

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

**3D-Lungenorganoide als translationales Modell zur Wirkstoffentwicklung
und Krankheitsmodellierung chronischer Lungenerkrankungen**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes

Vorgelegt von

Michelle Brand, M.Sc.

Geb. am 24.04.1997 in Pirmasens

Eidesstattliche Erklärung

Erklärung gemäß § 7 Abs. 1 Nr. 2

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung des folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen:

1. Prof. Dr. Christoph Beißwenger: Bereitstellung des Themas, Betreuung der Doktorarbeit, Ratschläge bei wissenschaftlichen Fragestellungen
2. Prof. Dr. Dr. Robert Bals: Bereitstellung des Themas, Ratschläge bei wissenschaftlichen Fragestellungen
3. Dr. Christian Herr: Ratschläge bei wissenschaftlichen Fragestellungen
4. Dr. Felix Ritzmann: Ratschläge bei wissenschaftlichen Fragestellungen, Fachliche Betreuung der Arbeit, Hilfestellung bei der praktischen Ausführung der Einzelzellanalyse, Hilfe bei der Auswertung der Einzelzellanalysen
5. Anja Honecker: Technische Assistenz
6. Andreas Kamyschnikow: Immunhistochemische Färbungen, technische Assistenz
7. Victoria Weinhold: Hilfestellung bei Luminex-Assays, technische Assistenz
8. Timo Risch: Proteomik-Messung mittels Massenspektrometer, Hilfe bei der Auswertung der Proteomik-Daten
9. Dr. Kathrin Kattler-Lackes: Hilfe bei der Auswertung der Einzelzellanalysen

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

Homburg, 06.01.2026

Ort, Datum

Unterschrift des Promovierenden

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

Inhalt

Zusammenfassung	1
Summary	3
1. Einleitung	5
1.1 Der Respirationstrakt.....	5
1.2 Chronisch Obstruktive Lungenerkrankungen.....	6
1.2.1 Epidemiologie von COPD und Asthma bronchiale.....	6
1.2.2 Pathologische Veränderungen der Lunge bei COPD	7
1.2.3 Seneszenz bei der COPD	8
1.2.4 Rolle von IL-13 bei Asthma bronchiale	8
1.2.5 Das Altern der Lungenzellen	9
1.3 Seneszenz	10
1.3.1 Seneszenz-assoziiertes sekretorischer Phänotyp.....	13
1.3.2 Senolytische Wirkstoffe.....	15
1.3.3 Signalwege der Seneszenz – p16/p21/p53.....	16
1.4 Organoide	17
1.5 Ersatz von Tierversuchen	19
1.5.1 Einsatz von Tierversuchen.....	19
1.5.2 Die Unterschiede zwischen Mensch und Versuchstier.....	20
1.5.3 Zellkulturmodelle als Ersatz von Tierversuchen	22
1.6 Fragestellung der Arbeit.....	23
2. Material und Methoden	24
2.1 Material	24
2.1.1 Geräte.....	24
2.1.2 Verbrauchsmaterial.....	25
2.1.3 Primer	26
2.1.4 Antikörper.....	27
2.1.5 Lösungen und Puffer	28
2.1.6 Software.....	31
2.2 Methoden.....	32

2.2.1	Probengewinnung und -aufarbeitung.....	32
2.2.2	Zellbiologische Methoden	32
2.2.3	Molekularbiologische Assays.....	36
2.2.4	Molekularbiologische Methoden	37
2.2.5	Immunhistochemie (IHC).....	41
2.2.6	Quantifizierung von Zytokinen.....	43
2.2.7	Proteomik-Analyse	45
2.2.8	Einzelzellsequenzierung	47
2.2.9	Statistische Analysen.....	65
3.	Ergebnisse	66
3.1	Identifikation seneszenzartiger Zellen in Lungenorganoiden	66
3.1.1	Behandlung mit Dox und Senolytika bewirkt keine Veränderung der Seneszenz in 2D-Basalzellen.....	66
3.1.2	Behandlung mit Dox und Senolytika bewirkt in 3D-Lungenorganoiden ein Anstieg der SA- β -Gal-Aktivität.....	67
3.1.3	Senolytische Wirkstoffe unterdrücken die Wirkung von Dox in 3D-Lungenorganoiden	70
3.1.4	Met zeigt keine signifikante Wirkung auf die Dox-induzierte SA- β -Gal-Aktivität	75
3.1.5	Quer wirkt der Dox-induzierten Seneszenz entgegen.....	76
3.1.6	Die Einzelzellanalyse identifiziert seneszenzartige Zellen in der Lunge	77
3.1.7	Die Behandlung mit Dox erhöht die Expression von Entgiftungsgenen ausschließlich in Becherzellen	81
3.1.8	Seneszenzente Zellen sind durch eine erhöhte Aktivität der BATF- und PRDM1-Regulone gekennzeichnet	84
3.2	Etablierung und Charakterisierung Matrigel-freier Apikal-Out-Organoiden.....	86
3.2.1	IL-13 induziert einen sekretorischen Phänotyp in Apikal-Out-Organoiden.....	86
3.2.2	Charakterisierung der Differenzierung von Apikal-Out-Organoiden.....	94
3.2.3	Testung von Naturstoffen	97
4.	Diskussion	102
4.1	Charakterisierung von seneszenzartigen Zellen in 3D-Lungenorganoiden.....	103
4.2	Matrigel-freie Organoiden entwickeln nach Behandlung mit IL-13 einen sekretorischen Phänotyp.....	108

4.3	3D-Lungenorganoid-Modelle als Ersatz von Tierversuchen.....	111
4.4	Schlussbemerkung.....	114
	Literaturverzeichnis.....	115
	Abbildungsverzeichnis.....	147
	Tabellenverzeichnis.....	149
	Abkürzungsverzeichnis.....	151
	Veröffentlichungen.....	155
	Konferenzbeiträge.....	156
	Danksagung.....	157
	Lebenslauf.....	158
	Anhang.....	159

Zusammenfassung

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung und Mukoviszidose sind durch eine übermäßige Schleimproduktion, eine eingeschränkte mukoziliäre Clearance sowie eine verminderte Regenerationsfähigkeit des respiratorischen Epithels gekennzeichnet. Diese Veränderungen führen im Verlauf zu einem fortschreitenden Verlust der Lungenstruktur und -funktion bei den betroffenen Patienten. Da derzeitige Therapieansätze vor allem symptomorientiert sind und die Krankheitsprogression lediglich verlangsamen, besteht ein hoher Bedarf an innovativen Behandlungsstrategien. Das respiratorische Epithel stellt hierfür ein besonders attraktives Ziel dar.

Im Jahr 2021 wurden in Deutschland 1,86 Millionen Versuchstiere, überwiegend Nager, in Tierversuchen eingesetzt. Zusätzlich wurden 644.207 Tiere zur Organ- oder Gewebeentnahme getötet (Bf3R, 2023). Für die Erforschung von Atemwegserkrankungen wurden insgesamt 16.824 Tiere verwendet. Tierversuche sind für die regulatorische Sicherheitsbewertung gesetzlich vorgeschrieben. Laut Tierschutzgesetz (§7 Abs. 1) sind sie jedoch auf ein notwendiges und ethisch vertretbares Maß zu beschränken. Daher ist die Entwicklung menschlicher Zellmodelle unerlässlich, um die Zahl der Tiere zu reduzieren, die Aussagekraft zu erhöhen und den 3R-Prinzipien gerecht zu werden.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von 3D-Lungenorganoid-Plattformen zur Prüfung pharmazeutischer Wirkstoffe im Hinblick auf zelluläre Seneszenz, Entzündungsprozesse und Toxizität. Zur umfassenden Charakterisierung der Modelle kamen moderne Methoden wie die Einzelzellsequenzierung zum Einsatz.

In Matrigel differenzierte Organoide wurden mit Doxorubicin, den Senolytika Quercetin und Dasatinib und der Kombination von Doxorubicin mit den Senolytika behandelt. Quercetin und Dasatinib wirkten der Doxorubicin-induzierten β -Galactosidase-Aktivität und der Freisetzung von Zytokinen und Stressfaktoren entgegen, ohne die Integrität der Organoide zu beeinflussen. Die Einzelzellsequenzierung zeigte, dass die Organoide aus (Übergangs-) Basal-, Sekretions-, Becher-, deuterosomalen und Flimmerzellen bestanden. Es wurden seneszenzartige Zellen identifiziert, die durch eine starke Expression der Seneszenzmarker *CDKN1A* (p21), *CDKN2A* (p16), *TIMP2* und *GDF15* und eine erhöhte Aktivität der BATF- und PRDM1-Regulone gekennzeichnet waren. Die Quercetin-Behandlung führte zu einem verringerten Anteil seneszenter Zellen, wohingegen die Doxorubicin-Behandlung zu einem erhöhten Anteil an Becherzellen mit erhöhter Expression von Genen führte, die mit Entgiftung assoziiert sind (z. B. *CYP1A1*, *ALDH1A3*).

Matrigel wird aus Tumor-belasteten Mäusen gewonnen. Es ist daher wichtig, Matrigel-freie Organoid-Modelle zu entwickeln. Matrigel-freie Apikal-Out-Organoide wurden mit Interleukin-13 während der Differenzierungsphase stimuliert. Dies führte zum Verlust der Organoidmotilität. Histologie, Immunhistochemie, Einzelzellsequenzierung und semiquantitative RT-PCR zeigten, dass Interleukin-

13 einen sekretorischen Phänotyp induziert. Dies wurde mittels Proteomanalyse bestätigt. Einzelzellanalysen an Tag 2 und 4 zeigten auf, wie Basalzellen sich über deuteromale Zellen zu Zilien-Organoiden differenzieren und das Lungenpathogen non-typable *Haemophilus influenzae* die Expression von Entzündungsmediatoren in Übergangsbasalzellen induziert.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass 3D-Lungenorganoid-Plattformen erfolgreich für präklinische Wirkstofftests etabliert wurden. Im 24- bzw. 96-Well-Format können verschiedene Endpunkte innerhalb eines einzigen Versuchszyklus erfasst werden. Darüber hinaus ermöglichen vielfältige Methoden, wie biochemische Assays und Einzelzellsequenzierungen, weiterführende mechanistische Analysen. Der Einsatz Matrigel-freier Organoide stellt einen bedeutenden Fortschritt im Sinne der 3R-Prinzipien dar und bietet Potenzial für die Anwendung sowohl in der regulatorischen Bewertung als auch in der Grundlagenforschung.

Summary

3D lung organoids as a translational model for the development and disease modeling of chronic lung diseases

Chronic obstructive pulmonary disease and cystic fibrosis are characterized by excessive mucus production, impaired mucociliary clearance, and reduced regenerative capacity of the respiratory epithelium. These changes lead to a progressive loss of lung structure and function in affected patients. Since current therapeutic approaches are primarily symptom-oriented and only slow disease progression, there is a high demand for innovative treatment strategies. The respiratory epithelium represents a particularly attractive target in this regard.

In 2021, 1.86 million laboratory animals, predominantly rodents, were used in animal experiments in Germany. An additional 644,207 animals were killed for organ or tissue harvesting (Bf3R, 2023). A total of 16,824 animals were used for research into respiratory diseases. Animal testing is legally required for regulatory safety assessments. However, according to the Animal Welfare Act (§7 para. 1), it must be limited to what is necessary and ethically justifiable. Therefore, the development of human cell models is essential to reduce the number of animals used, increase the statistical power, and adhere to the 3R principles.

The aim of this work was to develop 3D lung organoid platforms for testing pharmaceutical agents with regard to cellular senescence, inflammatory processes, and toxicity. Modern methods such as single-cell sequencing were used for comprehensive characterization of the models.

Organoids differentiated in Matrigel were treated with Doxorubicin, the senolytics Quercetin and Dasatinib, and a combination of Doxorubicin and the senolytics. Quercetin and Dasatinib counteracted Doxorubicin-induced β -galactosidase activity and the release of cytokines and stress factors without affecting the integrity of the organoids. Single-cell sequencing revealed that the organoids consisted of (transitional) basal, secretory, goblet, deuterosomal, and ciliated cells. Senescence-like cells were identified, characterized by strong expression of the senescence markers *CDKN1A* (p21), *CDKN2A* (p16), *TIMP2*, and *GDF15*, and increased activity of the BATF and PRDM1 regulons. Quercetin treatment resulted in a decreased proportion of senescent cells, whereas Doxorubicin treatment led to an increased proportion of goblet cells with enhanced expression of genes associated with detoxification (e.g., *CYP1A1*, *ALDH1A3*).

Matrigel is derived from tumor-affected mice. Therefore, it is important to develop Matrigel-free organoid models. Matrigel-free apical-out-organoids were stimulated with interleukin-13 during the differentiation phase. This led to a loss of organoid motility. Histology, immunohistochemistry, single-cell sequencing, and semi-quantitative RT-PCR showed that interleukin-13 induces a secretory phenotype. This was confirmed by proteomic analysis. Single-cell analyses on days 2 and 4 revealed

how basal cells differentiate into ciliated organoids via deuterosomal cells and how the lung pathogen non-typable *Haemophilus influenzae* induces the expression of inflammatory mediators in transitional basal cells.

In summary, 3D lung organoid platforms have been successfully established for preclinical drug testing. In 24- or 96-well formats, various endpoints can be assessed within a single experimental cycle. Furthermore, diverse methods, such as biochemical assays and single-cell sequencing, enable further mechanistic analyses. The use of Matrigel-free organoids represents a significant advance in line with the 3R principles and offers potential for application in both regulatory assessment and basic research.

1. Einleitung

1.1 Der Respirationstrakt

Der Respirationstrakt lässt sich in zwei Hauptabschnitte gliedern: die oberen Atemwege, bestehend aus Nasenhöhle, Rachen und Kehlkopf, sowie die unteren Atemwege, zu denen die leitenden Luftwege (Lufttröhre, Bronchien, Bronchiolen) und das Lungenparenchym gehören [111]. Die Lunge ist ein komplexes und hochspezialisiertes Organ, das aus über 40 verschiedenen Zelltypen besteht, von denen jeder spezifische Aufgaben in verschiedenen Regionen der Lunge erfüllt [256]. Die Hauptaufgabe des Lungensystems ist der Austausch von O₂ und CO₂ [251]. Das Atemwegsepithel, das sich von der Nasenhöhle bis zu den terminalen Bronchiolen erstreckt, ist mit Flimmerzellen und sekretorischen Zellen ausgekleidet. Diese sind hauptsächlich dafür verantwortlich, Feinstaub und infektiöse Krankheitserreger aus der Atemluft durch die mukoziliäre Clearance zu entfernen. Die mukoziliäre Clearance stellt die erste Verteidigungslinie gegen Krankheitserreger dar, die sich an die Schleimschicht anheften. Dieser Mechanismus ist für die vollständige Funktion der Lunge unerlässlich [203]. Aufgrund der ständigen Exposition der Lunge gegenüber luftübertragenen Reizstoffen wie Schadstoffen, Bakterien und Viren haben sich diverse Mechanismen zur Reparatur entwickelt [114]. Die zelluläre Zusammensetzung variiert abhängig von ihrer anatomischen Position entlang der proximal-distalen Achse und nimmt in seiner Dicke zunehmend ab. Die Anzahl an Becherzellen nimmt beispielsweise entlang der proximal-distalen Achse zu [111].

Einzelzellanalysen haben ein neues Licht auf die das Atemwegsepithel aufbauenden Zelltypen und deren Differenzierung geworfen [73]. Es zeigte sich, dass das Atemwegsepithel aus Club- (oder auch Keulenzellen), Becher-, Zilien-, und Basalzellen sowie seltenen Zellen wie neuroendokrine Zellen und Ionozyten besteht [251]. Basalzellen sind die Vorläuferzellen, aus denen sich sekretorische (Keulenzellen, Becherzellen) und über deuterosomale Zellen Zilienzellen differenzieren [214], wobei Zilienzellen sich über Keulenzellen differenzieren, aber auch direkt aus Basalzellen hervorgehen können [206,234]. Basale Stammzellen kleiden die Basalmembran aus, Becherzellen produzieren Schleim, an den eingeatmete Partikel und Krankheitserreger haften, während Flimmerzellen bewegliche Kraft erzeugen, um diese aus der Lunge zu entfernen [114]. Clubzellen sind für die Entgiftung schädlicher Substanzen verantwortlich, die in die Lunge eingeatmet werden, einschließlich des Absorbierens von Giftstoffen aus der Luft und deren Abbau über ihre Cytochrom-P450-Enzyme [87]. Neben Basalzellen sind auch Clubzellen mitotisch aktiv, was vermutlich bei der epithelialen Regeneration und Reparatur von Bedeutung ist [206]. Clubzellen können als Vorläufer sowohl von Zilien- als auch von Becherzellen dienen [219]. Für die verschiedenen Zelltypen wurden allgemein anerkannte Zellmarker festgelegt, die spezifisch in den entsprechenden Zellen exprimiert werden (Abb. 1). So exprimieren Basalzellen unter anderem zum Beispiel Keratin 5 (*KRT5*) und den Transkriptionsfaktor Tumorprotein p63 (*TP63*), Clubzellen Secretoglobin Family 1A Member 1

(*SCGB1A1*) und Zilienzellen Forkhead Box J1 (*FOXJ1*) [267]. Jüngste Studien haben neue Unterklassen innerhalb der einzelnen Zelltypen und einen neuen seltenen Zelltyp beschrieben: die Ionozyten. Ionozyten machen nur 1–2 % der menschlichen Atemwegsepithelzellen aus, sind jedoch stärker mit CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator)-mRNS angereichert als jeder andere Atemwegszelltyp [199]. Die Alveolen sind von zwei Zelltypen ausgekleidet: spezialisierten alveolären Typ-II-Zellen (AEC2), die Tenside und andere Proteine absondern, und sehr dünne, empfindliche Typ-I-Zellen (AEC1), die eine große Oberfläche für den Gasaustausch mit den umgebenden Kapillaren bieten. Die Typ-II-Zelle ist die Vorläuferzelle für Typ-I-Zellen [243].

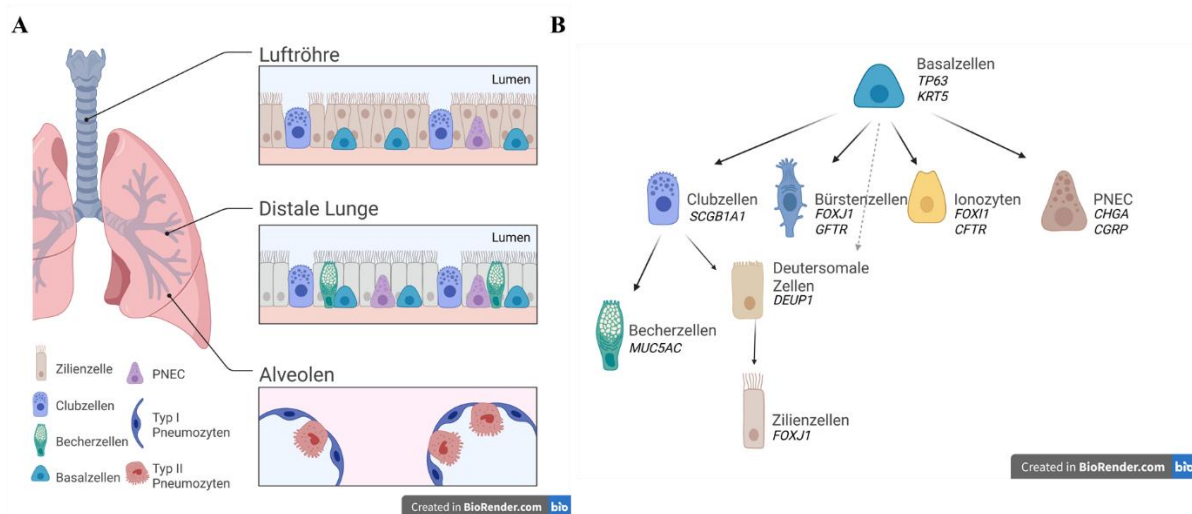


Abb. 1 Schematische Darstellung der verschiedenen Bereiche im Lungensystem. (A) Das obere Feld zeigt die Zellzusammensetzung der Luftröhre und der oberen Atemwege. Das mittlere Feld ist eine schematische Darstellung der oberen Bronchiolen. Das Untere zeigt den distalen Bereich der Lunge, die Alveolen. Hellgrau zeigt Luft, die durch das Lungensystem und dadurch apikale Seite der Zellen fließt. (B) Überblick über den Differenzierungsweg der Zelltypen im Atemwegsepithel: Das Atemwegsepithel besteht hauptsächlich aus Zilien-, Becher- und Basalzellen sowie selteneren Zelltypen wie Ionozyten, neuroendokrinen Zellen (PNEC), Bürsternzellen und deuterosomale Zellen [220,251]. Die Abbildung wurde mit BioRender erstellt.

