einsätze. Durch kontinuierlichen Druck wird diese radial ausgedehnt. Mit einer Kollagen beschichteten Membran gab es bisher noch keine Erfahrungen. Daher wurde zunächst untersucht, ob sich eine mit Poren ausgestattete und mit Kollagen beschichtete Membran überhaupt auslenken lässt. Die Ergebnisse zeigten, dass kein direkter Zusammenhang zwischen der Dichte und der maximal erreichbaren Auslenkung besteht. Selbst Membranen die eine ähnliche Durchlässigkeit für TRITC-Dextran aufwiesen, ließen sich letztendlich unterschiedlich stark auslenken. Vermutlich ist diese Beobachtung auf die inhomogene Beschichtung der einzelnen Einsätze zurückzuführen. Einige Kollagenmembranen wurden zusätzlich mit Elastin behandelt. Elastin ist ein essentielles Faserprotein des menschlichen Körpers, welches in der Lage ist die Dehnungsfähigkeit zu verbessern. Allerdings konnte mithilfe der Untersuchungen gezeigt werden, dass Elastin zur Destabilisierung des Kollagennetzwerkes beiträgt, was sich wiederum in hohen Durchlässigkeiten widerspiegelte. Diesbezüglich muss angeführt werden, dass die vollständige Geschlossenheit der erzeugten Kollagenmembran die wichtigste Voraussetzung für ein funktionierendes Modell ist. Nicht nur um eine reproduzierbare Barriere und Dehnung gewährleisten zu können, sondern weil Lücken innerhalb der Membran Angriffspunkte für Risse und Verletzungen darstellen. Des Weiteren würde es beim Anlegen von Druck zu einem hohen Medium Verlust kommen, wodurch die Membran austrocknen und versteifen würde.

Bisher war noch nicht bekannt wie viel Druck am MPSstimulus anlegt werden muss, um eine physiologische Ausdehnung von 8 % bis 12 % zu erreichen. Aufgrund dessen wurde ein Rechenansatz über die Bogenlänge mithilfe von Integralrechnung aufgestellt (Punkt 5.6.3). Die

Rechnung beruhte auf den Mittelwerten der gemessenen Auslenkungen. Diese Methode hat dazu geführt, dass ein Druck von 100 mbar am MPSstimulus angelegt werden muss, um eine 12,5 %-ige Auslenkung der Kollagenmembran zu erreichen. Dieser Ansatz ist nicht verallgemeinerbar, was einen Nachteil darstellt, jedoch ist es bisher die einzige Möglichkeit, die prozentuale Ausdehnung berechnen zu können. Diese wird nämlich benötigt, sobald man Zellen physiologisch und zyklisch dehnen möchte. Diesbezüglich wurden bereits erste Versuche mit der Lungenzelllinie A549 und den primären Bronchialepithelzellen HBEpC durchgeführt. Die Atembewegung ist für die Regulierung der Alveolardifferenzierung ausschlaggebend und gleichzeitig wichtiger Bestandteil während der Reaktion bei Wundverletzungen (Sengupta, et al., 2022). Die Zellen wurden innerhalb der Netwells ausgesät und anschließend für 24 Stunden inkubiert. Daraufhin wurden sie in das MPSstimulus-System eingebracht und für 24 sowie 72 Stunden zyklisch gedehnt und anschließend mittels CellMask Deep Red angefärbt. Für die Dehnung wurde ein maximaler Druck von 100 mbar und eine Frequenz von 12 BPM verwendet. Nach 24-stündiger Dehnung war sowohl bei den Primärzellen HBEpC als auch bei der Zelllinie A549 eine verstärkte Ausprägung der Aktin-Zytoskelettfilamente sowie der Tight Junctions erkennbar. Zudem konnte eine koordinierte Neuordnung des Zytoskeletts beobachtet werden, welche laut Literatur mit einer erhöhten Expression der Gene CDH1 und ZO1 einhergeht (Sengupta, et al., 2022). Grund für diese Reaktion ist die Kalzium Signalisierung, welche durch den Piezo1 Mechanosensor aktiviert wird und zum Einstrom von Calcium-Ionen ins Zellinnere führt. Diese Ionen fungieren als starke Second Messenger und induzieren die beobachteten Zellformänderungen, um ein Spannungsversagen bzw. eine Zerstörung der Monoschicht zu verhindern. Besonders Integrine und Cadherine sind an der induzierten zellulären Reaktion, auf mechanische Belastung beteiligt. Bei anhaltender oder zu starker Dehnung besteht allerdings die Gefahr, dass der Mechanosensor in seiner Funktion gehemmt und der Kalziumeinstrom vermindert wird. Was zur Folge hat, dass der zelluläre Umbau gestoppt wird und sich das Aktin-Zytoskelett versteift (Miroshnikova, et al., 2021). Genau dieses Phänomen konnte vermutlich nach 72-stündiger Dehnung der Zelllinie A549 beobachtet werden, da sich kaum noch Zellen auf der Membran befanden und keine Zellkontakte mehr ersichtlich waren. Es kann allerdings auch sein, dass die Membran aufgrund der zu hohen Belastung gerissen ist, wodurch keine reproduzierbare Dehnung mehr gewährleistet werden konnte. Für die Netwells speziell existieren bisher keine vergleichbaren Ergebnisse, da sich das MPSstimulus immernoch in seiner Entwicklung befindet und Netwells für diese Zwecke noch nicht in der Literatur etabliert wurden. Trotz alledem sind

die Ergebnisse vielversprechend und zeigen, dass Zellen mit dem MPSstimulus für mindestens 24 Stunden physiologisch gedehnt werden können, ohne sich von der Membran abzulösen. Zudem konnte durch die Neuorientierung des Zytoskeletts nachgewiesen werden, dass die Zellen auf die mechanische Stimulation reagieren und versuchen sich an die neuen Gegebenheiten anzupassen. Allerdings wird es zukünftig wahrscheinlich schwierig sein eine ALI-Kultur innerhalb der Einsätze zu realisieren, da eine Langzeitkultivierung aufgrund des hohen Medienbedarfs sehr kostenintensiv ist. Zudem stellt die Beschichtung der Netwells (Gitterabstand 440 μm) eine Herausforderung dar, da die Gitterabstände sehr groß sind und es daher schwierig ist, das Polymernetz lückenlos mit Kollagen zu benetzen.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich die an der Luft-Flüssigkeitsgrenze kultivierten primären Bronchialepithelzellen HBEpC für die Realisierung eines physiologisch relevanten Lungenbläschen-Modells besser eignen, als die Zelllinie A549. Unter Verwendung des Air-Liquid-Interface-Mediums konnten Epithelzellschichten mit *in vivo* ähnlichsten Genexpressionprofilen erzeugt werden. Die Kokultivierung mit Endothelzellen förderte die Expression typischer Markerproteine zusätzlich. Die Reaktionsfähigkeit des Modells auf TGF- β 1 und die Ausbildung einer funktionellen Barriere zeigen die Eignung des Modells für zukünftige toxikologische Untersuchungen. Mithilfe erster Experimente konnte gezeigt werden, dass Lungenzellen für mindestens 24 Stunden physiologisch gedehnt werden können und dabei durch die Neuorientierung der F-Aktin-Zytoskelett-Filamente auf die mechanische Belastung reagieren.