1.2 Chronisch Obstruktive Lungenerkrankungen

1.2.1 Epidemiologie von COPD und Asthma bronchiale

Atemwegserkrankungen sind eine Hauptursache für Morbidität und Mortalität [97]. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) schätzt, dass chronisch obstruktive Lungenerkrankungen (COPD) jedes Jahr weltweit für den Tod von 3 Millionen Menschen verantwortlich sind [74]. COPD beeinträchtigt die Lebensqualität der Patienten aufgrund von Kurzatmigkeit und chronisch produktivem Husten, der sich im Laufe der Jahre zu einer chronischen Ateminsuffizienz entwickeln kann [249]. COPD wurde von der Initiative Global Obstructive Lung Disease (GOLD) der WHO beschrieben [197]. Dieser Überbegriff umfasst mehrere Erkrankungen, die durch Atemwegs- und Parenchymzündungen sowie Gewebeerstörung (d.h. Emphysem, chronische Bronchitis, chronische Bronchiolitis)

gekennzeichnet sind, die alle zu einer Einschränkung des Luftstroms (Obstruktion) führen [209]. Rauchen ist eine Hauptursache für COPD. Bei Dauerrauchern liegt das Risiko, an COPD zu erkranken, bei mindestens 25 % [162]. Sowohl beim Menschen [167] als auch bei Nagetieren [281] verursacht Tabakrauch innerhalb von Minuten oder Stunden nach der Exposition Entzündungsreaktionen der Atemwege und chronische Exposition führt zu einem Verlust an Lungenfunktion bis hin zum Lungenemphysem. COPD schreitet mit dem Altern voran, und chronisches Rauchen ist der hauptsächliche Grund für pathologische Veränderungen der Lunge, was gleichzeitig mit biologischer Alterung einhergeht [132]. Zigarettenrauch verursacht DNS-Schäden, was zu vorzeitiger und beschleunigter Lungenalterung und zu Lungenkrebs führen kann. COPD ist ein unabhängiger Risikofaktor für Lungenkrebs [241,250].

Nach WHO-Angaben ist Asthma bronchiale eine der häufigsten chronischen Krankheiten von der weltweit rund 260 Millionen Menschen (2019) betroffen sind [259]. Asthma bronchiale ist eine chronisch entzündliche Atemwegserkrankung, die durch eine bronchiale Hyperreagibilität und eine in der Regel reversible Atemwegsobstruktion gekennzeichnet ist. Die Krankheit kann sowohl in allergischer (externer) Form aufgrund von Umweltallergenen oder als intrinsische Form, durch Infekte, ausgelöst werden [7]. Infektionen, Exposition gegenüber Mikroben, Schadstoffen und Allergenen, aber auch Ernährung und psychosoziale Faktoren können zur Entstehung von Asthma beitragen [212]. Es treten Symptome wie Kurzatmigkeit, Keuchen und Husten auf, die die Lebensqualität der Patienten beeinträchtigen. Es kann ebenfalls zur vermehrten Schleimproduktion in den Atemwegen führen, was die Atembeschwerden verschlimmern kann [204].

1.2.2 Pathologische Veränderungen der Lunge bei COPD

Pathologische Veränderungen der COPD treten vor allem in den Atemwegen, im Lungenparenchym und im Lungengefäßsystem auf [241]. Zu den pathologischen Veränderungen in den zentralen Atemwegen gehören Epithelzellläsionen, Entzündungszellinfiltration, vermehrte Becherzellen und erhöhte Schleimdrüsensekretion. Zu den pathologischen Veränderungen in den kleinen peripheren Atemwegen gehören die Schrumpfung der kleinen peripheren Atemwege und der Verlust der kurzen und terminalen feinen Bronchiolen [143,284]. Neue Daten zeigen, dass die kleinsten leitenden Atemwege, die terminalen Bronchiolen, der frühe Ort der Gewebeerstörung bei COPD sind und bis zur Diagnose einer leichten COPD (Stadium 1) um bis zu 41 % reduziert sind [31]. Das Fortschreiten der COPD ist mit der Ansammlung von entzündlichen Schleimexsudaten im Lumen und der Infiltration der Wand durch angeborene und adaptive entzündliche Immunzellen verbunden, die lymphatische Follikel bilden können [115]. Basalzellen sind entscheidend für die Regeneration des menschlichen Lungenatemwegepithels und es wird angenommen, dass pathologische Veränderungen in Basalzellen zur Entstehung und Progression der COPD und anderen Lungenerkrankungen beitragen [270]. Dysfunktionale Basalzellen mit erschöpften Stammzellfunktionen tragen vermutlich zu der Umgestaltung der Atemwege bei chronischen Lungenerkrankungen entscheidend bei. So kann es zu

einer gesteigerten Basalzellproliferation einhergehend mit einem Verlust der Differenzierungskapazität, aber auch Becherzellhypoplasie kommen, was die zelluläre Zusammensetzung des Epithels drastisch verändert [65].

1.2.3 Seneszenz bei der COPD

Es gibt immer mehr Hinweise darauf, dass COPD eine Krankheit der beschleunigten Lungenalterung ist, bei der sich seneszente Zellen ansammeln. Diese Zellen verlieren ihre Fähigkeit zur Reparatur und sezernieren Entzündungsproteine und Stressfaktoren, die als Seneszenz-assoziiertes sekretorischer Phänotyp (SASP) bekannt sind. Diese Proteine ahmen das Profil von Entzündungsmediatoren nach, die bei COPD sezerniert werden [11]. Die Seneszenz ist in Lungengewebe und Strukturzellen von Patienten mit COPD erhöht [36,125,171,274]. Es wurde gezeigt, dass Seneszenzmarker, einschließlich p16 und p21, sowohl im Atemwegsepithel als auch im Endothel von Lungenproben von Patienten mit COPD hochreguliert sind, was darauf hindeutet, dass die zelluläre Seneszenz eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der COPD spielt [4,241]. Patienten mit COPD haben im Vergleich zu Kontrollpersonen kürzere Telomere [86]. Die Telomer-Dysfunktion ist stark an der Induktion und Aufrechterhaltung der Seneszenz beteiligt [24].

Eine Hauptursache für COPD ist chronisch oxidativer Stress als Folge von langfristigem Rauchen, der Verwendung von Biomassebrennstoffen und der Belastung durch Luftverschmutzung [257]. Seneszente Zellen setzen auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) frei und können daher einen wichtigen Beitrag zu oxidativem Stress bei COPD leisten. Oxidativer Stress ist ein wichtiger treibender Mechanismus der COPD durch die Induktion chronischer Entzündungen, die Induktion von zellulärer Seneszenz und beeinträchtigter Autophagie, eine reduzierte DNS-Reparatur, eine erhöhte Autoimmunität, eine erhöhte Schleimsekretion und eine beeinträchtigte entzündungshemmende Reaktion auf Kortikosteroide [14]. Oxidativer Stress stimuliert die Schleimsekretion und die Expression von Muzin *MUC5AC*, was zur Verengung der Atemwege bei COPD beiträgt [205]. Oxidativer Stress treibt daher die Pathologie der COPD voran und kann das Fortschreiten der Krankheit verstärken, Exazerbationen verstärken und Komorbiditäten durch systemischen oxidativen Stress erhöhen [81]. Oxidativer Stress aktiviert die DNS-Schadensantwort, insbesondere in den Telomeren, und kann bei COPD eine zelluläre Seneszenz induzieren. Die antioxidative Therapie ist daher ein logischer Ansatz zur Behandlung von COPD und könnte das Fortschreiten der Krankheit und Exazerbationen wirksam verhindern [14].

1.2.4 Rolle von IL-13 bei Asthma bronchiale

Der häufigste Asthma-Endotyp ist durch eine Entzündung der Atemwege gekennzeichnet, die durch Typ-2-Zytokine wie Interleukin-13 (IL-13) ausgelöst wird [127]. Typ-2-Asthma ist gekennzeichnet durch Einschränkungen des Luftstroms und erhöhte Spiegel von Blut- und Sputum-Eosinophilen, fraktioniertem ausgeatmetem Stickstoffmonoxid, IgE und Periostin [228]. IL-13 ist ein Schlüsselzytokin in der Pathogenese von Asthma [85]. Es ist bekannt, dass die nativen menschlichen Atemwege nach

Stimulation mit Zytokinen wie IL-13 einer Becherzellhyperplasie und Schleimhypersekretion unterliegen [269].

Mehrere Zelltypen wurden als Quelle für IL-13 beschrieben. Insbesondere T-Zellen, Mastzellen und Eosinophile sind die vorherrschende Quelle von IL-13 bei Asthma, wobei Makrophagen bei COPD einen Beitrag leisten [37]. Eine akute IL-13-Stimulation reicht aus, um die zelluläre Zusammensetzung des reifen Atemwegsepithels zu verändern. Es wird vermutet, dass Flimmerzellen durch IL-13 umprogrammiert werden, um die Ziliogenese und die angeborenen Immunitätsfunktionen herunterzuregulieren, während sie eine mit Entzündung verbundene sekretorische Funktion erhalten. Durch die chronische Stimulation mit IL-13 wird der Schleim der Atemwege modifiziert, was die Frequenz des Zilienschlags verlangsamt und den mukoziliären Transport stoppt. IL-13-aktivierte Expressions- und Sekretionsreaktionen des Atemwegsepithels spiegeln sich in Veränderungen des Atemwegsepithels von Typ-2-Asthma wider. Zum Beispiel zeigte sich eine Herunterregulierung der *SCGB1A1*-Expression und eine Hochregulierung der *MUC5AC*-Expression sowohl in sekretorischen als auch in Zilienzellen bei chronischer Stimulation stärker als bei akuter Stimulation. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass IL-13 nicht nur die Abwehrexpression reduziert, sondern auch die Häufigkeit von abwehrfokussierten sekretorischen Zellen im Epithel der Atemwege, wenn es chronisch angewendet wird [127].

Es wurde gezeigt, dass IL-13 eine zentrale Rolle in der Pathogenese allergischer Atemwegserkrankungen spielt. Die Neutralisierung von IL-13 mittels Anti-IL-13-Antikörper hebt die Hyperreagibilität der Atemwege, die Entzündung der Atemwege sowie die verminderte Schleimhypersekretion in Mäusen mit allergischer Atemwegserkrankung auf. Die Becherzellhyperplasie, Schleimhypersekretion, erhöhte Anzahl an Eosinophilen und erhöhte Entzündungswerte im Lungengewebe wurden durch eine Anti-IL-13-Antikörper-Behandlung signifikant reduziert [265].

1.2.5 Das Altern der Lungenzellen

Das Altern ist ein natürlicher Prozess, der sich aus physiologischen und molekularen Veränderungen zusammensetzt, die zu einer fortschreitenden Beeinträchtigung der Organfunktion führen [55,171,182]. Altern ist der natürliche Rückgang der Zellfunktion in Geweben und Organen, der durch eine verminderte Fähigkeit, auf Stresssignale zu reagieren, sowie eine eingeschränkte Reparatur- und Regenerationsfähigkeit des Gewebes gekennzeichnet ist. Dies kann das Risiko für die Entwicklung von Krebs sowie neurologischen, kardiovaskulären Erkrankungen sowie Lungenerkrankungen erhöhen [163]. Das Alter ist ein wesentlicher Risikofaktor für fast alle Lungenerkrankungen [33]. In der Lunge verringern Alterungsprozesse vermutlich die Regenerationsfähigkeit der Lunge. Altersassoziierte Kennzeichen sind Telomerverkürzung, mitochondriale Dysfunktion, zelluläre Seneszenz und Stammzellerschöpfung [55,171]. Unter physiologischen Bedingungen werden akkumulierende alternde

Zellen entfernt, insbesondere durch natürliche Killerzellen, Makrophagen und CD4⁺-T-Zellen, um die Geweberegeneration zu fördern [129,145]. Es wird angenommen, dass bei chronischer Schädigung oder Alterung senescente Zellen jedoch im Gewebe verbleiben und zu einer gestörten Regeneration beitragen [55,156,223]. Altersbedingte Veränderungen werden auch im bronchiolären Epithel beobachtet, was zu einer beeinträchtigten Clearance-Kapazität in den proximalen Atemwegen führt, die durch erhöhte Apoptose, abnorme Zilien und veränderten Schleim gekennzeichnet ist [5,55]. Um den biologischen Alterungsprozess systematisch zu analysieren, charakterisierten Lopez-Otin et al. [163] neun Hauptmerkmale des Alterns, die weithin akzeptiert werden, nämlich (1) genomische Instabilität, (2) epigenetische Veränderungen, (3) Verlust der intrazellulären Proteostase, (4) deregulierte Nährstoffwahrnehmung, (5) mitochondriale Dysfunktion, (6) zelluläre Seneszenz, (7) Stammzellerschöpfung, (8) veränderte interzelluläre Kommunikation und (9) Telomerverkürzung.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Erschöpfung der pulmonalen Stammzellen und die Seneszenz der Epithelzellen mit dem fortschreitenden Alter assoziiert sind [54]. Es wurde festgestellt, dass die mukoziliäre Clearance und die Häufigkeit des Zilienschlags mit zunehmendem Alter abnehmen und dadurch die Prädisposition für Lungenentzündung bei älteren Menschen erhöhen [8]. Endothelzellen, Fibroblasten und Myofibroblasten nehmen mit zunehmendem Alter zu, was darauf hindeutet, dass sich die zelluläre Zusammensetzung der Lunge mit zunehmendem Alter verändert [71]. Die gealterte Lunge kann auch anfälliger für Schäden durch Umweltbelastungen wie Zigarettenrauch sein, was auf einen erhöhten oxidativen Stress in der alternden Lunge infolge eines reduzierten Antioxidantienpegel zurückzuführen sein kann [107].

1.3 Seneszenz

Die zelluläre Seneszenz, eine bahnbrechende Entdeckung von Hayflick und Moorhead, ist ein Prozess, der das Schicksal der Zellen global reguliert und als Kennzeichen des Alterns angesehen werden kann [103,163]. Hayflick zeigte, dass normale humane Fibroblastenzellstämme nach einer festen Anzahl von Populationsverdopplungen (40-60), der Hayflick-Grenze, *in vitro* aufhören, sich zu teilen [103]. Der klassische Auslöser, der von Hayflick und Moorehead beschrieben wird, ist eine fortschreitende Telomerverkürzung, die zu DNS-Schäden und Aktivierung von Tumorsuppressoren durch Phosphorylierung von p53 und erhöhter Produktion von p21 führt [103,108]. Die Seneszenz wird durch replikative Telomerverkürzung, aber auch durch Stress wie DNS-Schäden, Hypoxie, Nährstoffmangel, mitochondriale Beeinträchtigung und Onkogenaktivierung ausgelöst [42,178]. Seneszenz wird durch wiederholte oder chronische Stressexposition im Laufe der Zeit induziert [90,190]. Replikative Seneszenz ist ein zellulärer Prozess, bei dem sich Zellen nach einer bestimmten Anzahl von Teilungen dauerhaft nicht mehr weiter teilen können. Replikative Seneszenz tritt hauptsächlich aufgrund der fortschreitenden Verkürzung der Telomere auf. Wenn die Telomere eine kritische Länge erreichen, erkennen zelluläre Kontrollmechanismen dies als DNS-Schaden und leiten eine Seneszenzreaktion ein.

Merkmale der replikativen Seneszenz sind beispielsweise dauerhafter Zellzyklusarrest und Aktivierung von Tumorsuppressorwegen (v. a. p53/p21 und p16) [218].

Seneszente Zellen (Sncs) sind metabolisch aktiv, produzieren Seneszenz-assoziierte β -Galactosidase (SA- β -Gal) und erwerben einen seneszenten Phänotyp mit Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, Proteasen und Wachstumsfaktoren [59,95]. Sncs sezernieren mehrere Mediatoren im SASP, von denen gezeigt wurde, dass sie ihre umgebende Mikroumgebung direkt beeinflussen [223]. Faktoren des SASP können die umgebenden Zellen beeinflussen, indem sie verschiedene Zelloberflächenrezeptoren und entsprechende Signaltransduktionswege aktivieren, die zu mehreren Pathologien, einschließlich Krebs, führen können [60]. Es wird angenommen, dass das SASP einen großen Einfluss auf verschiedene biologische Prozesse haben kann, einschließlich Zellproliferation, Angiogenese und Entzündung [150], Gewebereparatur [145] und Wundheilung [72]. Sncs zeichnen sich durch eine erhöhte Resistenz gegenüber Apoptose aus und können dadurch zellinternen Eliminierungsmechanismen entgehen [178]. Ein charakteristisches Merkmal seneszenten Zellen ist eine erhöhte lysosomale Aktivität [149,153]. Sncs haben verkürzte Telomere [23] und können morphologische und strukturelle Veränderungen entwickeln, einschließlich einer vergrößerten, abgeflachten, mehrkernigen Morphologie mit vergrößerten Vakuolen, veränderter Zusammensetzung der Plasmamembran und einer bemerkenswerten Kernvergrößerung [169]. Eine erhöhte Zellgröße beeinträchtigt das Fortschreiten des Zellzyklus [184]. Im Vergleich zu ihren nicht-seneszenten Gegenstücken können alternde Zellen mehrere Veränderungen des Stoffwechselwegs aufweisen, einschließlich erhöhter Glykolyse und mTOR (mammalian target of rapamycin)-Aktivität [271]. Weitere Unterscheidungsmerkmale seneszenten Zellen sind eine hohe p16^{INK4a}- und H3K9me3-Expression, eine ausgeprägte DDR (DNS-Schadensantwort) -Signatur, das Vorhandensein von PML-Körpern, eine erhöhte NF- κ B- und C/EBP β -Aktivität sowie eine gesteigerte Expression des Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Rezeptors [4,16,33,57,69,73,137,210].

Seneszente Zellen überleben, obwohl sie aktive DNS-Schadensreaktionen, einen erhöhten Stoffwechselfluss und erhöhte lokale Spiegel von inflammatorischen SASP-Zytokinen und anderen Faktoren aufweisen, die Apoptose induzieren können [263]. In den späten Lebensstadien reichern sich seneszente Zellen vermehrt im menschlichen Gewebe an und tragen vermutlich zur Etablierung einer chronischen Entzündung bei, die durch die kontinuierliche Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen entsteht [41,75]. Seneszente Zellen, einschließlich alveolärer Epithel- und Endothelzellen, reichern sich in der Lunge von Patienten mit COPD an [4,248]. Daher könnte die Eliminierung seneszenten Zellen ein vielversprechender Ansatz für die Behandlung und Prävention vieler altersbedingter Krankheiten sein, der zu gesunder Langlebigkeit führt [189,244]. Da Sncs sehr heterogen sind, werden mehrere Seneszenzmarker benötigt, um zu bestätigen, ob eine Zelle seneszent ist, insbesondere *in vivo*. Zu diesen Markern gehören die Quantifizierung der SA- β -Gal, erhöhte Expression von p16^{INK4A}, p21^{CIP1} und SASP-Faktoren, eine Zunahme der γ H2AX-Herde, der Telomer-

assoziierten Herde und der Seneszenz-assoziierten Heterochromatin-Herde, Verlust von HMGB1 (High-Mobility Group Box 1) und Lamin B und eine Veränderung der Zellmorphologie. Allerdings verfügen nicht alle Sncs über all diese Marker. SA- β -Gal ist ein lysosomales Enzym, das die Hydrolyse von β -Galactosiden zu Monosacchariden katalysiert, die bei einem hohen pH-Wert nur in Sncs nachgewiesen werden [213].

Während angenommen wird, dass die schädlichen Auswirkungen der Seneszenz auf die Erschöpfung der Stamm- oder Vorläuferzellen oder auf die SASP-Komponenten zurückzuführen sind, wurde auch beschrieben, dass die Seneszenz bei der Tumorsuppression und Wundheilung von Vorteil ist [72,145,178]. Es ist bekannt, dass SASP bei der Wundheilung hilft, indem es Entzündungszellen rekrutiert [43]. Seneszenz spielt eine wichtige physiologische Rolle bei der normalen Entwicklung [177], Aufrechterhaltung der Gewebemöostase, Gewebeumbau und -reparatur [283], Wundheilung [72], und begrenzt die Tumorprogression, indem sichergestellt wird, dass potenziell dysfunktionale, beschädigte oder transformierte Zellen ihre Genome nicht auf die nächste Generation übertragen [53,57,262]. Die zelluläre Seneszenz kann die Vermehrung geschädigter Zellen blockieren, um die Gewebemöostase aufrechtzuerhalten [72].

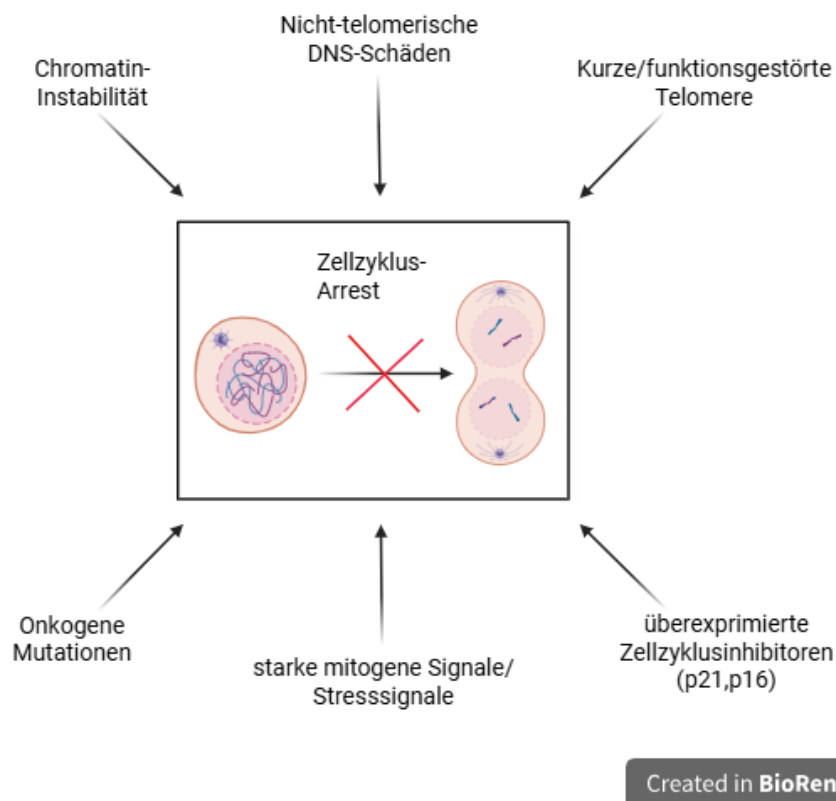


Abb. 2 Zelluläre Seneszenz kann durch mehrere Ursachen entstehen. Mehrere Arten von Reizen können zelluläre Seneszenz und einen SASP hervorrufen. Wenn der irreversible Zellzyklusstillstand durch schwere DNS-Schäden (d. h. Dysfunktionale Telomere oder onkogener Stress) ausgelöst wird, tritt der SASP in seneszenten Zellen auf. Wenn jedoch ein seneszenten Phänotyp in Zellen ausgelöst wird, die Zellzyklusinhibitoren wie p16 oder p21 überexprimieren, durchlaufen Zellen einen Wachstumsstopp mit vielen Eigenschaften seneszenten Zellen, aber keinen SASP [60]. Die Abbildung wurde mit BioRender erstellt.

1.3.1 Seneszenz-assoziiierter sekretorischer Phänotyp

Die Sekrete, die zusammen als SASP bekannt sind, sind ein dynamisches, zelltypabhängiges Phänomen, bei dem seneszenten Zellen hohe Mengen an Zytokinen, Chemokinen, Proteasen, Wachstumsfaktoren und extrazellulären Vesikeln sezernieren, die typischerweise entzündungsfördernd sind. In Zellkulturexperimenten kann diese Reaktion durch persistierende zelluläre Stressoren induziert werden, die zum Beispiel eine DNS-Schadensantwort auslösen [59]. Im Allgemeinen gilt der SASP als stark zelltypabhängig und vielfältig in sezernierten Faktoren [215]. SASP-Faktoren können zu einem "Zytokinsturm", einer gewebezerstörenden Immunezellinfiltration, Fibrose und Mikrothrombose beitragen [226]. Die Zusammensetzung von SASP wird stark durch den eigentümlichen Stoffwechsel der alternden Zelle beeinflusst [271]. Die Zusammensetzung und Stärke des SASP variiert erheblich, abhängig vom Induktor der Seneszenz, der Dauer der Seneszenz, der Umgebung und dem Zelltyp [59,166]. Einerseits tragen SASP-Faktoren zur Wundheilung [67,72,283] und zur normalen Entwicklung [177,236] bei und können tumorsuppressiv durch die Rekrutierung verschiedener

Immunzellen zur Beseitigung prämaligener Zellen wirken [83,120,129]. Auf der anderen Seite können SASP-Faktoren pro-tumorigen sein, indem sie Proliferation, Invasion, Metastasierung und Chemoresistenz aufrechterhalten [44,58].

Das Ausschalten verschiedener SASP-Gene mittels genetischer Inaktivierung mit RNS-Interferenz (shRNA) verhindert die Seneszenz und unterstreicht damit die Schlüsselrolle, die autokrine Signalmechanismen bei der Regulierung von SASP und des Seneszenzzustands spielen [1,146,260]. Der akute Stress-assoziierte Phänotyp (ASAP), gekennzeichnet durch die Expression von Interleukin-6 (IL-6) und Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 (TIMP-1), stellt eine frühe Phase der zellulären Reaktion dar, die unmittelbar nach der Exposition gegenüber zytotoxischen Substanzen beobachtet wird. Im Gegensatz dazu entwickelt sich SASP in den meisten Zellen allmählich über einen Zeitraum von 5-10 Tagen nach dem Nachweis von Seneszenzmarkern [93,240]. In jungen gesunden Geweben ist die SASP typischerweise vorübergehend und trägt tendenziell zur Erhaltung oder Wiederherstellung der Gewebemöostase bei [185]. Senescente Zellen nehmen jedoch mit zunehmendem Alter zu, und es ist bekannt, dass ein chronisches SASP ein wichtiger Treiber für viele pathologische Kennzeichen des Alterns ist, einschließlich chronischer Entzündungen, Tumorgenese und beeinträchtigter Stammzellerneuerung [185,246].

Der SASP, wie er identifiziert wurde, umfasst etwa 50 Zytokine, CXCLs (C-X-C motif chemokine ligand), Wachstumsfaktoren und Proteasen, die durch verschiedene Methoden (z. B. Antikörper-Arrays) und/oder Transkriptionsanalysen nachgewiesen wurden [1,59,61,109,146]. Die IL-6-Proteinsekretion ist der Hauptbestandteil des SASP [156]. Die meisten seneszenten Zellen überexprimieren IL-8 (Interleukin-8, CXCL-8), zusammen mit CXCL-1 und -2 [28,45,222]. Neben der Sekretion löslicher Signalzytokine und Wachstumsfaktoren sezernieren alternde Zellen auch Proteasen wie Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) [161]. Keine entzündungshemmenden Faktoren (z. B. Interferon- α , Interferon- γ , Interleukin-3 und Interleukin-5) werden signifikant von seneszenten Fibroblasten sezerniert, und einige dieser Faktoren werden sogar bei Seneszenz herunterreguliert (z. B. Interleukin-2 und Interleukin-12) [183,225]. Wachstums-/Differenzierungsfaktor 15 (GDF-15) ist ein Zytokin der Stressreaktion, das zur Superfamilie der transformierenden Wachstumsfaktoren (TGF)- β gehört [30,118,152]. Die Expression von GDF-15 steigt unter zellulärem Stress und pathologischen Bedingungen. Es wurde auch berichtet, dass GDF-15 ein Faktor des SASP ist, was auf eine Rolle als autonomer Regulator der zellulären Seneszenz hinweist. Immer mehr Hinweise deuten darauf hin, dass GDF-15, Seneszenz und die Pathogenese chronischer Lungenerkrankungen miteinander verbunden sein könnten [261]. Die Exposition gegenüber Zigarettenrauch erhöht die GDF-15-Expression in Atemwegsepithelzellen und induziert zelluläre Seneszenz durch Aktivierung des ALK1/Smad1-Signalwegs, mit signifikanten Anstiegen des frühen Seneszenzmarkers p21, des späten Seneszenzmarkers p16 und des HMGB1-Spiegels [277].

1.3.2 Senolytische Wirkstoffe

Senotherapeutika sind eine neue Klasse von Medikamenten, die selektiv Sncs abtöten (Senolytika) oder ihre krankheitsverursachenden Phänotypen unterdrücken (Senomorphika/Senostatika) [213]. Unter Senotherapie versteht man pharmazeutische Interventionen, die darauf abzielen, die schädliche Wirkung seneszenter Zellen zu stören, indem sie den Zelltod induzieren [140,191]. Therapeutika, die spezifisch auf die Morphologie und Funktionen seneszenter Zellen abzielen, wie SASP, werden als Senomorphika bezeichnet [134]. Die Entfernung von seneszenten Zellen in Mausmodellen durch genetische Manipulation oder die Behandlung mit Wirkstoffen, die selektiv alternde Zellen abtöten, erhöht die Lebensdauer und Gesundheitsspanne [9,10,278].

Metformin (Met) ist ein Antidiabetikum mit pleiotroper Wirkung, das auch auf seneszenten Zellen wirkt [2]. Met reguliert SASP herunter und senkt die seneszente Zelllast. Es führt zur Abschwächung von Kennzeichen des Alterns [147]. Bei Mäusen und *Caenorhabditis elegans* verlängert Met die Lebensdauer und verbessert mehrere Indikatoren der Gesundheitsspanne [6,170]. Studien mit humanen Zellen haben gezeigt, dass Met genom-schützende Wirkungen durch Reduktion von oxidativem Stress, DNS-Schäden und DNS-Schadensreaktionen, Regulation der Ataxie-Teleangiektasien-mutierten Proteinkinase und epigenetische Effekte zeigt [180]. Es reduziert die Zellviabilität und fördert die Apoptose sowie die Hemmung der Zellproliferation dosisabhängig [279]. Dasatinib (Das), ein Pan-Tyrosinkinase-Inhibitor, der als Krebsmedikament verwendet wird, und Quercetin (Quer), ein natürliches Flavonoid, wurden als senolytische Mittel in Forschungsmodellen und klinischen Studien am Menschen eingesetzt, die eine reduzierte Seneszenzsignatur berichteten [112,128,285]. Quer ist ein natürliches pflanzliches Flavonoid in vielen Obst-, Gemüse- und Getreidesorten, das zahlreiche nützliche biologische Aktivitäten aufweist, darunter entzündungshemmende, antioxidative, immunregulierende und andere Wirkungen [89]. Quer zielt auf eine Vielzahl von Signalwegen ab, einschließlich BCL-2/XL, PI3K/AKT und p53/p21/PAI1, während Das Tyrosinkinasen hemmt [136]. Das und Quer sind beide für die Anwendung beim Menschen zugelassen und scheinen relativ sicher zu sein [285]. Die Behandlung von primären Maus-AT-II-Zellen mit senolytischen Verbindungen (Kombination aus Das und Quer, DQ) reduzierte die Gesamtzahl der Zellen, der Prozentsatz der seneszenten Zellen und das p16-Expressionsniveau sank signifikant [156]. Die Kombination von DQ zielt selektiv auf ein breiteres Spektrum seneszenter Zelltypen ab im Vergleich zum Wirkstoff allein [285]. In humanen Zellkulturexperimenten reicht eine kurzfristige Verabreichung der Kombination aus, um seneszente Zellen zu eliminieren und einen Nutzen zu erzielen [191]. Insbesondere führte die Behandlung von primären Maus-AT-II-Zellen mit DQ zu einer Reduktion von SASP-Faktoren wie MMP12, SERPINE1 und Secreted Phosphoprotein 1 (SPP1) [156]. p16-, p21- und p53-Expressionen sind nach der Behandlung von Mäusen, welche an Silikose erkrankt sind, mit Quercetin verringert [92]. DQ verlängert die Gesundheits- und Lebensspanne bei älteren Mäusen. DQ reduzierte auch p16-positive Zellen in der Leber alter Mäuse [285]. In humanen Zellkulturexperimenten eliminierte eine Einzeldosis

von Das + Quer über 33 % der seneszenten Zellen innerhalb von 3 Tagen [224]. Der senolytische Cocktail aus Das und Quer reduzierte senolytische Zellen und die SASP-Antwort bei alternden Mäusen, und die intermittierende Therapie verlängerte die Lebensspanne um 36 % und reduzierte das Mortalitätsrisiko um 65 % [124,278]. Eine klinische Studien mit Fibrose-Patienten zeigte, dass DQ p21- sowie p16-positive Zellen sowohl im weißen Fettgewebe als auch in der Epidermis signifikant reduzierte und somit körperliche Dysfunktionen der Patienten lindert [112].

1.3.3 Signalwege der Seneszenz – p16/p21/p53

Der unterbrochene Zellzyklus ist eines der wichtigsten Kennzeichen zellulärer Seneszenz und wird durch die Proteinmarker p16, p21 und p53 charakterisiert [22]. Der Tumorsuppressor p53 begrenzt die Tumorgenese, indem er Apoptose, Zellzyklusarrest und Seneszenz induziert. Studien mit Clubzell-p53-Knockout-Mäusen zeigen, dass p53 an der Induktion von Clubzell-Seneszenz beteiligt ist und die Epithelzell-Seneszenz von chronischer Atemwegsentzündung und Lungenzerstörung korreliert [221]. Der p53-Signalweg spielt auch eine Rolle bei der Unterdrückung des SASP und hält zusammen mit anderen Tumorsuppressoren die Entzündung in verschiedenen Modellen aufrecht [59,142,165]. Aktiviertes p53 löst Zellschicksalsentscheidungen wie Seneszenz oder Apoptose aus. Je nach Zellkontext kann p53 Krebs durch vorübergehenden Zellzyklus-Arrest und Aktivierung der DNS-Reparaturmaschinerie unterdrücken [60]. Eine subchronische Zigarettenrauch-Exposition trägt zur Erhöhung der p53-Proteinexpression und SA- β -Gal-Aktivität in der Lunge von Mäusen bei [132]. Die Inaktivierung von p53 mittels lentiviralen Vektoren ermöglicht es blockierten Zellen mit geringer Expression von p16 wieder in den Zellzyklus einzutreten, was darauf hindeutet, dass die zelluläre Seneszenz zumindest in einigen Kontexten reversibel ist und von p53 aufrechterhalten wird [19,154,173].

Zu den wichtigen Komponenten dieser Signalwege gehören Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitoren (CDKIs) [232]. Eine solche CDKI, p21^{CIP1/WAF1} (*CDKN1A*), ist ein direktes Ziel der p53-Transaktivierung, im Allgemeinen als Reaktion auf genomische Schäden, und ist entscheidend für die Etablierung und Aufrechterhaltung des p53-vermittelten Seneszenz-Wachstumsstopps [38,39]. Lungeneithelzellen weisen eine erhöhte p16 (*CDKN2A*)- und p21-Expression sowie eine SA- β -Gal-Aktivität in experimentellem und menschlichem Lungenfibrosegewebe und Primärzellen auf [156]. Der p16^{INK4a}/RB-Signalweg wird normalerweise in der replikativen Seneszenz und ROS-induzierten Seneszenz aktiviert, jedoch nicht während der DDR-induzierten Seneszenz, und es wird angenommen, dass er eine größere Rolle bei der Aufrechterhaltung des seneszenten Zustands spielt [19,80]. Es wird erst spät nach der Seneszenzinduktion exprimiert. Die Expression von p21^{WAF1/Cip1}, ein CDK4/6- und CDK2-Inhibitor, findet früher statt. p21^{WAF1/Cip1} ist an der Signalübertragung von DNS-Schäden beteiligt [272]. Während p21 direkter mit dem SASP verwandt zu sein scheint, ist p16 mit der DNS-Schadensantwort und der Onkogen-Induktion verbunden [141] und scheint bei der Entwicklung der SASP keine große Rolle zu spielen [60]. In Studien mit Mäusen wurde gezeigt, dass die Entfernung

p16-positiver Zellen das Fortschreiten neoplastischer Erkrankungen verzögert und somit die Gesundheitsspanne verlängert wird [10,168].

p21 stoppt die Zellzyklusprogression nach transkriptioneller Aktivierung durch p53, eine DNS-Schadensantwort, die durch viele Seneszenz-induzierende Wirkstoffe ausgelöst wird [68,84]. Es ist indirekt an der DNS-Reparatur beteiligt, indem es das Fortschreiten des Zellzyklus stoppt, um Zeit für die DNS-Reparatur zu haben, und direkt, indem es die Wechselwirkungen zwischen Komponenten reguliert, die an Reparaturwegen beteiligt sind [46]. Doxorubicin (Dox), ein Anthracyclin, das zur Therapie von diversen malignen Tumoren eingesetzt wird, ist für Zellen in S/G2-Phasen am schädlichsten, und p21 wird transkriptionell als Reaktion auf DNS-Schäden aktiviert [104,280]. Dox ist ein Molekül, das mit der DNS interagieren kann. Es erhöht die Mutationsrate und die Dysfunktion der Mitochondrien. Es induziert DNS-Schäden und kann auch die Epigenetik und die Telomerlänge beeinflussen. DNS-Schäden aktivieren anschließend Seneszenz-bezogene Signalwege. In den Mitochondrien kann Dox eine erhöhte ROS-Produktion verursachen [158].

1.4 Organoide

Seit dem frühen 20. Jahrhundert ist es bekannt, dass das Entfernen von Zellen aus ihrer nativen Umgebung zum Verlust der Gewebe-spezifischen Funktion der Zellen führt [251]. Daher scheint die Nachahmung der 3D-Architektur für repräsentative *in vitro*-Modellsysteme unerlässlich [25,123]. Der Begriff Organoid bezieht sich auf eine 3D-Struktur aus pluripotenten Stammzellen (PSCs) oder adulten Gewebestammzellen (ASCs) und besteht aus organspezifischen Zelltypen, die sich durch Zellsortierung und räumlich eingeschränkte Abstammungsanpassung selbst organisieren. In Matrigel kultivierte Bronchosphären, die sich aus Basalzellen differenzieren, bestehen zum Beispiel aus einer äußeren Schicht von Basalzellen, während die innere Schicht Anzeichen einer mukoziliären Differenzierung mit Zilien- und sekretorischen Zellen aufweist [251]. Organoide rekapitulieren Zell-Zell- und Zell-Nischen-Wechselwirkungen bei der Gewebeentwicklung, Homöostase, Regeneration und Krankheit und stellen ein *in vitro*-Modell für das Wirkstoff-Screening bereit [164]. Je nach Ort der Stammzellisolierung können menschliche Basalzellen Organoide bilden, die aus Basal-, Keulen-, Flimmer- und Becherzellen bestehen [40,70,113]. Organoide werden häufig verwendet, um die Pathogenese verschiedener menschlicher Krankheiten, die Organogenese und andere grundlegende Fragen zu untersuchen [82]. Organoide Kulturen aus humanen PSCs oder adulten Stammzellen können bestimmte Aspekte menschlicher Lungenerkrankungen modellieren, darunter COPD, Asthma, Mukoviszidose, Lungenfibrose oder Virusinfektionen [52,70,139,238]. Zudem können auch zugrundeliegende Erkrankungen der Spender die Ausprägung der Organoide beeinflussen. Im Gegensatz zu gesunden Lungenorganoiden zeigten COPD-Organoide zum Beispiel deutlich mehr Becherzellen und eine höhere *MUC5AC*-Expression [48].

Organoide ähneln dem nativen Organ in Bezug auf Gen- und Proteinexpression, Stoffwechselfunktion und mikroskalige Gewebearchitektur besser als konventionelle 2D-Zellkulturen, was ein vielversprechendes Instrument darstellt, um die personalisierte Medizin und das Arzneimittelscreening voranzutreiben und den Bedarf an Tierversuchen zu begrenzen. Ein Vorteil der Organoid-Technologie ist die Fähigkeit, Organoid aus normalem/gesundem Gewebe zu erzeugen, um beispielsweise Zytotoxizität in normalen Zellen zu untersuchen [210]. Die Differenzierung von Bronchosphären geht mit der Bildung von Lumen und dem Auftreten von Zilien innerhalb von 30 Tagen nach der Aussaat einher [235].

Obwohl Organoid als *in vitro*-System eine auffallende Ähnlichkeit mit endogenem menschlichem Gewebe aufweisen und beispielsweise die Mikroarchitektur von Geweben rekapitulieren, bilden sie nicht die gesamte Struktur eines menschlichen Organs ab [135,227]. Da es sich bei Organoiden um geschlossene Strukturen handelt, denen Gewebe-Gewebe-Schnittstellen, Gefäßfluss, zirkulierende Immunzellen und physiologisch relevante mechanische Signale fehlen, können sie die Reaktionen auf Organebene nicht vollständig rekapitulieren oder zur Untersuchung von Arzneimittelwirkungen unter pharmakologisch relevanten Bedingungen verwendet werden. Da in Matrigel oder anderen Matrices differenzierte Organoid von einer dicken, dichten extrazellulären Matrix (EZM) umgeben sind, ist es auch schwierig, den Transport und die Absorption von Nährstoffen, Chemikalien oder Medikamenten durch das Epithelgewebe zu messen, experimentell den Inhalt des inneren Lumens zu beproben und Kokulturen mit lebenden Mikrobiomen aufrechtzuerhalten [122].

Der anscheinend geringe Zellumsatz in Atemwegsorganoiden ahmt die Homöostase der Lunge und der Atemwege bei Erwachsenen nach, deutet aber auch darauf hin, dass proliferative Vorläuferpopulationen oder stimulierende Kulturbedingungen erforderlich sein könnten, um das Wachstum von Organoiden zu fördern [242]. Die Forschung hat festgestellt, dass sich zunächst entweder Vorläuferzellen vermehren oder Zellen aggregieren, um kleine 3D-Cluster zufällig orientierter Zellen zu bilden, die aus zwei Zellpopulationen bestehen: äußeren Zellen, die Kontakt mit der EZM haben, und innere Zellen, die nur von anderen Zellen umgeben sind. Dann folgt auf die Differenzierung der äußeren Zellen der apoptotische Tod der inneren Zellen, was zur Bildung des hohlen Lumens führt [76].

Die am weitesten verbreitete Basalmembran, Matrigel, wird vom Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)-Sarkom gereinigt, das eine hohe Menge an EZM-Komponenten enthält, hauptsächlich Laminin, Kollagen IV und Entactin sowie die Wachstumsfaktoren insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1 (IGF-1), Thrombozyten-abgeleiteter Wachstumsfaktor (PDGF), Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) und TGF- β [144]. Es ist die am weitesten verbreitete Matrix für die 3D-Organoid-Ableitung [188]. Jedoch gibt es ethische Bedenken, da die Herstellung von Matrigel das Wachstum von Tumoren bei Mäusen beinhaltet [144]. Der Hauptvorteil dieser natürlichen Matrices ist das Vorhandensein einer komplexen Mischung aus EZM-Komponenten und Wachstumsfaktoren, die das Zellwachstum und die Differenzierung sehr

effizient macht [217]. Es ist bekannt, dass die EZM *in vivo* und *in vitro* eine wichtige Rolle bei zahlreichen Entscheidungen spielt, die das Zellschicksal und -verhalten steuern [137,138].