7 Ausblick

Um das entwickelte Lungen-in-vitro-Modell zukünftig noch *in vivo* ähnlicher gestalten zu können, bietet es sich an, die verwendete Beschichtungslösung zusätzlich mit weiteren EZM-Proteinen, wie bspw. Laminin oder Fibronectin zu versetzen. Dadurch würde der synthetische Charakter der semipermeablen Membran zunehmend gemindert und die Eigenschaften der natürlichen Basalmembran verbessert rekonstruiert werden. Darüber hinaus sollten die durchgeführten Versuche mit embryonalen, induzierten pluripotenten oder mesenchymalen Stammzellen wiederholt werden, da diese nachweislich in der Lage sind, sich in Pneumozyten Typ II zu differenzieren und eine schützende Surfactant-Schicht abzusondern (Ren, et al., 2016). Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die verwendete Lungenkarzinomzelllinie A549 nicht in der Lage ist ihre differenzierten Eigenschaften langfristig aufrechtzuerhalten, wodurch die *in vivo* Situation nur eingeschränkt rekonstruiert werden konnte. Allerdings war die Zelllinie für die Etablierung des ALI-Modells unerlässlich. Die eingesetzten primären Bronchialepithelzellen waren im Gegensatz zu der Zelllinie A549 hochgradig differenziert. Jedoch stellen die anspruchsvolle Kultivierung und die hohen Kosten einen beträchtlichen Nachteil dar, weshalb vergleichbare Alternativen gefunden werden müssen (Klein, et al., 2011). Zudem ist es wichtig die durchgeführten Genexpressionsanalysen zu wiederholen und die Messungen an mehreren Tagen und somit zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchzuführen. Das Ziel besteht diesbezüglich darin, den optimalen Zeitpunkt für das ALI-Modell zu ermitteln, an dem die Aussagekraft für toxikologische Studien am größten ist. Für die vollständige Untersuchung der epithelialen Polarisierung würde es sich zusätzlich anbieten, die Proteinverteilung entlang der gesamten Zellschicht zu analysieren (Ren, et al., 2016). Für die Quantifizierung der entstandenen Barrierefunktion sowie der epithelialen Polarisierung der erzeugten Zellschicht können nachfolgend unterschiedliche Messmethoden, wie bspw. die Bestimmung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) oder der transepithelialen Potentialdifferenz (TEPD) zum Einsatz kommen. Der TEER dient hauptsächlich zur Beurteilung der epithelialen Integrität, welche durch Tight Junctions aufrechterhalten wird. Veränderungen innerhalb der Gewebeintegrität sind anhand von Veränderungen des Ionenflusses erkennbar (Ren, et al., 2016). Um die Nachteile der Gefrierschnitte zukünftig zu umgehen, können die Membranen in Paraffin eingebettet werden, wodurch die Strukturhaltung nachweislich verbessert wird. Allerdings ist diese Einbettungsmethode aufgrund des Schneidens sehr anspruchsvoll und Bedarf langes Training (Sasaki, et al., 2021). Um die Funktion des

entwickelten Lungen-in-vitro-Modells bewerten zu können, würde es sich anbieten, das Lungenepithelgewebe einem pulmonalen Medikament auszusetzen, dessen Wirkung bereits gut bekannt ist. Nur wenn das Modell *in vitro* die gleiche Reaktion wie *in vivo* zeigt, ist davon auszugehen, dass das Modell alle notwendigen Eigenschaften besitzt, um zukünftig für toxikologische Studien zur Beurteilung der Arzneimittelsicherheit verwendet zu werden. Diesbezüglich eignet sich bspw. das Asthma-Medikament, Beclomethasondipropionat, dessen Wirkung in der Literatur bereits umfangreich etabliert wurde (Brodgen, et al., 1984). Des Weiteren wäre es möglich eine umfassende RNA-Sequenzierung des entstandenen Modells durchzuführen und diese mit den Daten des realen Gewebes zu vergleichen. Die Ergebnisse sollten sich größtenteils ähneln, erst dann kann man von einem erfolgreichen und funktionierenden Lungen-in-vitro-Modell ausgehen. Bezüglich des MPSstimulus-Systems sind wie bereits angesprochen noch Optimierungen notwendig, weshalb zukünftig ausschließlich nur noch Netwells mit einer Porengröße von 74 μm verwendet werden sollten. Diesbezüglich wäre es wichtig die Verträglichkeit der Kollagenmembran für die Primärzellen zu untersuchen. Darüber hinaus würde es sich anbieten, auch Kokulturen innerhalb der Netwell-Einsätze zu realisieren und die Genexpression des gedehnten und des ungedehnten Zustandes miteinander zu vergleichen. Zudem wäre es möglich die verwendeten Dehnungsparameter zu variieren und die Veränderungen der zellulären Morphologie in regelmäßigen Zeitabständen zu beobachten bzw. zu beurteilen.