Organoide ermöglichen die Untersuchung von Entwicklung, Physiologie und Krankheit und überbrücken damit die Lücke zwischen Tiermodellen und klinischen Studien [251]. Ein wesentliches Merkmal von Organoiden ist ihre größere experimentelle Zugänglichkeit als Säugetiermodelle, was zu einem tieferen Verständnis der Organogenese und der Organbiologie adulter Tiere beigetragen hat [217]. Der Vergleich von Organoiden und sich *in vivo* entwickelndem humanem Lungenepithel mittels Einzelzellsequenzierung zeigt einen hohen Grad an transkriptomischer Ähnlichkeit [174]. Humane Organoid-Kulturen haben gegenüber Tiermodellen eine Reihe potenzieller Vorteile: Organoide liefern schnellere und robustere Ergebnisse, sind leichter zugänglich und bieten sowohl eine genauere Darstellung des menschlichen Gewebes als auch eine größere Menge an Material, mit dem gearbeitet werden kann als Tiermodelle. Auch der Zeitaufwand für die Etablierung der Forschungsplattform ist für das Organoid-Modell kürzer als für Tiermodelle. Eine humane Organoid-Kultur kann innerhalb weniger Wochen oder Monate mit einer hohen Erfolgsquote etabliert werden und unterstützt so den Einsatz von patienteneigenen Organoiden in der personalisierten Medizin, um robuste personalisierte Daten zu liefern, einschließlich individueller Mutationsprofile und Arzneimittelreaktionen [135].

1.5 Ersatz von Tierversuchen

1.5.1 Einsatz von Tierversuchen

Die Entdeckung und Entwicklung von Arzneimitteln ist ein langwieriger, komplexer und kostspieliger Prozess, der die Identifizierung eines neuen Therapeutikums, die vorklinische Validierung und klinische Studien umfasst [192,266]. Es beginnt mit der Identifizierung und Validierung des mutmaßlichen molekularen/zellulären Wirkstoffziels, gefolgt von in der Regel langwierigen präklinischen und klinischen Studien, die in einer Reihe von behördlichen Zulassungen enden. Es steht außer Frage, dass die Verwendung von experimentellen Tiermodellen dazu dient, die Ursprünge, die Pathologie und die Gesamtnatur vergleichbarer Erkrankungen des Menschen besser zu verstehen [233]. In der akademischen und industriellen Forschung sowie in der regulatorischen Sicherheitsbewertung und Arzneimittelentwicklung werden nach wie vor umfangreiche *in vivo*-Studien mit erheblichem Tierverbrauch durchgeführt [253]. Der größte Teil unseres heutigen Wissens über Mechanismen des Alterns wurde mit klassischen Modellsystemen wie Maus und Ratte gewonnen. Die nächsten lebenden Verwandten des Menschen, Schimpansen und Bonobos, sind aufgrund ihrer ähnlichen Alterungsphysiologie von größtem Interesse für die Forschung, die darauf abzielt, lebensverlängernde Behandlungen für den Menschen zu entwickeln [117]. Dieser Vorteil wird jedoch durch erhebliche finanzielle, ethische, rechtliche und artenschutzrechtliche Erwägungen sowie durch die Undurchführbarkeit einer Lebensdauer von bis zu 60 Jahren relativiert [91]. Tiermodelle können die physiologische Komplexität auf der Ebene des gesamten Organismus nachahmen, aber tierischen

Surrogaten menschlicher Krankheiten mangelt es an wissenschaftlicher Gültigkeit und Übertragbarkeit auf den Menschen [202].

Toxikologische Tests an Tieren und präklinische Tierstudien in der Arzneimittelentwicklung wurden zunehmend in Frage gestellt, da sie nicht mit den Ergebnissen am Menschen korrelieren. Tiertoxizitätstests können die Toxizität bei fast 50 % der Medikamente, die sich zwischen Phase-I-Studien und frühen Rückzügen nach dem Inverkehrbringen in der Pipeline befinden, nicht vorhersagen [253]. Schätzungen der Misserfolgsraten liegen bei bis zu 90 %, und dies bezieht sich sowohl auf mangelnde Wirksamkeit als auch auf Sicherheitsprobleme, wenn die Medikamente in klinischen Studien am Menschen bewertet werden [122]. Tiermodelle für bestimmte Krankheiten spiegeln in der Regel nicht exakt vergleichbare Krankheitszustände des Menschen wider [126]. Menschliche Probanden wurden bei der klinischen Erprobung von Medikamenten geschädigt, die in Tierversuchen als sicher eingestuft wurden [253]. Eine Überprüfung von 76 Tierstudien im Jahr 2006 ergab beispielsweise, dass etwa 20 % beim Menschen widerlegt wurden und nur 37 % jemals beim Menschen repliziert wurden [101]. Eine Überprüfung von 221 Tierversuchen ergab in Humanstudien nur in 50 % der Fälle eine Übereinstimmung [198]. Etwa 12 % der Arzneimittel bestehen die präklinischen Tests, um in klinische Studien aufgenommen zu werden [287]. Davon schließen nur 60 % Phase-I-Studien erfolgreich ab [252]. Insgesamt scheitern etwa 89 % der neuartigen Arzneimittel bei klinischen Studien am Menschen, wobei etwa die Hälfte dieser Misserfolge auf eine unerwartete Toxizität beim Menschen zurückzuführen ist [254]. Medikamente, die klinische Studien überstehen und die Marktzulassung erhalten, können später noch zurückgerufen werden, da die Toxizität erst nach Monaten oder Jahren der Anwendung am Menschen festgestellt wurde. Zeit- und Kosteneinsparungen für neue Therapeutika könnten erheblich sein, wenn die Sicherheit von präklinischen Tests ohne Tierversuch nachgewiesen wird [253].

1.5.2 Die Unterschiede zwischen Mensch und Versuchstier

In Tierversuchen zur Untersuchung der Atemwege werden Mäuse häufig Schadstoffen ausgesetzt und Lungenschäden durch Wirkstoffe oder Infektion mit Krankheitserregern induziert. Diese Modelle weisen unter anderem folgende schwerwiegende Nachteile auf: (1) erheblicher Tierverbrauch und Tierleid, (2) Unterschiede in der Physiologie der Lunge zwischen Mensch und Nagetier und (3) häufig unzureichende Übertragbarkeit auf den Menschen aufgrund von Unterschieden in den zellulären Prozessen zwischen Tier und Mensch [35,253,273]. Ein großes Hindernis für weitere Fortschritte ist das Fehlen von Tiermodellen, die dem menschlichen Zustand genau ähneln, was die Aufklärung relevanter Wirkmechanismen, die Enthüllung von Biomarkern für den Krankheitsverlauf und die Identifizierung neuer Ziele für Interventionen bei Patienten verzögert. Ein großes Hindernis betrifft die genetischen, anatomischen und funktionellen Unterschiede zwischen den Arten, die die größte Herausforderung bei der Suche nach geeigneten Modellen für Atemwegserkrankungen darstellen [273].

Obwohl viele physiologische und zelluläre Prozesse und Mechanismen zwischen Mäusen, die am häufigsten verwendete Tierart, und Menschen sich stark ähneln, sind Erkrankungen der Lunge im Tiermodell nur schwer abbildbar und die dabei erzielten Ergebnisse kritisch zu betrachten [63]. Mäuse sind aufgrund ihrer vergleichbaren Physiologie, der großen Anzahl verfügbarer genetischer Werkzeuge, ihrer geringen Größe und ihres schnellen Fortpflanzungszyklus am relevantesten für die Untersuchung krankheitsbezogener biologischer Prozesse, beispielweise physiologische, molekulare und zelluläre Abläufe, die bei menschlichen Krankheiten gestört oder verändert sind [63]. Die menschliche Entwicklung ist im Allgemeinen im Vergleich zu Nagetieren langwierig [207]. Das Gesamtmuster des Tracheobronchialbaums ist bei Säugetierarten sehr ähnlich und zeichnet sich durch sein dichotomes Verzweigungsmuster aus, wobei die Tochterzweige zunehmend kleiner werden, was schließlich zu den Gasaustauscheinheiten führt. Die Länge des Tracheobronchialbaums, der Winkel der Zweigpunkte und die Oberfläche variieren jedoch stark zwischen den Arten. Es gibt wichtige Artenunterschiede in den Epithelzellen, die den Tracheobronchialbaum bevölkern (z. B. die Anzahl der sekretorischen Zellen) sowie in der Architektur der Verbindung zwischen den distalen leitenden Atemwegen und dem Alveolarparenchym [193]. Bei Mäusen sind die Basalzellen weitgehend auf die Luftröhre und die proximalen Bronchien beschränkt, während sich die Basalzellen beim Menschen über die leitenden Atemwege erstrecken [29,172,214]. Beim Menschen sind schleimproduzierende Becherzellen der am häufigsten vorkommende sekretorische Zelltyp in den proximalen Atemwegen, bei erwachsenen Mäusen sind diese jedoch vergleichsweise selten und stattdessen überwiegen Keulenzellen [172]. Mäusen scheinen 17 der 58 menschlichen molekularen Lungenzelltypen zu fehlen [247]. Dies deutet auf eine beträchtliche Erweiterung der Zelltypen in der menschlichen Abstammungslinie hin, vielleicht für neue Funktionen oder Regenerationsfähigkeit unserer 3.000-fach größeren Lungen und eine 30-mal längere Lebensdauer [157,229]. Auch der Übergang vom Atemwegsepithel in die Alveolen ist sehr unterschiedlich. Bei Mäusen endet das Atemwegsepithel abrupt mit zahlreichen Clubzellen, denen auch Stammzeleigenschaften für Typ-II-Pneumozyten zugeschrieben werden. Beim Menschen geht das Atemwegsepithel über einen bronchioalveolären Übergang in das Alveolarepithel über. Neuste Studien weisen darauf hin, dass in diesem Bereich sich Vorläuferzellen befinden, die bei der Regeneration der Lunge von Bedeutung sind [16]. Diese Strukturen sind bei der Pathogenese chronischer Lungenerkrankungen von Bedeutung, was die Sinnhaftigkeit von murinen Krankheitsmodellen in Frage stellt. Auch wenn die Maus aufgrund ihrer relativ niedrigen Kosten, Verfügbarkeit und einer ständig wachsenden Bibliothek von Reagenzien das am häufigsten verwendete Tier zur Modellierung von COPD ist [15], verwundert es kaum, dass COPD-Modelle, bei denen Mäuse beispielsweise Rauch ausgesetzt werden, bislang nur unzureichend zu sicheren und wirksamen Therapien beim Menschen beigetragen haben.

Da submuköse Drüsen antibakterielle Proteine (Lysozym) exprimieren, wurde vorgeschlagen, dass sie zur Lungenabwehr durch Ausscheidung von Schleim, Flüssigkeit und bakteriziden Proteine beitragen.

Mäuse haben jedoch keine dem Menschen vergleichbaren submukösen Drüsen. Bei Mäusen haben Typ-II-Alveolarzellen die Fähigkeit Lysozym zu produzieren [69]. Die Unfähigkeit, Mukoviszidose bei Mäusen zu induzieren, ist ein wichtiges Beispiel für dieses Prinzip, bei dem das Fehlen submuköser Drüsen in der Maus eine Rolle bei der Verhinderung der Induktion von Lungenerkrankungen spielen kann [99]. Auch funktionale Unterschiede sind offensichtlich, zum Beispiel haben Mäuse keinen Hustenreflex [273]. Artspezifische Unterschiede bestehen auch in der Anfälligkeit für Infektionskrankheiten. Infektionserreger sind aufgrund artspezifischer Wirt-Pathogen-Interaktionen oft humanspezifisch [63]. Beispielsweise verursacht das schwere akute respiratorische Syndrom Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), der Ursprung der COVID-19-Pandemie, keine Krankheit bei Wildtypmäusen [12]. Die meisten bakteriellen Pathogene wie *Streptococcus pneumoniae* besiedeln Nager nicht und lösen bei Nagern keine Erkrankung aus [102]. Insgesamt zeigt sich mehr und mehr, dass murine Krankheitsmodelle, wie auch das Bleomycin-induzierte Fibrosemodell, die Situation im Menschen ungenügend abbilden, was zu erheblichen ethischen Bedenken in Hinblick auf das Tierwohl führt.

1.5.3 Zellkulturmodelle als Ersatz von Tierversuchen

Es ist von Bedeutung, dass 3D-Zellkultur-Modelle als *in vitro*-Plattform Hochdurchsatz-Assays ermöglichen, die mit Bildgebung [56], Automatisierung [32] und Computerwerkzeugen [21] integriert werden können, um ein effektives Arzneimittelscreening und präzise Arzneimittelentdeckung und -entwicklung in der pharmazeutischen Wissenschaft zu erreichen. Darüber hinaus müssen Tierversuche gemäß dem europäischen Tierschutzgesetz und zusätzlichen Vorschriften in vielen Ländern auf ein notwendiges und ethisch vertretbares Maß reduziert werden. Es ist daher zwingend erforderlich, geeignete Modelle auf Basis menschlicher Zellen zu entwickeln, um die Anzahl der erforderlichen Tiere im Sinne der 3R (Replace, Reduce, Refine) zu reduzieren und im besten Fall vollständig zu ersetzen.

Immortalisierte Zelllinien, die von menschlichen Krebserkrankungen stammen, sind seit Jahrzehnten verfügbar und werden häufig für die molekularbiologische Grundlagenforschung und translationale Forschung wie Arzneimittelforschung und Arzneimitteltests verwendet. Die Krebszelllinienkultur ist einfach und kostengünstig und bietet eine fast unbegrenzte Quelle für biologisches Material. Noch wichtiger ist, dass Krebszelllinien im Gegensatz zu Zellen in lebendem Gewebe keinen dynamischen Signalen von anderen Zellen und der extrazellulären Matrix ausgesetzt sind, was zu einer veränderten Genexpression, Stoffwechsel und Arzneimittelresistenz führt [175]. Kulturen menschlicher Gewebeexplantate, die aus Primärmaterial gewonnen wurden, behalten Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen sowie die ursprüngliche Gewebearchitektur bei. Damit sind sie zu einem wertvollen Modellsystem geworden, um dynamische normale und abnormale zelluläre Prozesse sowie Wirt-Pathogen-Interaktionen zu untersuchen. Die eingeschränkte Verfügbarkeit und kurzfristige Lebensfähigkeit menschlicher Gewebeexplantate sowie ethische Bedenken können jedoch ihren Nutzen in der Grundlagenforschung und translationalen Forschung einschränken [51]. Im Vergleich zu

Tierversuchen senken 3D-Zellkultursysteme die Kosten für das Arzneimittel-Screening und sie können die Zeit des Screening-Prozesses erheblich verkürzen und gleichzeitig Input von mehr Zelltypen und mehr physiologische Komplexität liefern [34]. Die Verwendung primärer Zellen aus Patienten erlaubt die Adressierung zellulärer patienten-spezifischer Funktionsstörungen mittels Pharmakotherapeutika im Rahmen der personalisierten Medizin. Zellkultursysteme können auch auf andere Erkrankungsgebiete und den Bereich der Umwelttoxikologie übertragen werden.

1.6 Fragestellung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von 3D-Lungenorganoid-Plattformen zur Prüfung pharmazeutischer Wirkstoffe im Hinblick auf zelluläre Seneszenz, Entzündungsprozesse und Toxizität als Ersatz für Tierversuche. Im 96-Well-Format mit in Matrigel kultivierten Organoiden sollte die Erhebung verschiedener Endpunkte wie Seneszenz, Toxizität, metabolische Aktivität, Bildung und Abgabe von Entzündungsmediatoren und Stressfaktoren, Morphologie, Integrität der Organoiden und Proteinexpression innerhalb eines einzigen Versuchszyklus erfasst werden. Zusätzlich sollten Einzelzellsequenzierungen weiterführende mechanistische Analysen ermöglichen. Ein Matrigel-freies Organoid-Modell sollte zur Testung von Wirkstoffen charakterisiert werden. Es sollten zahlreiche innovative Wirkstoffe getestet werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1 stellt die in dieser Arbeit verwendeten Geräte mit Herstellerangabe dar.

Tabelle 1: Verwendete Geräte mit Herstellerangabe

Gerätebezeichnung	Herstellerangabe
BD Rhapsody	BD Bioscience, USA
BD Rhapsody Express Instrument	BD Bioscience, USA
BD Rhapsody P1200M Pipette	BD Bioscience, USA
BD Rhapsody P5000M Pipette	BD Bioscience, USA
Bioanalyzer Agilent 2100	Agilent Technologies, USA
CFX96 Real-Time System	BioRad, USA
ChemiDoc MP Imaging System	BioRad, USA
Duomax 1030	Heidolph Instruments, Deutschland
FACS Cell Sorter SH800S	Sony Biotechnology, USA
Inkubator Hera Cell	Heraeus, Deutschland
Inkubator Inforns HT Minitron	Inforns HT, Deutschland
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Deutschland
Luminex (MagPix)	Luminex, USA
LUNA-FL Automated Cell Counter	Logos Biosystems, South Korea
Mikroplattenleser FLUOstar Omega	MBG Labtech, Deutschland
Mikrotom Leica SM 2000 R	Leica, Deutschland
Minilys (Arbeitsplatz-Homogenisator)	Bertin Technologies, Frankreich
NanoDrop 8000	Thermo Scientific, Deutschland
PowerPac Basis	BioRad, USA
Qubit Flex Fluorometer	Invitrogen by Thermo Scientific, Deutschland
Röhrchen-Revolver/-Rotator	Thermo Scientific, Deutschland
Sterilbank Hera Safe	Heraeus, Deutschland
Thermoblock (PocketBloc Heizblock)	Biozym Scientific GmbH, Deutschland
Thermomixer (Shaker)	PEQLAB Biotechnologie/VWR, Deutschland
timsTOF Pro (Proteomik)	Bruker, Deutschland
Titramax 101	Heidolph Instruments, Deutschland
T100 Thermal Cycler	BioRad, USA

Vortex-Genie 2	Scientific Industries, USA
Zentrifuge Fresco 21	Thermo Scientific, Deutschland
Zentrifuge Laborfuge 400	Thermo Scientific, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Thermo Scientific, Deutschland
10X Genomics Chromium Xi	10X Genomics, USA

2.1.2 Verbrauchsmaterial

In Tabelle 2 sind die in der Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben aufgelistet.

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangabe

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Bestellnummer
AggreWell Platten	StemCell Technologies, USA	34415
Chip Gasket	10X Genomics, USA	3000072
Chromium Next GEM Chip G	10X Genomics, USA	1000127
DNA LoBind Tubes 1,5 ml	Eppendorf, Deutschland	022431021
DNA LoBind Tubes 2 ml	Eppendorf, Deutschland	022431048
Einbettkassette	Carl Roth, Deutschland	K113.1
ELISA Platte	Brand, Deutschland	781722
ELISA Sealing Tape	Nunc, Thermo Fisher Scientific, Deutschland	236366
Eppendorf 0.5 ml	Sarstedt, Deutschland	72.699
Eppendorf 1.5 ml	Sarstedt, Deutschland	72.690.001
Eppendorf 2 ml	Sarstedt, Deutschland	72.695.500
Falcon 15 ml	Greiner Bio-One, Österreich	188271
Falcon 50 ml	Greiner Bio-One, Österreich	227261
High Sensitivity DNA Chips	Agilent Technologies, USA	5067-4626
Kryoröhrchen	VWR, USA	10018-738
PCR-Platten	Axon Labortechnik, Deutschland	28242
PCR- Sealing Tape	Biozym Scientific GmbH, Deutschland	600208
PCR-Tubes, 0.2 ml	Brand, Deutschland	781305
PCR Tubes 0,2 ml 8-tubes strips	Eppendorf, Deutschland	951010022
Petrischale	Sarstedt, Deutschland	82.1472
Pipettenspitzen 20 µl	Gilson, USA	F167102
Pipettenspitzen 200 µl	Gilson, USA	F167103

Pipettenspitzen 300 µl (Mehrkanalpipette)	Biozym Scientific GmbH, Deutschland	VT0155
Pipettenspitzen 1000 µl	Gilson, USA	F167104
Stabpipette 5 ml	Greiner Bio-One, Österreich	703193
Stabpipette 10 ml	Greiner Bio-One, Österreich	703194
Stabpipette 25 ml	Greiner Bio-One, Österreich	703195
24 Well Platten	Corning, USA	353047
T75 Zellkulturflaschen	Sarstedt, Deutschland	83.3911.002
T175 Zellkulturflaschen	Sarstedt, Deutschland	83.3912.002
96-Well-Platte, F-Boden, klar	Greiner Bio-One, Österreich	M0812-100EA
96-Well-Platte, U-Boden, klar	Greiner Bio-One, Österreich	650180
96-Well-Platte, schwarz	Kisker Biotech, Deutschland	655090

Alle weiteren Verbrauchsartikel, Antikörper, Kits und Software sowie deren Hersteller sind im jeweiligen Methodenteil aufgeführt.

2.1.3 Primer

Tabelle 3 zeigt die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer. Die Primer wurden von der Firma Metabion (Deutschland) bezogen.