8 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, eine Luft-Flüssigkeits-Grenzflächenzellkultur sowohl mit der Lungenkarzinomzelllinie A549 als auch mit den primären Bronchialepithelzellen HBEpC erfolgreich im zellbiologischen Labor des FILK zu etablieren. Um das entstandene Lungenmodell noch physiologischer zu gestalten, wurden neben den beiden Epithelzellen auch Endothelzellen eingesät. Diesbezüglich kamen die somatische Hybridzelllinie EA.hy926 und die Primärzellen HUVEC zum Einsatz. Kultiviert wurden die Zellen auf Transwell-Einsätzen, die eine biphasige Kultivierung von Zellen sowohl an der Luft als auch im Medium ermöglichen. Allerdings ist die semipermeable Membran synthetischen Ursprungs und somit nicht in der Lage die *in vivo* Eigenschaften der extrazellulären Matrix des nativen Atemwegsepithels zu rekonstruieren. Aufgrund dessen wurde die Membran mit Kollagen Typ I beschichtet, welches bevorzugt in der Zellkultur eingesetzt wird, da es in der Lage ist die Proliferation und Adhäsion von Zellen nachweislich zu fördern. Bezüglich der optimalen Beschichtungsvariante konnte herausgefunden werden, dass sich eine dünne Kollagenbeschichtung am besten für die Kultivierung an der Luft-Flüssigkeitsgrenze eignet. Neben der Etablierung eines geeigneten Anhaftungssubstrats galt es auch passende Kultur- und Airlift-Medien für die unterschiedlichen Zellen zu finden. Die Kultivierung als auch der Airlift der Lungenkarzinomzelllinie A549 erfolgte in serumhaltigem RPMI-Medium. Für die primären Bronchialepithelzellen wurde als Kulturmedium, das ALI-Basal und für den Airlift das Air-Liquid-Interface-Medium von PromoCell verwendet. Das Kokulturmedium der Zelllinien A549 und EA.hy926 stellte das DMEM-Medium mit Glucose dar. Für die Kokultur der Primärzellen HBEpC und HUVEC wurde ein Gemisch aus EBM- und ALI-Basalmedium verwendet. Die resultierenden Epithelien wurden anhand der Ausbildung einer vollständig konfluenten Zellschicht, der Sekretion von Lungensurfactant und der Anwesenheit von Zilien charakterisiert. Die einzelnen Airlift-Kulturen wurden zusätzlich sowohl auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene mithilfe einer quantitativen Real-Time PCR sowie einer Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Hierbei konnte herausgefunden werden, dass sich die Primärzellen vor allem in Kombination mit den Endothelzellen für die Erzeugung eines Lungen-Modells eignen. Es konnte die Ausbildung von Zellkontakten mithilfe der Expression von ZO1 und E-Cadherin nachgewiesen werden, welche für die Aufrechterhaltung einer funktionellen Barriere sowie der Ausbildung einer apikal-basalen Polarität verantwortlich sind. Des Weiteren wurde durch das Vorhandensein der beiden Gene MUC1 und SFTPC die Anwesenheit einer schützenden Schleimschicht bestätigt.

Die an der mukoziliären Clearance beteiligten Flimmerzellen wurden auf der Membran mittels α -Tubulin nachgewiesen. Zudem konnte auch der osmotisch angetriebene Wassertransport durch die semipermeable Membran mithilfe der Expression von AQP5 festgestellt werden. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass die Funktionalität einer Airlift-Kultur von dem verwendeten Medium und den eingesetzten Zellen abhängt. Es kann daher geschlossen werden, dass die größte *in vivo* Ähnlichkeit mithilfe der Airlift-Kultur der Primärzellen HBEpC unter Verwendung des Air-Liquid-Interface-Mediums sowie der Kokultur mit den primären Endothelzellen HUVEC erreicht werden konnte, weshalb diese Modelle sich für zukünftige toxikologische Studien am besten eignen. Die mechanische Belastung ist für die Funktionalität des Lungenepithelgewebes ausschlaggebend, weshalb erste Untersuchungen mit dem vom Fraunhofer Institut (IWS) entwickelten MPSstimulus durchgeführt wurden. Diesbezüglich konnte berechnet werden, dass sich die verwendete Kollagenmembran bei einem Druck von 100 mbar um etwa 12,5 % physiologisch auslenken lässt. Erste Experimente mit Zellen haben gezeigt, dass sich pulmonale Epithelzellen für mindestens 24 Stunden physiologisch dehnen lassen und durch die Neuorientierung bzw. Verstärkung ihrer F-Aktin-Zytoskelett-Filamente auf die mechanische Stimulation reagieren.

9 Summary

Within the scope of this work, an air-liquid interface cell culture with both the lung carcinoma cell line A549 and the primary bronchial epithelial cells HBEpC was successfully established in the cell biology laboratory of the FILK. In order to make the resulting lung model even more physiological, endothelial cells were also seeded in addition to the two epithelial cells. For this purpose, the somatic hybrid cell line EA.hy926 and the primary cells HUVEC were used. The cells were cultivated on transwell inserts, which allow biphasic cultivation of cells both in air and in the medium. However, the semi-permeable membrane is of synthetic origin and thus unable to reconstruct the *in vivo* properties of the extracellular matrix of the native airway epithelium. Therefore, the membrane was coated with collagen type I, which is preferably used in cell culture as it has been shown to promote cell proliferation and adhesion. With regard to the optimal coating variant, it was found that a thin collagen coating is best suited for cultivation at the air-liquid interface. In addition to establishing a suitable attachment substrate, it was also necessary to find suitable culture and airlift media for the different cells. The cultivation as well as the airlift of the lung carcinoma cell line A549 was carried out in serum-containing RPMI medium. For the primary bronchial epithelial cells, ALI-Basal was used as culture medium and PromoCell's Air-Liquid-Interface medium was used for the airlift. The coculture medium of the cell lines A549 and EA.hy926 was the DMEM medium with glucose. For the coculture of the primary cells HBEpC and HUVEC, a mixture of EBM and ALI basal medium was used. The resulting epithelia were characterised by the formation of a fully confluent cell layer, secretion of lung surfactant and the presence of cilia. The individual airlift cultures were also analysed at both the transcriptional and translational levels using quantitative real-time PCR and immunofluorescence staining. It was found that the primary cells, especially in combination with the endothelial cells, are suitable for the generation of a lung model. The formation of cell contacts with the help of the expression of ZO1 and E-cadherin could be demonstrated, which are responsible for the maintenance of a functional barrier and the formation of an apical-basal polarity. Furthermore, the presence of the two genes MUC1 and SFTPC confirmed the presence of a protective mucus layer. The ciliated cells involved in mucociliary clearance were detected on the membrane using α -tubulin. In addition, the osmotically driven water transport through the semi-permeable membrane could also be determined with the help of the expression of AQP5. The investigations have shown that the functionality of an airlift culture depends on the medium and cells used. It can

therefore be concluded that the greatest *in vivo* similarity was achieved using the airlift culture of primary cells HBEPc using the air-liquid interface medium and the coculture with primary endothelial cells HUVEC, which is why these models are best suited for future toxicological studies. The mechanical load is crucial for the functionality of the lung epithelial tissue, which is why initial investigations were carried out with the MPSstimulus developed by the Fraunhofer Institute (IWS). In this regard, it could be calculated that the collagen membrane used can be physiologically deflected by about 12.5 % at a pressure of 100 mbar. Initial experiments with cells have shown that pulmonary epithelial cells can be physiologically stretched for at least 24 hours and respond to the mechanical stimulation by reorienting or strengthening their F-actin cytoskeletal filaments.