Tabelle 3: Verwendete humane RT-qPCR-Primer

Primer	Forward	Reverse
<i>GAPDH</i>	5'-GGA GTC AAC GGA TTT GGT-3'	5'-GTG ATG GGA TTT CCA TTG AT-3'
<i>MUC5B</i>	5'-GTG AGG AGG ACT CCT GTC AAG T-3'	5'-CCT CGC AGA AGG TGA TGT TG-3'
<i>MUC5AC</i>	5'-GCT TCC TGC TCC GAG ATG T-3'	5'-AAG ACG CAG CCC TCA TAG AA-3'
<i>FOXJ1</i>	5'-GTG AAG CCT CCC TAC TC-3'	5'-AAT TCT GCC AGG TGG G-3'

2.1.4 Antikörper

Tabelle 4 zeigt die Auflistung der verwendeten primären und sekundären Antikörper für den Western Blot.

Tabelle 4: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper für den Western Blot

Antigen	Spezies	Arbeitsverdünnung	Konzentration	Hersteller	Bestellnr.
p16 ^{INK4A} (D7C1M)	Human	1:1000	298 µg/ml	Cell Signaling Technology, USA	80772
p21 ^{WAF1/Cip1} (12D1)	Human	1:1000	244 µg/ml	Cell Signaling Technology, USA	2947S
β-Aktin	Human	1:1000	16 µg/ml	Cell Signaling Technology, USA	4967L
Anti-Rabbit (HRP-konjugiert)	Human	1:2000	0,25 g/ml	Dako, USA	P0448

In Tabelle 5 sind die in der Arbeit verwendeten primären und sekundären Antikörper in der Immunhistochemie aufgelistet.

Tabelle 5: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper in der Immunhistochemie

Antigen	Spezies	Arbeitsverdünnung	Konzentration	Hersteller	Bestellnr.
p21 ^{WAF1/Cip1}	Human	1:100	244 µg/ml	Cell signaling Technology, USA	2947S
p16 ^{INK4A}	Human	1:200	298 µg/ml	Thermo Scientific, Deutschland	80772
TIMP-2	Human	1:400	1 mg/ml	Invitrogen, USA	MA1-774
MUC5AC	Human	1:1000	200 µg/ml	Abcam, England	ab3649
MUC5B	Human	1:400	200 µg/ml	Santa Cruz, USA	sc-393952

CK5	Human	1:100	65 µg/ml	Abcam, England	ab75869
FCGBP	Human	1:400	0,2 mg/ml	Abcam, England	ab121202
Anti-Mouse (HRP-konjugiert)	Human	1 Tropfen pro Slide	1,3 g/l	Dako, USA	P0161
Anti-Rabbit (HRP-konjugiert)	Human	1 Tropfen pro Slide	0,25 g/l	Dako, USA	P0448

2.1.5 Lösungen und Puffer

Alle verwendeten Lösungen und Medien können der nachfolgenden Tabelle 6 entnommen werden.

Tabelle 6: Verwendete Medien und Lösungen

10x PBS (10 Liter)	800,6 g NaCl (Carl Roth) 20,1 g KCl (Carl Roth) 115,6 g Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O (Carl Roth) 20,4 g KH ₂ PO ₄ (Carl Roth) In 10 L Aqua dest. Lösen, pH 7,2 – 7,4
ELISA Buffer (5 Liter)	4,5 ml Aqua dest. 500 ml 10x PBS 2,5 ml Tween 20 (PanReac AppliChem GmbH)
ELISA Diluent	0,1 % BSA (Sigma-Aldrich) in PBS 0,1 % BSA (Sigma-Aldrich) in 0,05 % Tween 20 in Tris-buffered Saline
Tris-buffered Saline (für ELISA; 1 Liter)	20 mM Trizma Base (2,4 g; Sigma-Aldrich) 150 mM NaCl (8,7 g; Carl Roth) 0,05 % Tween20 (PanReac AppliChem GmbH) Sterilfiltrieren (0,2 µm) pH 7,2 - 7,4
Formalinlösung 4 %	108 ml 37 % Formaldehydlösung mit 1X PBS auf 1 L auffüllen
10x Blotting Buffer (1 Liter)	0,048 M Tris Base (58,15 g; Sigma-Aldrich) 0,039 M Glycin (29,29 g; EMD Millipore) Auf pH 9,2 einstellen 0,0013 M SDS (3,75 g; Carl Roth)

1x Blotting Buffer (1 Liter)	100 ml 10x Blotting Puffer 700 ml Aqua bidest. 200 ml Methanol
10X SDS-PAGE Laufpuffer (2 Liter)	0,25 M Tris Base (60,57 g; Sigma-Aldrich) 1,92 M Glycin (288,27 g; EMD Millipore) 1 % SDS (20 g; Carl Roth) Auf pH 8,3 einstellen
1X SDS-PAGE Laufpuffer (1 Liter)	100 ml 10x SDS-PAGE Laufpuffer 900 ml Aqua dest.
10 % Ammoniumpersulfate	10 % Ammoniumpersulfate (0,5 g; Sigma-Aldrich) In 5 ml Aqua bidest. lösen
10 % SDS	10 % SDS (5 g; Carl Roth) In 50 ml Aqua bidest. lösen
TRIS 1,5 M (250 ml)	Tris-HCl (1,5 M, 59,1 g; Carl Roth) In 250 ml Aqua bidest. lösen Auf pH 8,8 einstellen
TRIS 1 M (250 ml)	Tris-HCl (1 M, 39,4 g; Carl Roth) In 250 ml Aqua bidest. lösen Auf pH 6,8 einstellen
Trenngel (12 %)	4,9 ml H ₂ O 6 ml 30 % acrylamide mix (Carl Roth) 3,8 ml 1,5 M Tris (pH 8,8) 0,15 ml 10 % SDS 0,15 ml 10 % ammonium persulfate 0,006 ml TEMED
Sammelgel (6 ml)	2,7 ml H ₂ O 0,67 ml 30 % acrylamide mix 0,5 ml 1 M Tris (pH 8,8) 0,04 ml 10 % SDS 0,04 ml 10 % ammonium persulfate 0,004 ml TEMED

Differenzierungsmedium (Matrigel- Organoide)	250 ml DMEM-Medium, erhöhter Glukosegehalt, 4,5 g/L (Gibco) 250 ml BEBM-Medium (Lonza) 2 ml BPE (Lonza) 0,5 ml Insulin (Lonza) 0,5 ml Hydrocortison (Lonza) 0,5 ml GA-1000 (Lonza) 0,5 ml Transferrin (Lonza) 0,5 ml Epinephrin (Lonza) 0,5 ml hEGF (Lonza)
Primärzell-Medium	500 ml Airway Epithelial Cell Growth Medium (Promocell) 12,3 ml SupplementMix (Promocell) 1 ml Primocin, 100 µg/ml (InvivoGen)
PneumaCult-Medium (Apikal-Out- Organoide)	8,92 ml PneumaCult Apical-Out Airway Organoid Basal Medium (StemCell) 1 ml PneumaCult Apical-Out Airway Organoid 10X Supplement (StemCell) 10 µl PneumaCult Apical-Out Airway Organoid 1000X Supplement (StemCell) 20 µl Heparin Solution (StemCell) 50 µl Hydrocortisone Stock Solution (StemCell)
Fibroblasten-Medium	500 ml DMEM-Medium (Gibco) 50 ml FCS (Gibco) 5 ml Penicillin-Streptomycin (Sigma-Aldrich)
X-Puffer	7 M Harnstoff 2 M Thioharnstoff 20 mM HEPES Auf pH 7,5 einstellen

2.1.6 Software

Zur Erstellung von Texten wurde das Softwarepaket Microsoft Office verwendet.

Die in der Arbeit dargestellten Diagramme sowie Grafiken wurden mittels der Software GraphPad Prism 9.3.1 der Firma GraphPad Software Inc. erstellt und statistische Tests durchgeführt.

Zur Auswertung der Anzahl und Größe von Organoiden sowie von immunhistochemischen Färbungen wurde die Software ImageJ verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Probengewinnung und -aufarbeitung

2.2.1.1 Bürstenbiopsien

Für die Gewinnung humaner Primärzellen aus der Lunge gaben alle teilnehmenden Patienten eine schriftliche Einverständniserklärung ab, eine Zustimmung der Ethik-Kommission der Ärztekammer des Saarlandes liegt vor.

Während einer Bronchoskopie wurden Bronchialzellen mittels Bürstenbiopsie entnommen. Die entnommenen Lungenzellen wurden mittels Aufschütteln und Pipettieren von der Bürste gelöst und in Kokultur mit mitotisch inaktivierten 3T3-Fibroblasten (1 Kryoröhrchen mit $2,25 \cdot 10^6$ Zellen, sodass in einer T75 Zellkulturflasche circa $3 \cdot 10^4$ Fibroblasten pro cm^2 Wachstumsfläche vorkultiviert wurden) und 5 μM ROCK (Rho Kinase) -Inhibitor (Y-27632, MedChemExpress, USA) bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert. 3T3-Fibroblasten und Inhibition der Rho-Kinase ermöglichten eine schnelle Expansion der Atemwegsbazellen [40]. Alle zwei Tage wurde das Primärzellmedium + 5 μM ROCK-Inhibitor erneuert. Wenn die Primärzellen eine Konfluenz von 80 % erreicht haben, wurden sie für weiterführende Experimente verwendet oder eingefroren.

2.2.1.2 Resektate

Aus diagnostisch/klinisch nicht benötigten Lungenresektaten wurden Bronchus-Stücke entnommen. Die Bronchus-Stücke wurden mit 20 ml DMEM/F12-Medium (Gibco, USA) + 1 ml Primocin (InvivoGen, USA) drei Mal gewaschen. Danach wurde der Bronchus in 25 ml DMEM/F12-Medium + Primocin aufgenommen, 1 ml (25 mg/ml) Proteinase K (R&D Systems, USA) dazugegeben und über Nacht bei 4 °C gelagert.

Am nächsten Tag wurde der Bronchus mit dem Medium in eine Petrischale gegeben. Der Bronchus wurde mittels Skalpell aufgeschnitten und die Epithelzellen aus dem Inneren des Bronchus mit dem Skalpell vorsichtig herausgekratzt. Der Bronchus wurde anschließend verworfen und die erhaltene Zellsuspension in einem Falcon gesammelt. Die Suspension wurde bei 300 x g für 3 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es wurden 10 ml Primärzellmedium dazugegeben und das Zellpellet resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine neue Petrischale überführt und bei 37 °C und 5 % CO_2 bis zu einer Konfluenz von 80 % inkubiert.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Expansion und Inaktivierung von Fibroblasten

Zur Kultivierung von 3T3-Fibroblasten wurde DMEM-Medium mit höherem Glukosegehalt (4,5 g/L; Gibco, USA) mit 10 % FCS (Fetales Kälberserum; Gibco, USA) und 1 % Pen/Strep (Sigma-Aldrich, USA) verwendet, bis eine Konfluenz von 80 % erreicht wurde. Anschließend wurden die 3T3-Fibroblasten passagiert und in T175-Kulturflaschen ausgesät. Bei ausreichender Konfluenz von bis zu 80 % wurden die aktiven 3T3-Fibroblasten mit Hilfe von 30 μM Mitomycin C (Sigma-Aldrich, USA; 2

mg/5 ml H₂O) inaktiviert. Dazu wurden in jede T175-Kulturflasche 30 ml Fibroblasten-Medium + 750 µl gelöstes Mitomycin C gegeben und für 3 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die 3T3-Fibroblasten vier Mal mit PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung; Sigma-Aldrich, USA) gewaschen und vom Kulturboden mit Hilfe von TrypLE Express (Gibco, USA) gelöst. Die inaktivierten 3T3-Fibroblasten wurden in einer Konzentration von 2,25*10⁶ Zellen/Kryoröhrchen in Fibroblasten-Medium mit 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid; Carl Roth, Deutschland) eingefroren.

2.2.2.2 Kultivierung von 3D-Lungenorganoiden

Zur Kultivierung von Organoiden wurde am Tag vor dem Aussäen eine 96-Well-Platte mit 40 µl Differenzierungsmedium (DM), Retinsäure (50 nM; Sigma-Aldrich, USA) und 25 % Matrigel (Corning, USA) pro Vertiefung beschichtet und zum Gelieren des Matrigels bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Es wurden 80 µl Zellsuspension (3*10⁴ Zellen/ml) in DM mit 5 % Matrigel + Retinsäure (50 nM) pro Vertiefung ausgesät, um ein ausreichendes Organoid-Wachstum zu gewährleisten. Ein Tag nach dem Aussäen wurden 120 µl frisches Medium (5 % Matrigel in DM + Retinsäure) als sogenannter *Top-Up-Feed* auf die Zellen gegeben. Der *Top Up Feed* wurde alle vier Tage durch vorsichtiges Abnehmen der oberen 120 µl und erneute Zugabe frischen Mediums gewechselt. Die Organoiden wurden über einen Zeitraum von 21 Tagen kultiviert. Während der Kultivierung wurden lichtmikroskopische Aufnahmen gemacht, um die Anzahl, Größe und prozentualer Anteil von Organoiden mit Lumen auszuwerten.

2.2.2.3 Stimulation der Matrigel-Organoiden

An Tag 21 der Kultivierung von Organoiden wurden diese mit verschiedenen Substanzen behandelt, um die Auswirkung auf die Seneszenz zu untersuchen. Dazu wurden folgende Stock-Lösungen der Substanzen angesetzt: Doxorubicin (20 mM; Sigma-Aldrich, USA), Metformin (500 mM; Sigma-Aldrich, USA), Quercetin (20 mM; Sigma-Aldrich, USA) und Dasatinib (5 mM; Sigma-Aldrich, USA). Diese Substanzen wurden in verschiedenen Konzentrationen auf die Organoiden gegeben: Metformin (5 mM, 1:50-Verdünnung), Doxorubicin (100 nM, 1:10.000-Verdünnung), Quercetin (50 µM, 1:200-Verdünnung) und Dasatinib (200 nM, 1:12.500-Verdünnung). Die von Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HIPS) bereitgestellten Substanzen wurden in einer Konzentration von 10 µM auf die Organoiden gegeben (Stock-Lösung: 10 mM in DMSO). Die Substanzen wurden im *Top Up Feed* verdünnt. Die Organoiden wurden 48 bzw. 96 Stunden mit den Substanzen inkubiert. Vor, während und nach der Stimulation wurden lichtmikroskopische Aufnahmen von den Organoiden zur Analyse gemacht.

2.2.2.4 Kultivierung von Apikal-Out-Organoiden

Vor Beginn des Versuchs wurde die entsprechende Menge Medium für die Apikal-Out-Organoidkultur angesetzt. Das Medium kann bis zu zwei Wochen bei 4 °C gelagert werden.

Für 10 ml PneumaCult-Medium wurden die in Tabelle 7 aufgelisteten Substanzen verwendet.

Tabelle 7: Zusammensetzung PneumaCult-Medium (10 ml)

PneumaCult Apical-Out Airway Organoid Basal Medium	8,92 ml
PneumaCult Apical-Out Airway Organoid 10X Supplement	1 ml
PneumaCult Apical-Out Airway Organoid 1000X Supplement	10 µl
Heparin Solution	20 µl
Hydrocortisone Stock Solution	50 µl

Vor Beginn des Versuchs wurde eine AggreWell-Platte (24 Vertiefungen) mit je 500 µl Anti-Adherence Rinsing Solution pro Vertiefung vorbeschichtet. Die Platte wurde 10 Minuten bei 1300 x g zentrifugiert. Die Lösung wurde abgesaugt und die Vertiefung mit je 1 ml DMEM/F12 mit 15 mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) gewaschen. Die Vertiefungen wurden mit je 1 ml DMEM/F12 mit 15 mM HEPES gefüllt und im Inkubator (37 °C, 5 % CO₂) gelagert. Die Platte kann bis zu fünf Tage im Inkubator gelagert werden.

Die Zellen wurden aus der Flasche gelöst (TrypLE Express und TNS (Trypsin Neutralisation Solution)), für 3 Minuten bei 300 x g zentrifugiert und anschließend gezählt. Zur Zellzählung wurde das Zellpellet in 1 ml PneumaCult-Medium resuspendiert. In jede Vertiefung der AggreWell-Platte wurden 1 ml PneumaCult-Medium pipettiert und anschließend die erforderliche Menge der Zellsuspension gegeben. Die gewünschte Zellmenge beträgt $1,2 \cdot 10^5$ Zellen pro Vertiefung (final 100 Zellen pro Mikrowell, da 1200 Mikrowells pro Vertiefung). Die Platte wurde 3 Minuten bei 100 x g zentrifugiert und ein bis sechs Tage im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ gelagert, bis sich Zellaggregate in den Mikrowells gebildet haben. Alle zwei Tage wurde ein partieller Mediumwechsel durchgeführt. Dazu wurden 500 µl Medium vorsichtig an der Wand abgesaugt und 500 µl neues PneumaCult-Medium dazugegeben. Wenn die Zellen Aggregate gebildet haben, wurden sie in eine normale 24-Well-Platte umgesetzt. Die 24-Well-Platte wurde ebenfalls mit 500 µl Anti-Adherence Rinsing Solution pro Vertiefung vorbeschichtet. In jede Vertiefung der AggreWell-Platte wurde 1 ml PneumaCult-Medium dazugegeben und resuspendiert, sodass sich die Aggregate vom Mikrowell lösen. In eine Vertiefung der normalen 24-Well-Platte wurde jeweils 1 ml der Aggregat-Lösung überführt, sodass eine Vertiefung der AggreWell-Platte zwei Vertiefungen in der normalen 24-Well-Platte ergeben. Jeden zweiten Tag wurde ein partieller Mediumwechsel durchgeführt. Dazu wurden 500 µl Medium vorsichtig an der Wand abgesaugt und 500 µl neues PneumaCult-Medium dazugegeben.

2.2.2.5 Stimulation der Apikal-Out-Organoid

Die Apikal-Out-Organoid wurden wie oben beschrieben in die AggreWell-Platte ausgesät. Nach Bildung der Aggregate wurden die Organoid in eine normale 24-Well-Platte umgesetzt und entweder direkt nach Aussaat oder nach 14 Tagen mit unterschiedlichen Stoffen stimuliert. Anschließend wurde RNS isoliert (Tabelle 8), die Organoid wurden eingebettet oder die Organoid wurden für die Einzelzellsequenzierung (Tabelle 9) verwendet.

Tabelle 8: Stimulation zur RNS-Isolation/Einbettung

	Medium	Zusatz
Kontrolle (6 Vertiefungen)	3 ml Medium	/
IL-13 (1:250 Verdünnung) (6 Vertiefungen)	3 ml Medium	+ 12 µl IL-13 (10 µg/ml)
IL-13 (1:500 Verdünnung) (6 Vertiefungen)	3 ml Medium	+ 6 µl IL-13 (10 µg/ml)
IL-13 (1:1000 Verdünnung) (6 Vertiefungen)	3 ml Medium	+ 3 µl IL-13 (10 µg/ml)

Tabelle 9: Stimulation für die Einzelzellsequenzierung

	Medium	Zusatz
Kontrolle (4 Vertiefungen)	2 ml Medium	/
IL-13 (1:250 Verdünnung) (4 Vertiefungen)	2 ml Medium	+ 8 µl IL-13 (10 µg/ml)
1:40 Hitzeinaktivierte PAO1 (4 Vertiefungen)	2 ml Medium	+ 50 µl hitzeinaktivierte PAO1 (OD=1)
1:40 Hitzeinaktivierte NTHi (4 Vertiefungen)	2 ml Medium	+ 50 µl hitzeinaktivierte NTHi (OD=1)
IL-13 + Hitzeinaktivierte PAO1 (4 Vertiefungen)	2 ml Medium	+ 8 µl IL-13 (10 µg/ml) + 50 µl hitzeinaktivierte PAO1 (OD=1)
IL-13 + Hitzeinaktivierte NTHi (4 Vertiefungen)	2 ml Medium	+ 8 µl IL-13 (10 µg/ml) + 50 µl hitzeinaktivierte NTHi (OD=1)

2.2.2.6 Stimulation der Apikal-Out-Organoiden mit HIPS-Substanzen

Die Apikal-Out-Organoiden wurden wie zuvor beschrieben in die AggreWell-Platte ausgesät. Nach Bildung der Aggregate wurden die Organoiden in eine normale 24-Well-Platte umgesetzt und nach 14 Tagen mit unterschiedlichen Stoffen 48 Stunden stimuliert. Anschließend wurde RNS isoliert und die Organoiden wurden eingebettet.

Die HIPS-Substanzen sind in DMSO gelöst und die Stock-Konzentration beträgt 10 mM. Die Substanzen wurden 1:1000 verdünnt, sodass eine Konzentration von 10 μ M für die Stimulation der Apikal-Out-Organoiden verwendet wurde (Tabelle S1).