Literaturverzeichnis

- Agu, R. U., Jorissen, M., Willems, T., Augustijns, P., Kinget, R., & Verbeke, N. (November 2001). In-vitro nasal drug delivery studies: comparison of derivatised, fibrillar and polymerised collagen matrix-based human nasal primary culture systems for nasal drug delivery studies. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, S. 1447-1456.
- Arik, Y. B., Vivas, A., Laarveld, D., Laar, N., Gemser, J., Visscher, T., . . . Meer, A. (12. Juli 2021). Collagen I Based Enzymatically Degradable Membranes for Organ-on-a-Chip Barrier Models. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, S. 2998-3005.
- Artym, V. V., & Matsumoto, K. (01. September 2011). Imaging Cells in Three-Dimensional Collagen Matrix. *Curr Protoc Cell Biol*.
- Bals, R., Beisswenger, C., Blouquit, S., & Chinet, T. (August 2004). Isolation and air-liquid interface culture of human large airway and bronchiolar epithelial cells. *Journal of Cystic Fibrosis*, S. 49-51.
- Barosova, H., Meldrum, K., Karakocak, B., Balog, S., Doak, S., Petri-Fink, A., . . . Rothen-Rutishauser, B. (September 2021). Inter-laboratory variability of A549 epithelial cells grown under submerged and air-liquid interface conditions. *Toxicology in Vitro*.
- Bebök, Z., Tousson, A., Schwiebert, L., & Venglarik, C. (Januar 2001). Improved oxygenation promotes CFTR maturation and trafficking in MDCK monolayers. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, S. 135-145.
- Bilsing, P. D., Börstler, A., Dietze, J., Firtzlaff, D.-H., Goldberg, D., Klawitter, D., . . . Weber, S. (2007). "Basiswissen Schule" Biologie Abitur. (P. D. Probst, & P. Schuchardt, Hrsg.) Duden PAETEC Schulbuchverlag.
- Bluhmki, T., Bitzer, S., Gindele, J., Schruf, E., Kiechle, T., Webster, M., . . . Heilker, R. (3. August 2020). Development of a miniaturized 96-Transwell air-liquid interface human small airway epithelial model. *Scientific Reports*.
- Bräumer, K. (10. Dezember 1974). Das Faserprotein Kollagen. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*.
- Brogden, R. N., Heel, R., Speight, T., & Avery, G. (August 1984). Beclomethasone dipropionate. A reappraisal of its pharmacodynamic properties and therapeutic efficacy after a decade of use in asthma and rhinitis. *Drugs*.
- Buckley, A. G., Loi, K., Iosifidis, T., Ling, K.-M., Sutanto, E., Martinovich, K., . . . Stick, S. (1. Februar 2018). Visualisation of Multiple Tight Junctional Complexes in Human Airway Epithelial Cells. *Biological procedures online*.
- Cao, X., Coyle, J., Xiong, R., Wang, Y., Heflich, R., Ren, B., . . . Rojanasakul, L. (11. November 2020). 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*, S. 104-132.
- Cozens, D., Sutherland, E., Marchesi, F., Taylor, G., Berry, C., & Davies, R. (5. Oktober 2018). Temporal differentiation of bovine airway epithelial cells grown at an air-liquid interface. *Scientific Reports*.
- Davies, P., & Tripathi, S. (Februar 1993). Mechanical stress mechanisms and the cell. An endothelial paradigm. *Circulation Research*, 72(2), S. 239-245.
- Evans, M. J., Winkle, L., Fanucchi, M., & Plopper, C. (2001). Cellular and molecular characteristics of basal cells in airway epithelium. *Experimental Lung Research*, S. 401-415.
- Even-Ram, S., & Yamada, K. (17. Oktober 2005). Cell migration in 3D matrix. *Current Opinion in Cell Biology*, 17(5), S. 524-532.
- Fratzl, P. (2008). *Collagen Structure and Mechanics*. Potsdam : Springer .