2.2.3 Molekularbiologische Assays

2.2.3.1 Seneszenz Assay

Nachdem lichtmikroskopische Aufnahmen von den Organoiden aufgenommen wurden, erfolgte das Herauslösen der Organoiden aus dem Matrigel. Der *Top Up Feed* wurde zunächst abgenommen und zur Zytokin- und LDH (Laktatdehydrogenase)-Messung aufbewahrt. Zum Verflüssigen des Matrigels wurden 120 μ l Cell Recovery Solution (Corning, USA) pro Vertiefung auf die Organoiden gegeben und für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden jeweils drei Vertiefungen in einem Reaktionsgefäß vereinigt. Die Reaktionsgefäße wurden bei 200 x g für 3 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, sodass sich ein Pellet bildete. Der Überstand wurde entfernt und die Organoiden in 100 μ l Differenzierungs-Medium resuspendiert und in eine schwarze 96-Well-Platte überführt. In jede Vertiefung wurden 100 μ l Differenzierungs-Medium + 0,18 μ l Seneszenz-Farbstoff (Aus dem Seneszenz-Kit #ab228562; Abcam, UK) gegeben. Für 50 Vertiefungen wurden als Stock-Lösung 9 μ l Farbstoff in 1,5 ml Differenzierungsmedium gelöst. Die Organoiden wurden für zwei Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zwei Mal mit Waschpuffer gewaschen und in 200 μ l Waschpuffer zur Messung aufgenommen. Der fluoreszente Farbstoff wird als Substrat genutzt, welches von der SA- β -Galactosidase in seneszenten Zellen umgesetzt wird. Die Fluoreszenz wurde bei einer Exzitation von 485 nm und einer Emission von 520 nm mit Hilfe eines Mikroplattenleser gemessen.

2.2.3.2 MTT Assay zur Bestimmung der Zellviabilität

Nach dem Seneszenz Assay wurde der Waschpuffer abgesaugt und es wurden 100 μ l Differenzierungsmedium mit 10 μ l MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)-Farbstoff (Biotium, USA) in jede Vertiefung gegeben. Die Organoiden wurden für vier Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Zum Lösen der Formazan-Kristalle wurden nach vier Stunden 200 μ l DMSO pro Vertiefung auf die Organoiden gegeben und bei einer Wellenlänge von 570/630 nm im Mikroplattenleser gemessen.

2.2.3.3 LDH Assay zur Bestimmung der Toxizität

Aus jeder Platte wurde eine Vertiefung mit Organoiden pro Gruppe zur LDH-Messung aufbewahrt. Die gesammelten Organoide wurden zur Positivkontrolle verwendet. Für die Positivkontrolle wurden die Organoide in einem Reaktionsgefäß gesammelt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 10 µl Lyse-Puffer (aus dem LDH-Kit #ab65393; Abcam, UK) auf die Zellen gegeben. In eine schwarze 96-Well-Platte wurden 5 µl der lysierten Zellen als Positivkontrolle und jeweils 10 µl Überstand gegeben. Für 50 Vertiefungen wurden 100 µl WST (water-soluble tetrazolium salt) Substrate Mix in 5 ml LDH Assay Buffer gelöst. In jede Vertiefung wurden 100 µl der Lösung gegeben, resuspendiert und nach 30 Minuten Inkubation bei 37 °C im Mikroplattenleser bei OD₄₅₀ gemessen.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 RNS-Extraktion

Nachdem lichtmikroskopische Aufnahmen von den Organoiden aufgenommen wurden, wurden die Organoide aus dem Matrigel herausgelöst. Der *Top Up Feed* wurde zunächst abgenommen und zur Zytokin- und LDH-Messung aufbewahrt. Auf die Organoide wurden 120 µl Cell Recovery Solution pro Vertiefung gegeben und für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die herausgelösten Organoide wurden in einem 2 ml Reaktionsgefäß gesammelt und zentrifugiert (200 x g, 3 Minuten, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 1 ml PBS pro Reaktionsgefäß gewaschen. Die Lösung wurde erneut zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die Aufreinigung der RNS erfolgte nach Herstellerangaben des Extraktionskits „NucleoSpin RNA“ von der Firma Macherey-Nagel GmbH über Adsorption an Silika-Säulen/Membran. Hierfür wurden pro Reaktionsgefäß 350 µl Lyse Buffer (350 µl Buffer RA-1 + 3,5 µl β-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, USA)) dazugeben und resuspendiert, bis die Organoide lysiert waren. Anschließend wurden 350 µl Ethanol (70 %) in jedes Reaktionsgefäß dazugegeben und resuspendiert. Das Lysat wurde anschließend auf die Säule in einem neuen Reaktionsgefäß pipettiert und für 30 Sekunden bei 11.000 x g zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 350 µl Membran Desalting Buffer (MDB) auf die Säule pipettiert. Es wurde 1 Minuten bei 11.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurden 95 µl rDNase reaction mixture (10 µl reconstituted rDNase + 90 µl Reaction Buffer for rDNase (rDNase Set, Macherey Nagel, Deutschland)) auf die Säule pipettiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die verbleibende genomische DNS zu verdauen. Danach wurden 200 µl Waschpuffer RAW2 auf die Säule pipettiert und für 30 Sekunden bei 11.000 x g zentrifugiert. Die Säule wurde anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 600 µl Waschpuffer RA3 auf die Säule pipettiert und für 30 Sekunden bei 11.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule erneut ins Reaktionsgefäß gesetzt. Danach wurden 250 µl Waschpuffer RA3 auf die Säule pipettiert und für zwei Minuten bei 11.000 x g zentrifugiert, um die Membran zu trocknen. Die Säule wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Auf die Säule wurden 50 µl RNase-freies Wasser gegeben und für eine

Minute bei 11.000 x g zentrifugiert. Die Konzentration der gewonnenen RNS (ng/μl) wurden im Anschluss mit Hilfe des NanoDrop 8000 spektralphotometrisch gemessen und bei -80 °C aufbewahrt.

Um die erhaltene RNS in komplementäre DNS (cDNS) umzuschreiben, wurde das „Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit“ (Thermo Scientific, USA) verwendet. Mit Nuclease-freiem Wasser wurde die Konzentration der Proben eingestellt, sodass pro Eppendorf-Gefäß 11 μl Probe vorliegt. Zu jeder Probe wurden 1 μl Oligo-dT-Primer (InvitroGen, USA) dazugegeben und in eine 96-Well-Platte pipettiert. Zu jeder Probe wurden 8 μl Puffer (Tabelle 10) hinzugegeben.

Tabelle 10: Komponenten des cDNS-Puffer pro Probe

5x Reaction Buffer (Thermo Scientific, USA)	4 μl
RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Scientific, USA)	1 μl
dNTP-Mix (Thermo Scientific, USA)	2 μl
RevertAid M-MuLV RT (Thermo Scientific, USA)	1 μl

Das Programm der cDNS-Synthese ist wie in Tabelle 11 dargestellt abgelaufen.

Tabelle 11: Programm der cDNS-Synthese

Schritt	Temperatur	Zeit
1	65 °C	5 Minuten
2	4 °C	5 Minuten
3	42 °C	60 Minuten
4	70 °C	5 Minuten
5	4 °C	∞

Nach Beenden des Programms wurden jeweils 180 μl Nuclease-freiem Wasser zu jeder Probe dazugegeben, um eine 1:10 Verdünnung zu erreichen, und die hergestellte cDNS bei -80 °C gelagert.

2.2.4.2 Quantitative real time PCR

Die synthetisierte cDNS, die RNS sowie die Primer wurden auf Eis aufgetaut. Die RNS wurde als Kontrolle mitgeführt, um die Funktion der Reversen Transkription zu überprüfen. Dazu wurden 200 μl RNase freies-Wasser mit 1 μl RNS hergestellt. Anschließend wurde der Master-Mix nach Herstellerangaben (SensiMix SYBR Kit; Meridian Bioscience, USA) vorbereitet, siehe Tabelle 12. In jede Vertiefung einer 96-Well-Platte wurden jeweils 20 μl Master-Mix und 5 μl cDNS oder vorbereitete RNS gegeben. Pro Gruppe wurde jeweils eine Negativkontrolle (NC) mitgeführt. Dazu wurde in jede Vertiefung zu dem Master-Mix anstelle von cDNS 5 μl Nuclease-freiem Wasser hinzugegeben.

Tabelle 12: Einfacher Reaktionsansatz des Master-Mix für RT-qPCR pro Probe

SensiMix SYBR Fluorescein	12,5 µl
Primer forward	0,1 µl
Primer reverse	0,1 µl
PCR-H ₂ O	7,3 µl

Für den Reaktionsablauf wurde das System CFX96 (BioRad) verwendet. Das durchgeführte Programm ist in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Durchgeführtes RT-qPCR-Programm

Zyklus	Temperatur	Zeit (m:s)
1	95 °C	10:00
2	95 °C	00:15
3	60 °C	00:30
4	72 °C	01:00
5	Messung der Fluoreszenz	
Wiederholen der Zyklen 2-5, 40x		
6	65 °C	00:30
7	65 °C ± 0,5 °C/Zyklus	00:05
8	Messung der Fluoreszenz	
Wiederholen der Zyklen 7-8, 60x		
9	4 °C	∞

Mittels Schmelzkurvenanalyse wurde der korrekte Ablauf der RT-qPCR bestimmt. Anhand der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode wurde die jeweilige Veränderung in der Genexpression analysiert.

2.2.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Nachdem lichtmikroskopische Aufnahmen von den Organoiden gemacht wurden, wurden die Organoide aus dem Matrigel herausgelöst. Der *Top Up Feed* wurde zunächst abgenommen und zur Zytokin- und LDH-Messung aufbewahrt. Auf die Organoide wurden 120 µl Cell Recovery Solution pro Vertiefung gegeben und für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die herausgelösten Organoide wurden in einem 2 ml Reaktionsgefäß gesammelt und zentrifugiert (200 x g, 3 Minuten, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und mit 1 ml PBS pro Reaktionsgefäß gewaschen. Die Lösung wurde erneut zentrifugiert und der Überstand entfernt. Pro Reaktionsgefäß wurden 50 µl Lyse Puffer (9 ml Wasser, 1 ml RIPA-Puffer (Cell Signaling Technology, USA), 1 Tablette Phospho-Stop (Roche, Schweiz) und 1 Tablette Complete Mini (Roche, Schweiz)) dazugeben. Die Organoide wurden mittels Minilys lysiert.

Anschließend wurde die BCA (Bicinchoninsäure)-Konzentration mittels Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, USA) bestimmt. Dazu wurden die Proben 1:1 mit bidest. Wasser verdünnt. Es wurden jeweils 10 µl verdünnte Proben und 10 µl Standard auf eine 96-Well F-Boden-Platte gegeben und 200 µl WR-Mix dazu pipettiert. Die Platte wurde für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend die Absorption mit Hilfe eines Mikroplattenlesers bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Nach Bestimmung der BCA-Konzentration der Proben wurde der Proteingehalt angepasst und auf 2 µg/15 µl eingestellt. In jedes Eppendorf-Gefäß wurden 5 µl Roti Load (Carl Roth, Deutschland) dazugegeben und 5 Minuten bei 95 °C erhitzt.

2.2.4.4 Western Blot

Die Puffer und das Gel wurden wie in Tabelle 6 beschrieben angesetzt. Es wurde die Lösung für 12 % Trenngel und 6 ml Sammelgel angesetzt. Die Glasscheiben wurden mit Hilfe einer Klammer zusammengesetzt und das Trenngel wurde zwischen die Scheiben pipettiert. Sobald das Trenngel ausgehärtet war, wurde Isopropanol zwischen die Scheiben pipettiert und wieder verworfen, um eine gleichmäßige Trennlinie zwischen den Gelen zu ermöglichen. Anschließend wurde das Sammelgel dazugegeben und der Kamm hinzugefügt. Nachdem das Sammelgel ausgehärtet war, wurde der Kamm entfernt.

Die Glaskammer mit dem Gel wurde ins Stromgerät eingesetzt und das Gerät wurde mit 1X SDS-PAGE-Laufpuffer, siehe Tabelle 6, gefüllt. Die Kammern wurden zunächst mit dem Laufpuffer gespült und anschließend mit jeweils 20 µl Probe und 5 µl Proteinmarker PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, USA) gefüllt. Die Proben wurden zunächst 15 Minuten bei 80 V laufen gelassen, damit sich eine einheitliche Lauffront bildet. Danach wurden die Proteine bei 100 V 1 Stunde 20 Minuten aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran im Nassblotverfahren übertragen. Das Blotting Sandwich wurde ins Gerät eingesetzt und das Gerät mit 1 X Blotting Puffer, siehe Tabelle 6, gefüllt. Die Übertragung erfolgt bei 300 A für 1 Stunde 45 Minuten. Anschließend wurde die Membran entnommen und drei Mal 5 Minuten mit TBST (Tris-buffered saline mit Tween20) gewaschen.

Zum Blocken unspezifischer Bindestellen wurde die Membran in ein Reaktionsgefäß mit 25 ml 5 % BSA (Rinderserumalbumin; Sigma-Aldrich, USA) in TBS (Tris-buffered saline) gegeben und über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert. Danach wurde erneut drei Mal 5 Minuten mit TBST gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem entsprechenden Primär-Antikörper (in 5 % BSA in TBS verdünnt) in einem Reaktionsgefäß für 2 Stunden bei Raumtemperatur rotierend inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBST wurde die Membran in ein Reaktionsgefäß mit dem Sekundär-Antikörper (in 5 % BSA in TBS verdünnt) gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Rotor inkubiert. Die Antikörper sind in Tabelle 4 aufgelistet. Danach wurde die Membran erneut drei Mal 5

Minuten mit TBST gewaschen und in das Gerät ChemiDoc (BioRad) eingelegt. Auf die Membran wurde der Substrate Mix Pierce ECL Western Blotting (Thermo Scientific, USA) pipettiert und gemessen.

Zum erneuten Beproben der Membran wurde diese zunächst mit TBST gewaschen und die Membran mit Stripping-Puffer Re-Blot Plus Strong Solution 10X (EMD Millipore, USA) (1 ml 10X Stripping Buffer + 9 ml bidest. Wasser) im Reaktionsgefäß für 20 Minuten rotierend inkubiert. Anschließend kann erneut geblockt und weitere Antigene/Proteine detektiert werden.

2.2.4.5 FACS Sorter

Die Organoide wurden für 96 Stunden mit Differenzierungs-Medium (Kontrolle) oder Doxorubicin stimuliert. Danach wurden die Organoide aus dem Matrigel herausgelöst. Es wurden 120 µl Medium abgenommen und 150 µl Cell Recovery Solution pro Vertiefung dazugegeben. Die Platte wurde für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert und anschließend wurden die Organoide in FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting)-Röhrchen gesammelt. Die Röhrchen wurden zentrifugiert (200 x g, 3 Minuten, 4 °C) und der Überstand verworfen. Die Organoide wurden in 1 ml Differenzierungs-Medium resuspendiert. Hieraus wurden 100 µl pro Gruppe in ein neues Röhrchen als ungefärbte Kontrolle überführt. In die Röhrchen mit den Organoiden wurden zu den 900 µl Differenzierungs-Medium 5,4 µl Seneszenz-Farbstoff (aus dem Seneszenz-Kit, ab228562; Abcam, UK) dazugegeben und 1,5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Organoide mit Waschpuffer gewaschen, zentrifugiert und der Überstand entnommen. Die Organoide wurden zur Vereinzelnung in 900 µl TrypLE aufgenommen und in drei Röhrchen aufgeteilt. Die Organoide wurden 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und zwischendurch durch Mischen mit dem Vortexer vereinzelt. Danach wurde das Trypsin mit 2 ml FACS Staining Buffer (BioLegend, USA) verdünnt und zentrifugiert. Es wurden 2 ml Überstand abgesaugt und die Zellen in dem verbleibendem 1 ml resuspendiert. Die Zellen wurden durch ein 70 µm Zellsieb in ein neues Röhrchen überführt und mit 2 ml Staining Buffer durch das Zellsieb aufgefüllt. Die Röhrchen wurden zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden in 500 µl Staining Buffer aufgenommen und im FACS Cell Sorter SH800S (Sony) sortiert. Die sortierten Zellen wurden für die anschließende RNS-Isolation direkt in RA1-Puffer gesammelt.

2.2.5 Immunhistochemie (IHC)

2.2.5.1 Einbettung der Organoide

Nach dem Aufnehmen lichtmikroskopischer Bilder von den Organoiden, wurden die Organoide aus dem Matrigel herausgelöst. Der *Top Up Feed* wurde zunächst abgenommen und zur Zytokin- und LDH-Messung aufbewahrt. Auf die Organoide wurden 120 µl Cell Recovery Solution pro Vertiefung gegeben und für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die herausgelösten Organoide wurden in einem Reaktionsgefäß gesammelt und zentrifugiert (200 x g, 3 Minuten, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und mit 1 ml kaltem PBS gewaschen. Es wurde erneut zentrifugiert und der Überstand entfernt. Anschließend wurden etwa 10 ml 4 % Formaldehyd, siehe Tabelle 6, in das Reaktionsgefäß gegeben und für 30 Minuten bei

Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 3 % Agarose (Carl Roth, Deutschland) in 50 ml PBS gelöst, aufgeköcht und im Inkubator auf 60 °C abgekühlt. Es wurde erneut zentrifugiert und das Formaldehyd verworfen. Es wurden 250 µl Agarose ins Reaktionsgefäß gegeben, resuspendiert und ausgehärtet. Die harte Agarose wurde mittels eines Spatels aus dem Falcon gelöst, geschnitten und anschließend in eine Einbettkassette gelegt. Die eingebetteten Organoide wurden in 4 % Formaldehyd gelagert.

2.2.5.2 Färbungen

2.2.5.2.1 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Die HE-Färbung wurde als Übersichtsfärbung durchgeführt. Dabei wurden die Zellkerne blau und andere Strukturen, wie zum Beispiel das Zytoplasma, rot gefärbt. Nach der Einbettung in Paraffin wurden mit Hilfe eines Mikrotoms histologische Schnitte (2 µm Dicke) des Paraffin-Blocks angefertigt. Die Schnitte wurden auf einen Objektträger aufgebracht. Anschließend wurden die Schnitte in einen Glasbehälter gestellt und über Nacht bei 61 °C in einem Inkubator aufbewahrt, damit das Paraffin flüssig wurde und weitestgehend abtropfen konnte. Das Paraffin wurde durch eine absteigende Alkoholreihe von den Schnitten entfernt. Diese bestand aus vier Xylol-Schritten, drei Ethanol 100 %-Schritten, zwei Ethanol 70 %-Schritten und zwei Wasser-Schritten. Das Xylol diente zur Entfernung des Paraffins und das 70 %ige Ethanol zur Rehydrierung. Das Wasser diente zur Entfernung des Ethanols. Der Glasbehälter mit den Schnitten wurde im Xylol jeweils 10 Minuten und im Ethanol sowie im Wasser jeweils 5 Minuten belassen. Mittels TBST wurde die Zellmembran zugänglich gemacht. Danach wurde kurz mit Aqua dest. gespült und die Hämatoxylin-Lösung dazugegeben (6 Minuten). In fließendem Leitungswasser wurde 15 Minuten gebläut. Danach wurde mit Aqua dest. gespült (2 Minuten) und die Eosin G-Lösung für 3 Minuten dazugegeben. Die Slides wurden kurz mit Leitungswasser abgespült, durchliefen eine aufsteigende Alkoholreihe (70-96-100 %) und wurden mit einem Alkohol-basiertem Eindeckmedium eingedeckt. Bilder der eingedeckten Objektträger wurden mit dem Mikroskop und der Software von Olympus BX51 (cellSens Dimension 1.5) aufgenommen.

2.2.5.2.2 Immunhistochemische Färbung

Nach der Einbettung in Paraffin wurden mit Hilfe eines Mikrotoms histologische Schnitte (2 µm Dicke) des Paraffin-Blocks angefertigt. Die Schnitte wurden auf einen Objektträger aufgebracht. Die auf den Objektträger aufgebrachten Paraffin-Schnitte wurden in einen Glasbehälter gestellt und über Nacht bei 61 °C in einem Inkubator aufbewahrt, damit das Paraffin flüssig wurde. Die Schnitte im Glasbehälter durchliefen eine absteigende Alkoholreihe, welche aus vier Xylol-Schritten, drei Ethanol 100 %-Schritten, zwei Ethanol 70 %-Schritten und zwei Wasser-Schritten bestand. Das Xylol diente zur Entfernung des Paraffins und das 70 %ige Ethanol zur Rehydrierung. Das Wasser diente zur Entfernung des Ethanols. Der Glasbehälter mit den Schnitten wurde im Xylol jeweils 10 Minuten und im Ethanol sowie im Wasser jeweils 5 Minuten stehen gelassen. Nach der absteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte in einen Glasbehälter mit TBST gestellt und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Die

Objektträger wurden am nächsten Tag zwei bis drei Mal mit PBS gespült und in einen Behälter mit 550 ml 1 %iger EDTA (Ethylendiamintetraacetat)-Lösung gestellt. Die EDTA-Lösung bestand aus 50 ml 10 %igem EDTA und 500 ml Wasser. Die Objektträger wurden in dieser Lösung 45 Minuten bei 95 °C gekocht, um die Epitope zu demaskieren.

Nach der Antigendemaskierung wurden die Schnitte erneut drei Mal mit PBS gespült. In dieser Zeit wurde die Lösung zur Blockierung von unspezifischen Bindungen hergestellt. Dazu wurden 1 g BSA (Sigma-Aldrich, USA) in 50 ml PBS gelöst, sodass eine 2 %ige Lösung entstand, und anschließend sterilfiltriert (Sterile Syringe Filter 0,2 µm). Die Objektträger wurden aus dem Glasbehälter mit PBS herausgenommen und jeweils 200 µl der 2 %igen BSA-Lösung auf die Objektträger pipettiert. Die Proben wurden für 30 Minuten abgedunkelt inkubiert. In dieser Zeit wurde die Primär-Antikörper (AK)-Lösung in einem Reaktionsgefäß hergestellt. Nach 30 Minuten wurden jeweils 150 µl der Primär-AK-Lösung auf die Objektträger pipettiert. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4 °C abgedunkelt inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Objektträger drei Mal in PBS gewaschen. In dieser Zeit wurde die Sekundär-AK-Lösung in einem Reaktionsgefäß hergestellt. Der Sekundär-AK ist ein Peroxidase (HRP)-konjugierter polyklonaler Anti-*Rabbit*-Antikörper. Nach dem Waschen wurden die Objektträger in einen Glasbehälter mit PBS gestellt. Die Objektträger wurden aus dem PBS herausgenommen und jeweils 150 µl der Sekundär-AK-Lösung auf die Objektträger aufgetropft. Dabei waren die Reihenfolge sowie der Zeitabstand zwischen den verschiedenen Objektträgern wichtig, damit jeder Schnitt eine exakt gleiche Reaktionszeit des Chromogenes hatte. Die in der Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 5 aufgelistet. Während der Reaktion wurde die Farbentwicklung des Chromogenes beobachtet, um ein Überfärben zu vermeiden. Nach der individuellen Entwicklungszeit der jeweiligen Primär- und Sekundär-AK-Kombination wurde die Reaktion durch dreifaches Waschen in PBS/TBST abgestoppt. Mit Hilfe des Aquatex Mounting Medium (Sigma-Aldrich, USA) wurden Deckgläser auf den Objektträgern befestigt. Bilder der eingedeckten Objektträger wurden mit dem Mikroskop und der Software von Olympus BX51 (cellSens Dimension 1.5) aufgenommen.

2.2.6 Quantifizierung von Zytokinen

2.2.6.1 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Zur Bestimmung der Zytokinkonzentration von IL-8, IL-6, GDF-15 und Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 (TIMP-2) wurden erhältliche DuoSet ELISA-Systeme (R&D Systems, USA) verwendet und die Konzentration nach Herstellerangaben im Zellüberstand bestimmt. Für die Messung wurden eine spezielle 96-Well-Platte von Brand verwendet, welche speziell für eine hohe Bindungskapazität entwickelt wurde und für die Immobilisierung von IgG optimiert ist. Diese Mikroplatte bietet eine hervorragende Bindung für Moleküle mit gemischten hydrophilen und hydrophoben Bereichen und ist daher die bevorzugte Oberfläche für die meisten Standard-ELISAs und Festphasen-Immunoassays.

Ein Tag zuvor wurde eine 96-Well-ELISA-Platte mit dem entsprechenden Capture Antibody beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am Tag des Versuchs wurde die Platte zunächst mit Waschpuffer, siehe Tabelle 6, drei Mal gewaschen und anschließend getrocknet. Danach wurden 300 µl Block-Puffer (Reagent Diluent, siehe Tabelle 6) pro Vertiefung auf die Platte gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde anschließend drei Mal gewaschen und getrocknet. Danach wurden jeweils 100 µl Standard und Probe pro Vertiefung auf die Platte pipettiert. Die Proben wurden zwei Stunden auf der Platte inkubiert. Die Platte wurde anschließend erneut gewaschen und getrocknet. Die Platte wurde zwei Stunden mit dem entsprechenden Detection Antibody beschichtet und anschließend erneut gewaschen. Danach wurde 100 µl Streptavidin pro Vertiefung in die Platte gegeben und für 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Die Platte wurde erneut gewaschen und getrocknet und 100 µl Substrate Solution (TMB-Solution, EMD Millipore) pro Vertiefung auf die Platte pipettiert. Die Substrate Solution wurde bis zu 20 Minuten im Dunkeln in der Platte inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden in jede Vertiefung 50 µl Stopp Solution (3 M H₂SO₄) gegeben. Die Absorption wurde im Mikroplattenleser bei 450 nm gemessen.

2.2.6.2 Luminex

Es wurde ein Multiplex Zytokin Assay (R&D Systems, Human Magnetic Luminex Assay) durchgeführt, um folgende Zytokin-Konzentrationen zu bestimmen: C-X-C-Motiv-Chemokin-Ligand 1 (CXCL1), Dickkopf-ähnliches Protein 1 (DKK-1), Interleukin-10 (IL-10), Interleukin-17C (IL-17C), Tumornekrosefaktor α (TNF- α), C-X-C-Motiv-Chemokin-Ligand 2 (CXCL2), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-13 (IL-13) und Serinprotease-Inhibitor E1 (Serpin E1).

Zunächst wurde der Standard-Cocktail aus mehreren Calibrator Diluent RD6-52, wie in Tabelle 14 gezeigt, hergestellt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Tabelle 14: Standard-Cocktail zur Luminex Messung

	Lot Nummer	Benötigtes Volumen
Standard C	P295154	0,225 ml
Standard K	P295158	0,225 ml
Standard D	P301239	0,250 ml
Standard A	P303236	0,275 ml
Standard G	P301242	0,250 ml
Standard L	P272403	0,200 ml

Die Proben (Überstände von Zellkultur) wurden in einer anderen Platte vorverdünnt. Dazu wurden 30 µl Probe mit 30 µl oben hergestellten Calibrator Diluent RD6-52 verdünnt. Der Wasch-Puffer wurde hergestellt, indem 20 ml Wash Buffer Concentrate in 480 ml dd-H₂O verdünnt wurden. Der Standard 1

wurde hergestellt, indem 100 µl von jedem Standard-Cocktail sowie 400 µl Calibrator Diluent RD6-52 in Reaktionsgefäß pipettiert wurden. Insgesamt wurden sechs verschiedene Standards benötigt. Dazu wurden fünf weitere Reaktionsgefäße mit 200 µl Calibrator Diluent RD6-52 befüllt und 100 µl aus dem vorherigen Standard dazu pipettiert (aus Standard 1 100µl zu Standard 2, aus Standard 2 100µl zu Standard 3, ...).

Der Mikropartikel Cocktail wurde zunächst zentrifugiert und anschließend gevortext, um die Mikropartikel zu resuspendieren. Für 96 Vertiefungen wurden 500 µl Mikropartikel Cocktail in 5 ml Diluent RD2-1 verdünnt. Die hergestellte Mikropartikel-Lösung wurde vor Licht geschützt und innerhalb von 30 Minuten nach Verdünnung verwendet.

Der Biotin-Antikörper Cocktail wurde zunächst zentrifugiert und anschließend gevortext. Für 96 Vertiefungen wurden 500 µl Biotin-Antikörper Cocktail in 5 ml Diluent RD2-1 verdünnt.

Das Streptavidin-PE wurde zunächst zentrifugiert und anschließend gevortext. Für 96 Vertiefungen wurden 220 µl Streptavidin-PE in 5,35 ml Wasch-Puffer verdünnt. Die Lösung wurde vor Licht geschützt und erst kurz vor Verwendung hergestellt.

Nach der Vorbereitung aller Lösungen und Proben wurden 50 µl des Standards sowie der verdünnten Probe in die einzelnen Vertiefungen der Luminex-Platte gegeben. Die Mikropartikel-Lösung wurde resuspendiert und 50 µl pro Vertiefung pipettiert. Die Platte wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Danach wurde die Platte auf einer Magnetplatte befestigt, 1 Minute gewartet und der Überstand entfernt. Es wurden 100 µl Wasch-Puffer in jede Vertiefung pipettiert, die Platte von der Magnetplatte entfernt und die Platte leicht geschüttelt. Anschließend wurde die Platte wieder auf der Magnetplatte befestigt, eine Minute gewartet und der Überstand entfernt. Diese Waschschriffe wurden drei Mal wiederholt. Anschließend wurden 50 µl der hergestellten Biotin-Antikörper-Lösung in jede Vertiefung pipettiert und die Platte für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Der Waschschriff wurde drei Mal wiederholt. Anschließend wurden 50 µl der hergestellte Streptavidin-PE-Lösung in jede Vertiefung pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Der Waschschriff wurde drei Mal wiederholt. Es wurden 100 µl Wasch-Puffer in jede Vertiefung pipettiert, um die Mikropartikel zu resuspendieren und für zwei Minuten auf einem Schüttler inkubiert. Für die Messung wurde das Luminex MAGPIX System verwendet.

2.2.7 Proteomik-Analyse

Die Proteomik-Messung wurde im Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland (HIPS) in Saarbrücken in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rolf Müller durchgeführt. Es wurde ein Protokoll von Risch et al. [211] verwendet.

Die gesammelten Organoidproben wurden durch Zugabe von 210 μ l 0,4 % SDS (Sodium dodecylsulfate) in PBS und eine Ultraschallbehandlung mit einer Amplitude von 50 % für 20 Sekunden (Bandelin Sonoplus) lysiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (16900 x g, 20 Minuten, Raumtemperatur) und der Überstand wurde für die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Test (Thermo) verwendet. Die Konzentration des Gesamtproteins der Proben wurden auf 100 μ g/200 μ l pro Probe eingestellt. Anschließend wurden die Proteine durch Zugabe von 1 ml eiskaltem Aceton und Inkubation über Nacht bei -20 °C ausgefällt. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (16900 x g, 15 Minuten, 4 °C) und der Überstand verworfen. Die Proben wurden zweimal mit 1 ml eiskaltem Methanol gewaschen. Die Vorbereitung für den Proteinverdau erfolgte durch Resuspension in 200 μ l X-Puffer (siehe Tabelle 6), gefolgt von der Reduktion von Cystein mit 0,8 μ l DTT (Dithiothreitol, 250 mM) für 45 Minuten bei 25 °C, Capping mit 2 μ l IAA (Iodessigsäure, 550 mM) für 30 Minuten bei 25 °C und Zugabe von weiteren 3,2 μ l DTT (250 mM) für 30 Minuten bei 25 °C. Der Proteinverdau wurde durch Zugabe von 600 μ l Ammoniumbicarbonatpuffer (pH = 8,5) und Trypsin (1 μ g) (MS-Qualität, Promega) und Inkubation über Nacht bei 37 °C, 400 U/min Schütteln durchgeführt. Die Verdauung wurde durch Zugabe von 8 μ l Ameisensäure gestoppt. Peptidproben wurden auf SepPak C18-Säulen (Waters) gemäß dem folgenden Protokoll entsalzt. Die Säulen wurden durch Zugabe von 1 ml 100 % und 80 % Acetonitril (ACN) mit 0,5 % FA (Formic Acid) vorbereitet, gefolgt von einer Äquilibration mit 1 ml H₂O + 0,1 % TFA (Trifluoressigsäure), bevor die Proben geladen und drei Mal mit 1 ml 0,1 % TFA und einmal mit 0,5 ml 0,5 % FA gewaschen wurden. Anschließend wurden die Proben durch dreifache Zugabe von 250 μ l 80 % ACN + 0,5 % FA unter leichtem Vakuum in 2 ml LoBind (Eppendorf) eluiert und mit speedVac getrocknet, bevor sie in 1 % FA mit einer Proteomkonzentration von 1 μ g/ μ l gelöst wurden. Die Proben wurden durch eine 0,22 μ m-Membran (Merck Millipore, UFC30GVNB) gefiltert und in QuanRecovery-Autosampler-Fläschchen (Waters) überführt. Die Probenanalyse erfolgte mithilfe eines nanoElute-Nano-Flow-Flüssigkeitschromatographiesystems (Bruker, Deutschland), gekoppelt mit einem timsTOF Pro (Bruker, Deutschland). Die Proben wurden auf die Trap-Säule (Thermo Trap Cartridge 5 mm) geladen und mit 6 μ L 0,1 % FA bei einer Flussrate von 10 μ l/min gewaschen. Die Peptide wurden dann auf die analytische Säule (Aurora Ultimate CSI 25 cm x 75 μ m ID, 1,6 μ m FSC C18, IonOpticks) übertragen und durch eine Gradientelution (Eluent A: H₂O + 0,1 % FA, B: ACN + 0,1 % FA; 0 % bis 3 % in 1 min, 3 % bis 17 % in 57 min, 17 % bis 25 % in 21 min, 25 % bis 34 % in 13 min, 34 % bis 85 % in 1 min, 85 % für 8 min gehalten) mit einer Flussrate von 400 nl/min getrennt. Eine Captive Spray nanoESI-Quelle (Bruker, Deutschland) wurde verwendet, um die Peptide bei 1,5 kV mit 180 °C Trockentemperatur bei 3 l/min Gasfluss zu ionisieren. timsTOF Pro (Bruker, Deutschland) wurde im standardmäßigen dia-PASEF-Langgradientenmodus betrieben, wobei TIMS auf 1/K0 eingestellt war, Start bei 0,6 Vs/cm², Ende bei 1,6 Vs/cm² mit einer Rampen- und Akkumulationszeit von jeweils 100 ms und einer Rampenrate von 9,43 Hz. Der Massenbereich wurde von 100,0 Da bis 1700 Da mit positiver Ionenpolarität eingestellt. Der Dia-PASEF-Massenbereich wurde auf 400,0 Da bis 1201,0 Da mit einem Mobilitätsbereich von 0,60 1/K0 bis 1,43 1/K0 und einer Zykluszeit von 1,80

s eingestellt. Die Kollisionsenergie für 0,60 1/K0 wurde auf 20,00 eV und für 1,6 1/K0 auf 59,00 eV eingestellt. Tuning MIX ESI-TOF (Agilent) wurde zur Kalibrierung von m/z und Mobilität verwendet. Die Daten wurden mit DIA-NN (Version 1.8.1) verarbeitet und Proteine wurden anhand des Uniprot Homo sapiens-Referenzproteoms (Proteom-ID: UP000005640, heruntergeladen am 28.12.2023) identifiziert. Die Einstellungen wurden als Standard verwendet, außer dass der Ladungsbereich der Vorläufer zwischen 2 und 4 lag. C-Carbamidomethylierung wurde als feste Modifikation eingestellt. „-relaxed-prot-inf“ wurde in den zusätzlichen Optionen hinzugefügt, um eine weitere Datenverarbeitung mit der Perseus-Software zu ermöglichen. In Perseus (Version 2.0.11) wurden die Werte in ihren log2-Wert umgewandelt und die Replikate gruppiert. Die Ergebnisse wurden in 2 von 3 in mindestens einer Gruppe nach gültigen Werten gefiltert. Fehlende Werte wurden durch Standardeinstellungen ersetzt und die unterschiedlichen Proteinhäufigkeiten zwischen verschiedenen Bedingungen wurden mit einem zweiseitigen Student-t-Test ausgewertet. Der Cut-off für den $-\log_{10}$ -p-Wert wurde auf 1,3 (p-Wert = 0,05) und die t-Testdifferenz auf $>1,5$ festgelegt. Proteine, die diese Grenzwerte erreichten, wurden im Vergleich zu den Kontrollen als signifikant über- oder unterexprimiert identifiziert.

2.2.8 Einzelzellsequenzierung

2.2.8.1 BD Rhapsody Plattform – Seneszenz

Die Organoide wurden wie oben beschrieben in Matrigel für 21 Tage kultiviert. Nach 21 Tagen wurden die Organoide mit unterschiedlichen Stimuli für 48 bzw. 96 Stunden kultiviert, wie in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Unterschiedliche Stimuli der Organoide für die Einzelzellsequenzierung

	Medium	Zusatz
Kontrolle (10 Vertiefungen)	1,4 ml Differenzierungsmedium 75 µl Matrigel 1,5 µl 1:10-verdünnte Retinsäure (50 nM)	/
Doxorubicin (10 Vertiefungen)	1,4 ml Differenzierungsmedium 75 µl Matrigel 1,5 µl 1:10-verdünnte Retinsäure (50 nM)	+ 15 µl 1:1000-verdünntes Doxorubicin (100 nM) für 96 Stunden
Quercetin (10 Vertiefungen)	1,4 ml Differenzierungsmedium 75 µl Matrigel 1,5 µl 1:10-verdünnte Retinsäure (50 nM)	+ 1,5 µl Quercetin (50 µM) für 48 Stunden
Doxorubicin + Quercetin (10 Vertiefungen)	1,4 ml Differenzierungsmedium 75 µl Matrigel 1,5 µl 1:10-verdünnte Retinsäure (50 nM)	+ 15 µl 1:1000-verdünntes Doxorubicin (100 nM) für 96 Stunden + 1,5 µl (50 µM) Quercetin für 48 Stunden

NTHi (10 Vertiefungen)	1,4 ml Differenzierungsmedium 75 µl Matrigel 1,5 µl 1:10-verdünnte Retinsäure (50 nM)	+ 30 µl hitzeinaktivierte NTHi (OD=1)
PAO1 (10 Vertiefungen)	1,4 ml Differenzierungsmedium 75 µl Matrigel 1,5 µl 1:10-verdünnte Retinsäure (50 nM)	+ 15 µl hitzeinaktivierte PAO1 (OD=1)

Nach der Kultivierung wurden die Organoide mittels Cell Recovery Solution aus dem Matrigel herausgelöst und anschließend in einem Reaktionsgefäß gesammelt.

Die Organoide wurden zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und 300 µl TrypLE dazu pipettiert und bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert, um eine Einzelzelllösung zu erhalten. Mittels Pipettierens und Vortexen wurden die Organoide vereinzelt und anschließend mit 10 ml PBS das TrypLE verdünnt. Die Zellsuspensionen wurden durch ein Zellsieb (40 µm) gefiltert, zweimal in PBS gewaschen, gezählt und hinsichtlich Einzelzelltrennung und Gesamtzellviabilität kritisch bewertet. Die Gesamtzellviabilität sollte über 50 % liegen.

Die Zellen wurden in 200 µl Sample Buffer (BD Biosciences) resuspendiert. Um die Zellen mit Viabilitätsmarkern anzufärben, wurden 1 µl Calcein AM (2 mM, Thermo Fisher Scientific) und 1 µl DRAQ7 (0,3 mM, BD Biosciences) dazugegeben und für 5 Minuten bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Hierbei markiert Calcein AM die lebenden Zellen grün, während DRAQ7 die toten Zellen rot färbt. Calcein (1 mg) wurde vorher in 503 µl DMSO gelöst, um eine Stock-Konzentration von 2 mM zu erreichen. Anschließend wurden 10 µl der Lösung in eine Zählkammer (Incyto, Korea) pipettiert und die Zellen mittels BD Rhapsody System gezählt, wie in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: Zellzahl und Viabilität der Zellen nach Vereinzelung der Organoide

Probe	Zellzahl / μ l	Viabilität (%)
1 – K1	59,74	76,72
2 – D1	29,89	72,59
3 – Q1	93,91	69,53
4 – DQ1	159,79	67,29
5 – N1	127,73	64,15
6 – P1	103,28	68,27
7 – K2	332,74	62,79
8 – D2	259,17	60,37
9 – Q2	220,55	66,00
10 – DQ2	419,32	75,52
11 – N2	470,66	71,02
12 – P2	272,08	68,26

Nach dem Zählen der Zellen wurden 180 μ l der jeweiligen Zellsuspension in die Reaktionsgefäße der Sample Tags pipettiert (Probe 1 zu SampleTag 1, Probe 2 zu SampleTag 2, usw.). Die Lösung wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In diesem Schritt wurden die Zellen mit einem individuellen Barcode-markierten Antikörper (Human Single-Cell Multiplexing Kit oder Mouse Immune Single-Cell Multiplexing Kit) inkubiert.

Um ungebundene Antikörper auszuwaschen, wurden die markierten Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 2 ml FACS Stain Buffer (BioLegend, USA) resuspendiert. Die Lösung wurde für 5 Minuten bei 400 x g zentrifugiert und der Überstand entfernt. Insgesamt wurde dieser Schritt drei Mal wiederholt. Danach wurde das Zellpellet in 130 μ l Sample Buffer (BD Rhapsody Catridge Reagent Kit) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit Calcein AM und DRAQ7 wie zuvor beschrieben gefärbt und erneut mittels Rhapsody System gezählt, wie in Tabelle 17 gezeigt. Nach der Aufreinigung zeigte sich eine gesteigerte Viabilität der Zellen im Vergleich zu Tabelle 16, da die toten Zellen ausgewaschen werden. Auch hier sollte eine Viabilität der Zellen über 50 % vorliegen.

Tabelle 17: Zellzahl und Viabilität der Zellen nach Zugabe der Sample Tags

Probe	Zellzahl/ μl	Viabilität (%)
1	59,74	76,72
2	29,89	72,59
3	35,77	75,88
4	55,84	98,22
5	13,05	88,04
6	4,25	78,98
7	144,69	84,43
8	122,34	87,53
9	58,77	94,93
10	306,81	95,52
11	361,33	91,48
12	133,73	93,81

Mit Hilfe des BD Rhapsody Sample Calculators wurden die Mengen der Zellsuspensionen bestimmt, die für die Sequenzierung notwendig sind. Diese Mengen wurden in einem Reaktionsgefäß vereinigt, sodass ein Gesamtvolumen von 650 μl entstand, siehe Tabelle 18.