- Ganesan, S., Comstock, A., & Sajjan, U. (Oktober 2013). Barrier function of airway tract epithelium. *Tissue Barriers*.
- Gelman, R., Williams, B., & Piez, K. (10. Januar 1979). Collagen fibril formation. Evidence for a multistep process. *Journal of Biological Chemistry*, 254(1), S. 180-186.
- Hackett, T.-L., Warner, S., Stefanowicz, D., Shaheen, F., Pechkovsky, D., Murray, L., . . . Knight, D. (15. Juli 2009). Induction of epithelial-mesenchymal transition in primary airway epithelial cells from patients with asthma by transforming growth factor-beta1. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, S. 122-133.
- Harkema, J. R., Carey, S., & Wagner, J. (2006). The nose revisited: a brief review of the comparative structure, function, and toxicologic pathology of the nasal epithelium. *Toxicologic Pathology*, S. 252-269.
- He, R.-W., Braakhuis, H., Vandebriel, R., Staal, Y., Gremmer, E., Fokkens, P., . . . Cassee, F. (März 2021). Optimization of an air-liquid interface in vitro cell co-culture model to estimate the hazard of aerosol exposures. *Journal of Aerosol Science*.
- Heinen, N., Klöhn, M., Steinmann, E., & Pfänder, S. (Mai 2021). In Vitro Lung Models and Their Application to Study SARS-CoV-2 Pathogenesis and Disease. *Viruses*, 13(5).
- Huang, X., Guan, W., Xiang, B., Wang, W., Xie, Y., & Zheng, J. (18. Januar 2022). MUC5B regulates goblet cell differentiation and reduces inflammation in a murine COPD model. *Respiratory Research*.
- Kato, K., Lillehoj, E., Lu, W., & Kim, K. (Dezember 2017). MUC1: The First Respiratory Mucin with an Anti-Inflammatory Function. *Journal of Clinical Medicine*.
- Klein, S. G., Hennen, J., Serchi, T., Blömeke, B., & Gutleb, A. C. (Dezember 2011). Potential of coculture in vitro models to study inflammatory and sensitizing effects of particles on the lung. *Toxicology in Vitro*, 25(8), S. 1516-1534.
- Klein, S. G., Serchi, T., Hoffmann, L., Blömeke, B., & Gutleb, A. (26. Juli 2013). An improved 3D tetra-culture system mimicking the cellular organisation at the alveolar barrier to study the potential toxic effects of particles on the lung. *Particle and Fibre Toxicology*.
- Kühn, K. (August 1974). Struktur und Biochemie des Kollagens. *Chemie in unserer Zeit*, S. 97-103.
- Loret, T., Peyret, E., Dubreuil, M., Aguerre-Chariol, O., Bressot, C., Bihan, O., . . . Lacroix, G. (3. November 2016). Air-liquid interface exposure to aerosols of poorly soluble nanomaterials induces different biological activation levels compared to exposure to suspensions. *Particle and Fibre Toxicology*.
- Miller, A. J., & Spence, J. R. (12. April 2017). In Vitro Models to Study Human Lung Development, Disease and Homeostasis. *Physiology (Bethesda)*, S. 246–260.
- Miroshnikova, Y. A., Manet, S., Li, X., Wickström, S., Faurobert, E., & Albiges-Rizo, C. (19. August 2021). Calcium signaling mediates a biphasic mechanoadaptive response of endothelial cells to cyclic mechanical stretch. *Molecular Biology of the Cell*.
- Moreira, A., Müller, M., Costa, P., & Kohl, Y. (27. Dezember 2021). Advanced In Vitro Lung Models for Drug and Toxicity Screening: The Promising Role of Induced Pluripotent Stem Cells. *Advanced Biology*.
- Nossa, R., Costa, J., Cacopardo, L., & Ahluwalia, A. (28. April 2021). Breathing in vitro: Designs and applications of engineered lung models. *SAGE journals*.
- Park, K.-S., Wells, J., Zorn, A., Wert, S., Laubach, V., Fernandez, L., & Whitsett, J. (Februar 2006). Transdifferentiation of ciliated cells during repair of the respiratory epithelium. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, S. 151-157.
- Post, S., Heijink, I., Hesse, L., Koo, H., Shaheen, F., Fouadi, M., . . . Nawijn, M. (5. September 2018). Characterization of a lung epithelium specific E-cadherin knock-out model: Implications for obstructive lung pathology. *Scientific Reports*.

- PromoCell. (8. Juni 2021). Air-liquid interface culture: getting a closer look into our airways. *PromoCell*.
- Rayner, R. E., Makena, P., Prasad, G., & Cormet-Boyaka, E. (24. Januar 2019). Optimization of Normal Human Bronchial Epithelial (NHBE) Cell 3D Cultures for in vitro Lung Model Studies. *Scientific Reports*.
- Ren, H., Birch, N., & Suresh, V. (25. Oktober 2016). An Optimised Human Cell Culture Model for Alveolar Epithelial Transport. *PLOS ONE*.
- Rock, J. R., Randell, S. H., & Hogan, B. L. (3. Oktober 2010). Airway basal stem cells: a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling. *Dis Model Mech.*, S. 545-556.
- Sagi, I., & Afratis, N. (2019). *Collagen - Methods and Protocols*. Springer.
- Sasaki, M., Kishimoto, M., Itakura, Y., Tabata, K., Intaruck, K., Uemura, K., . . . Sawa, H. (5. November 2021). Air-liquid interphase culture confers SARS-CoV-2 susceptibility to A549 alveolar epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, S. 146-151.
- Schilpp, C., Lochbaum, R., Braubach, P., Jonigk, D., Frick, M., Dietl, P., & Wittekindt, O. (Februar 2021). TGF- β 1 increases permeability of ciliated airway epithelia via redistribution of claudin 3 from tight junction into cell nuclei. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*.
- Sengupta, A., Roldan, N., Kiener, M., Froment, L., Raggi, G., Imler, T., . . . Schneider-Daum, N. (17. Juni 2022). A New Immortalized Human Alveolar Epithelial Cell Model to Study Lung Injury and Toxicity on a Breathing Lung-On-Chip System. *Frontiers in Toxicology*.
- Srinivasan, B., Kolli, A., Esch, M., Abaci, H., Shuler, M., & Hickman, J. (April 2015). TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *Journal of Laboratory Automation*, S. 107-126.
- Staudt, M. R., Rogalski, A., Tilley, A., Kaner, R., Harvey, B.-G., & Crystal, R. (2014). Smoking Is Associated With A Loss Of Ciliated Cells Throughout The Airways. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*.
- Strengert, M., & Knaus, U. (2011). Analysis of epithelial barrier integrity in polarized lung epithelial cells. *Methods in Molecular Biology*, S. 195-206.
- Vogler, C. (19. Oktober 2009). Quantifizierung verschiedener Kollagentypen in Gewebeproben mittels elektrophoretischer und chromatographischer Methoden.
- Wang, H., Lina, H., Liu, B., Feng, Y., Zhou, H., Zhang, Z., . . . Feng, Z. (28. Juni 2018). Establishment and comparison of air-liquid interface culture systems for primary and immortalized swine tracheal epithelial cells. *BMC Molecular and Cell Biology*.
- Waters, C. M., Roan, E., & Navajas, D. (Januar 2012). Mechanobiology in Lung Epithelial Cells: Measurements, Perturbations, and Responses. *Comprehensive Physiology*, 2(1), S. 1-29.
- Wisniewska-Kruk, J., Hoeben, K., Vogels, I., Gaillard, P., Noorden, C., Schlingemann, R., & Klaassen, I. (März 2012). A novel co-culture model of the blood-retinal barrier based on primary retinal endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Experimental Eye Research*, S. 181-190.
- Wu, J., Wang, Y., Liu, G., Jia, Y., Yang, J., Shi, J., . . . Liu, X. (11. Dezember 2017). Characterization of air-liquid interface culture of A549 alveolar epithelial cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*.
- Xiong, R., Wu, Q., Muskhelishvili, L., Davis, K., Shemansky, J., Bryant, M., . . . Cao, X. (1. Dezember 2018). Evaluating Mode of Action of Acrolein Toxicity in an In Vitro Human Airway Tissue Model. *Toxicological Sciences*, S. 451-464.
- Zeinali, S., Thompson, E., Gerhardt, H., Geiser, T., & Guenat, O. (2. April 2021). Remodeling of an in vitro microvessel exposed to cyclic mechanical stretch. *APL Bioengineering*.

[URL-1]: aufgerufen am 22.05.2023, Carolyn Doan

URL: <https://www.leicabiosystems.com/de-de/knowledge-pathway/special-stains-which-one-why-and-how/>

[URL-2]: aufgerufen am 28.07.2023, Johanna Christine Ehlers

URL: https://macau.uni-kiel.de/rsc/viewer/dissertation_derivate_00008498/diss_jcehlers.pdf?page=1

[URL-3]: aufgerufen am 03.08.2023, PromoCell

URL: <https://promocell.com/product/human-bronchial-epithelial-cells-hbecp/>

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Freiberg, 17.08.2023



Hannah John