Tabelle 18: Benötigte Menge an markierten Zellen sowie Puffer

Probe	Stock Volumen
1	22,5 μl
2	45,0 μl
3	14,3 μl
4	24,1 μl
5	0,0 μl
6	316,5 μl
7	9,3 μl
8	11 μl
9	22,9 μl
10	4,4 μl
11	3,7 μl
12	10,1 μl
Puffer Volumen	166,3 μl

Die Einzelzellanalyse wurde mit dem Kit „Single-Cell Capture and cDNA Synthesis with the BD Rhapsody Single-Cell Analysis System“ sowie „mRNA Whole Transcriptome Analysis (WTA) and Sample Tag Library Preparation Protocol“ gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

Die BD Rhapsody-Kartusche wurde mit 100 % Ethanol vorgefüllt, gefolgt von zwei Waschvorgängen mit Cartridge Wash Buffer 1 und einem Waschvorgang mit Cartridge Wash Buffer 2. Insgesamt wurden aus der Suspension der vereinigten Zellen etwa 30.000 markierte Zellen geladen und 15 Minuten bei Raumtemperatur in der Kartusche inkubiert. Überschüssige Flüssigkeit wurde entfernt, die Kartusche mit Cell Capture Beads geladen und 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssige Beads wurden mit Probenpuffer abgewaschen. Zum Freisetzen der RNS wurde im Anschluss Lysepuffer in die Kartusche zu den Zellen pipettiert. Nach der Zellyse konnten die Beads magnetisch mit dem BD Rhapsody Express-Gerät aus der Kartusche extrahiert und zweimal mit kaltem Bead Wash Buffer gewaschen werden. Der cDNS-Reaktionsmix wurde gemäß Herstellerprotokoll hergestellt und mit den aus der Kartusche gespülten Beads gemischt. Zur cDNS-Synthese wurde die Mischung 20 Minuten lang in einem Thermomixer bei 37 °C und 1.200 U/min inkubiert. Der Überstand wurde entfernt und durch den gemäß Herstellerprotokoll hergestellten Exonuklease-I-Mix ersetzt. Die Bead-Suspension wurde 30 Minuten lang im Thermomixer bei 37 °C und 1200 U/min inkubiert, anschließend 20 Minuten lang bei 80 °C ohne Schütteln. Anschließend wurde die Suspension kurz auf Eis gestellt und der Überstand entfernt. Der Exonuklease-I-Mix dient dazu, nicht-gebundene oder überschüssige Oligonukleotide enzymatisch zu entfernen. Anschließend wurden die Beads in Bead-Resuspensionspuffer resuspendiert. Einzelzell-cDNS- und Multiplex-Proben-Tag-Bibliotheken wurden mit dem WTA Amplification Kit gemäß den Empfehlungen des Herstellers hergestellt. Der Bead-Resuspensionspuffer wurde entfernt, die Beads in Elutionspuffer resuspendiert und 5 Minuten lang ohne Schütteln auf einem Heizblock bei 95 °C inkubiert. Das Röhrchen wurde kurz zentrifugiert und der Überstand als Proben-Tag-Produkt aufbewahrt. Der Random Primermix wurde gemäß Herstellerprotokoll hergestellt, mit den Beads vermischt und anschließend unter folgenden Bedingungen inkubiert, siehe Tabelle 19. Der Random-Primer-Mix wird eingesetzt, um eine vollständige, doppelsträngige cDNS zu erzeugen.

Tabelle 19: Inkubation des Random Primermix mit den Beads

Zeit	Temperatur	Schüttelfrequenz
5 Minuten	95 °C	-
5 Minuten	37 °C	1200 U/min
5 Minuten	25 °C	1200 U/min

Der Extensionsenzymmix wurde gemäß Herstellerprotokoll hergestellt, zu den Beads gegeben und anschließend im Thermomixer wie in Tabelle 20 aufgelistet inkubiert. Der Extensionsenzymmix vervollständigt und stabilisiert die cDNS nach der reversen Transkription, bevor überschüssige Primer durch Exonuklease I entfernt werden. Es sorgt dafür, dass nur korrekt synthetisierte, Bead-gebundene cDNS-Moleküle in die nachfolgenden Amplifikations- und Library-Schritte eingehen.

Tabelle 20: Inkubation des Extensionsenzymmix mit den Beads

Zeit	Temperatur	Schüttelfrequenz
10 Minuten	25 °C	1200 U/min
15 Minuten	37 °C	1200 U/min
10 Minuten	45 °C	1200 U/min
10 Minuten	55 °C	1200 U/min

Der Primer- und Enzymmix wurde durch Elutionspuffer ausgewaschen und 5 Minuten auf einem Heizblock ohne Schütteln bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden die Beads 10 Sekunden bei 1200 U/min im Thermomixer resuspendiert. Der Überstand wurde als Random-Primer-Extension-Produkt (RPE-Produkt) zurückgehalten und mit AMPure XP-Magnetbeads gereinigt. Das gereinigte Produkt wurde durch die Sample Tag PCR1 (Tabelle 21) weiter amplifiziert und anschließend mit AMPure XP-Beads gereinigt, wodurch das gereinigte RPE-Produkt entstand.

Tabelle 21: Sample Tag PCR1

Zyklus	Temperatur	Zeit (m:s)
1	95 °C	03:00
2	95 °C	00:30
3	60 °C	03:00
4	72 °C	01:00
Wiederholen der Zyklen 2-4, 10x		
5	72 °C	05:00
6	4 °C	∞

Das gereinigte RPE-Produkt wurde durch die RPE-PCR (Tabelle 22) weiter amplifiziert und anschließend mit AMPure XP-Beads gereinigt, wodurch das RPE-PCR-Produkt entstand.

Tabelle 22: RPE-PCR

Zyklus	Temperatur	Zeit (m:s)
1	95 °C	03:00
2	95 °C	00:30
3	60 °C	01:00
4	72 °C	01:00
Wiederholen der Zyklen 2-4, 11x		
5	72 °C	02:00
6	4 °C	∞

Die Konzentration des RPE-PCR-Produkts wurde mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer und dem High Sensitivity DNA Kit bestimmt. Das RPE-PCR-Produkt wurde mit Elutionspuffer verdünnt, um im Histogramm eine Konzentration von 2 nM der entstandenen Produkte zwischen 150–600 bp zu erreichen.

Anschließend wurde es mit der finalen WTA-Index-PCR (Tabelle 23) amplifiziert und anschließend mit AMPure XP-Beads gereinigt.

Tabelle 23: WTA-Index-PCR

Zyklus	Temperatur	Zeit (m:s)
1	95 °C	03:00
2	95 °C	00:30
3	60 °C	00:30
4	72 °C	00:30
Wiederholen der Zyklen 2-4, 7x		
5	72 °C	01:00
6	4 °C	∞

Der Sample Tag PCR1-Reaktionsmix für die Probenmarkierung wurde gemäß Herstellerprotokoll hergestellt und mit dem Produkt gemischt. Das Produkt wurde im Thermocycler mittels der Sample Tag PCR2 (Tabelle 24) amplifiziert und anschließend mit AMPure XP-Beads gereinigt.

Tabelle 24: Sample Tag PCR2

Zyklus	Temperatur	Zeit (m:s)
1	95 °C	03:00
2	95 °C	00:30
3	66 °C	00:30
4	72 °C	01:00
Wiederholen der Zyklen 2-4, 9x		
5	72 °C	05:00
6	4 °C	∞

Das resultierende Proben-Tag-PCR2-Produkt wurde mit der finalen Sample Tag-Index-PCR (Tabelle 25) amplifiziert, gefolgt von einer Reinigung.

Tabelle 25: Finale Sample Tag-Index-PCR

Zyklus	Temperatur	Zeit (m:s)
1	95 °C	03:00
2	95 °C	00:30
3	60 °C	00:30
4	72 °C	00:30
Wiederholen der Zyklen 2-4, 5x		
5	72 °C	01:00
6	4 °C	∞

Die Konzentrationen der WTA- und Proben-Tag-Index-PCR-Produkte wurden mit dem Qubit Fluorometer und dem „Qubit dsDNA HS Kit“ bestimmt. Die Qualitätskontrolle erfolgte mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer und dem „High Sensitivity DNA Kit“.

Zur Messung der Konzentration im Qubit wurde Qubit Reagent 1:200 in Qubit Buffer verdünnt, um eine Working Solution herzustellen. Für die Standardkurve wurde 190 µl Working Solution und 10 µl Standard in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Zur Messung der Proben wurde 198 µl Working Solution und 2 µl Probe in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Die Lösung wurde für 2 Minuten bei RT inkubiert und anschließend im Qubit Flex Fluorometer gemessen. Mit dem Qubit wurden folgende Konzentrationen gemessen: „WTA Index PCR“ 9,75 ng/µl. Die Bioanalyzer-Kontrolle zeigte einen breiten Peak von ~250 bis 1.000 bp.

Die Konzentration der Probe „Purified Sample Tag PCR2 Product“ wurde mittels Qubit „dsDNA HS Kit“ bestimmt. Es wurde eine Konzentration von 25,5 ng/µl gemessen. Da eine Konzentration von 0,1-1,1 ng/µl benötigt wird, wurde die Probe 1:25,5 mit Elution Buffer verdünnt.

Die Bibliotheken wurden auf der Novaseq 6000-Plattform mit 35.000 Reads pro Zelle sequenziert.

Die erhaltenen FASTQ-Reads wurden mit der BD Rhapsody™ WTA Analysis Pipeline auf der Sevenbridges-Plattform verarbeitet. Die Reads wurden gegen das menschliche GRCh38-Referenzgenom abgeglichen. Die generierten Daten wurden zur weiteren bioinformatischen Analyse mit dem Seurat 4.0 R-Paket prozessiert. Multipletts wurden ausgeschlossen sowie wie Zellen mit <1000 nachgewiesenen Genen und >50 % mitochondrialen Genen. Der gefilterte Datensatz wurde mithilfe der Seurat-Funktionen `NormalizeData` (Skalierungsfaktor 10.000) und `ScaleData` normalisiert und skaliert.

Zellcluster wurden mithilfe eines auf *shared nearest neighbors* (SNN) basierenden Algorithmus identifiziert (die Auflösung wurde auf 0,3 eingestellt). Eine nichtlineare Dimensionsreduktion wurde durchgeführt, um *Uniform Manifold Approximation and Projection* (UMAP)-Diagramme, wie dargestellt, zu erzeugen. Clusterspezifische Genmarker wurden mithilfe von Seurats Funktionen `FindMarker` und `FindAllMarkers` identifiziert. Cluster wurden mithilfe bekannter Markergene für die spezifischen Zelltypen annotiert.

Die Transkriptionsfaktor-Regulon-Analyse wurde mit der Python-Implementierung von SCENIC pySCENIC (Version 0.12.0, <https://github.com/aertslab/pySCENIC>) basierend auf CPM-normalisierten Zählungen qualitätsgefilterter Einzelzellen durchgeführt. Die Gen-Regulationsnetzwerke wurden mit pySCENIC berechnet, und die identifizierten Transkriptionsfaktor-Motive wurden mit pySCENIC anhand der Datenbanken `hg38_refseq-r80_10kb_up_and_down_tss.mc9nr.genes_vs_motifs.rankings.feather` und `hg38_refseq-r80_500bp_up_and_100bp_down_tss.mc9nr.genes_vs_motifs.rankings.feather` überprüft. Anschließend wurde pycenic AUCell verwendet, um Regulon-Aktivitätswerte zu erhalten, die mit scanpy (Version 1.9.1) visualisiert wurden.

Für die Pathway-Anreicherungsanalyse wurde Seurats `DEenrichRplot`-Befehl ausgeführt. Die `enrich.database` wurde auf „KEGG_2019_Human“ (max. genes 2000) eingestellt. Die Spleißkinetik wurde mit `velocity` (Version 0.17.17) berechnet und die RNS-Geschwindigkeit wurde mit `scvelo` (Version 0.2.4) modelliert, wobei ein stochastisches Modell mit einem distanzbasierten KNN-Diagramm mit Standardparametern angewendet wurde.

2.2.8.2 10X Genomics – IL-13

Die Apikal-Out-Organoiden wurden über den Zeitraum von jeweils 7 und 14 Tagen mit IL-13 (40 ng/ml) und hitze-inaktivierten non-typable *Haemophilus influenzae* (NTHi; 1:50, OD=1) stimuliert.

Nach 7 und 14 Tagen wurden die Organoiden in einem Falcon gesammelt. Die Organoiden wurden zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und 500 µl TrypLE dazu pipettiert und bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert, um die Organoiden in Einzelzellen aufzulösen. Mittels Pipettierens und Vortexen wurden die Zellen vereinzelt und anschließend mit 10 ml PBS das TrypLE verdünnt. Es wurde erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS + 0,04 % BSA aufgenommen. Die Zellen wurden bei 300 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets in zugeordneten 100 µl Multiplexing Oligo aufgenommen und resuspendiert und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Zellen mit Multiplexing Oligo wurden in 1,9 ml Wash & Resuspension Buffer (PBS + 1 % BSA) verdünnt und resuspendiert. Um ungebundene Oligos zu entfernen wurden die Zellen bei 300 x g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2 ml Wash & Resuspension Buffer resuspendiert. Der Waschschrift wurde erneut wiederholt, sodass die Zellen insgesamt 3 Mal mit Wash & Resuspension Buffer gewaschen wurden. Anschließend wurden die Zellen in 200 µl Wash & Resuspension Buffer für die Zellzählung aufgenommen. Die Zellzählung wurde an LUNA-FL™ Dual Fluorescence Cell Counter (Logos Biosystems, USA) durchgeführt. Zur Zellzählung wurde Propidium Iodid für eine Lebend-Tot-Färbung verwendet. Tabelle 26 zeigt die Ergebnisse der Zellzählung je Probe.

Die Zellsuspensionen wurden durch ein Zellsieb (40 µm) gefiltert, zweimal in PBS gewaschen, gezählt und hinsichtlich Einzelzelltrennung und Gesamtzelllebensfähigkeit kritisch bewertet. Die Zellviabilität sollte zwischen 80 und 90 % liegen.

Tabelle 26: Zellzahl pro Probe im 10X Single Cell Experiment (IL-13)

Probe	Zellzahl/ μ l
1	369
2	423
3	323
4	156
5	280
6	323
7	176
8	434
9	147
10	162
11	300
12	185

Die Zellen wurden vereinigt, sodass pro verwendete Spur auf dem 10X Chromium Chip eine zu erwartende Cell Recovery von ca. 15.000 Zellen erreicht wurde (Tabelle 27-29).

Es wurden zwei verschiedene Spuren verwendet. Dazu wurden Probe 1 bis 6 in Spur 1 vereinigt, Tabelle 27, und Probe 7 bis 12 in Spur 2 zusammengeführt, siehe Tabelle 28.

Tabelle 27: Menge (μ l) pro Probe in Spur 1

Probe	μ l
1	67,1
2	58,5
3	76,6
4	158,7
5	88,3
6	76,6

Tabelle 28: Menge (μl) pro Probe in Spur 2

Probe	μl
7	140,6
8	57,8
9	168,4
10	152,8
11	82,5
12	133,8

Tabelle 29: Verwendete Cell Recovery und geladene Zellzahl zum 10X Single Cell Experiment

Erwartende Cell Recovery	15,000
Anzahl der zu ladenden Zellen	24,750
Gesamtzahl der zu poolenden Zellen (mit 3-facher Reserve)	74,250
Pool-Verhältnis	$1/3=0,3333$
Zellkonzentration Spur 1	369 Zellen/ μl
Probenvolumen Spur 1	$\frac{(74,250 \cdot 0,3333)}{369} = 67,1 \mu\text{l}$

Nachdem die sechs Proben pro Spur vereinigt worden waren, erfolgte eine erneute Zellzählung mittels Luna-Fluoreszenz, und zur Sicherstellung einer ausreichenden Zellzahl wurde Medium entnommen, sodass anschließend folgende Zellzahl pro Lane für den Chip verwendet wurden (Tabelle 30).

Tabelle 30: Zellzahl pro Spur, die auf den Chip geladen wird

Spur	Zellzahl/ml
1	$1,05 \cdot 10^6$
2	$9,34 \cdot 10^5$

Es wurde eine Zellkonzentration von 1000 Zellen/ μl und eine erwartende Cell Recovery von 15.000 gewählt.

Die Einzelzellanalyse wurde mit dem Kit „Chromium Next GEM Single Cell 3‘ Reagent Kits v3.1 (Dual Index) with Feature Barcode technology for Cell Multiplexing“ gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

Die markierten Zellen wurden in eine Chromium Next GEM Chip-Kassette überführt und gemeinsam mit den Gel Beads, Puffern und Ölphasen in den Chromium Controller geladen. Innerhalb des Mikrofluidiksystems erfolgte die Bildung von Gel Bead-in-Emulsions (GEMs), in denen idealerweise jeweils eine Einzelzelle und ein Gel Bead eingeschlossen wurden. Nach der Zellyse innerhalb der GEMs banden die freigesetzten polyadenylierten mRNS an die Oligonukleotide der Gel Beads, die jeweils einen spezifischen Zellbarcode, einen Unique Molecular Identifier (UMI) sowie eine poly-dT-Sequenz tragen. In dieser Phase wurden zusätzlich die Feature-Barcodes für das Multiplexing erfasst.

Die anschließende GEM-RT Inkubation, siehe Tabelle 31, generierte barcodierte cDNS, die nach Aufbrechen der Emulsionen mittels Recovery Agent und Dynabeads MyOne Silane (10X Genomics, USA) gereinigt und mittels PCR (Tabelle 32) amplifiziert wurde. Die cDNS wurde mittels SPRIselect (Beckman Coulter, USA) aufgereinigt.

Tabelle 31: GEM-RT Inkubation (IL-13)

Zyklus	Temperatur	Zeit (m:s)
1	53 °C	45:00
2	85 °C	05:00
3	4 °C	∞

Tabelle 32: cDNS-Amplifikation mittels PCR (IL-13)

Zyklus	Temperatur	Zeit (m:s)
1	98 °C	03:00
2	98 °C	00:15
3	63 °C	00:20
4	72 °C	01:00
Wiederholen der Zyklen 2-4, 10x		
5	72 °C	01:00
6	4 °C	∞

Die weitere Bibliothekspräparation umfasste die Fragmentierung der cDNS (Tabelle 33), Endreparatur, A-Tailing. Das Produkt wurde anschließend erneut mittels SPRIselect aufgereinigt. Es folgte die Ligation der Sequenzieradapter (Tabelle 34) sowie eine abschließende Index-PCR, durch die Dual-Indizes in die Bibliotheken integriert wurden (Tabelle 35). Das Produkt wurde anschließend erneut mittels SPRIselect aufgereinigt.

Tabelle 33: Fragmentierung der cDNS, Endreparatur und A-Tailing (IL-13)

Zyklus	Temperatur	Zeit (m:s)
1	4 °C (Pre-cool block)	∞
2	32 °C	05:00
3	65 °C	30:00
4	4 °C	∞

Tabelle 34: Ligation der Sequenzieradapter (IL-13)

Zyklus	Temperatur	Zeit (m:s)
1	20 °C	15:00
2	4 °C	∞

Tabelle 35: Index-PCR (IL-13)

Zyklus	Temperatur	Zeit (m:s)
1	98 °C	00:45
2	98 °C	00:20
3	54 °C	00:30
4	72 °C	00:20
Wiederholen der Zyklen 2-4, 13x		
5	72 °C	01:00
6	4 °C	∞

Es wurde mit Hilfe des Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies, USA) die Qualität der Probe kontrolliert. Die Bioanalyzer-Kontrolle zeigte einen breiten Peak von ~200 bis 1.000 bp. Mittels Bioanalyzer-Messung konnte auch die Konzentration der Probe zwischen 3000 und 4000 pg/μl bestimmt werden. Die Probe wurde bis zur Sequenzierung bei -20 °C eingefroren.

Die Einzelzellsequenzierung erfolgte mit der 10X Genomics-Plattform. Bibliotheken wurden mit Chromium RNA Profiling Reagent Kits for Multiplexed Samples (10X Genomics, Flex Gene Expression) erstellt. Die Bibliotheken wurden auf der DNBSEQ-G400-Plattform mit 30.000 Reads pro Zelle sequenziert. Die Rohsequenzierungs-Reads wurden mit der CellRanger-Plattform (10x) verarbeitet. Die Datenanalyse erfolgte mit dem Seurat-Paket (Version 5.0.1) in R (Version 4.3.1). Die Sequenzdateien wurden auf die Referenz des menschlichen Genoms (GRCh38) gemappt. Zellen geringer Qualität wurden aufgrund von Genexpression-Schwellenwerten (< 2.000 oder > 10.000 Gene) und wenn die mitochondrialen Reads 15 % der Gesamt-Reads pro Zelle überstiegen, ausgeschlossen.

Der verbleibende Datensatz wurde mit Seurats *Normalize Data*-Funktion (Skalierungsfaktor: 10.000) normalisiert und mit der *ScaleData*-Funktion unter Standardeinstellungen skaliert. Zellcluster wurden mithilfe eines *Shared Nearest Neighbours* (SNN)-basierten Algorithmus mit einer Auflösung von 0,3 identifiziert. UMAP wurde zur nichtlinearen Dimensionsreduktion und Visualisierung eingesetzt. Die Pathway-Aktivitätsanalyse wurde mit dem AUCell-Paket (Version 1.24.0) in R durchgeführt. Für die Pathway-Anreicherungsanalyse wurde Seurat's *DEenrichRplot*-Befehl verwendet. Die Anreicherungsdatenbank wurde auf „GO_Cellular_Component_2023“ eingestellt (max. Gene 5000).

2.2.8.3 10X Genomics – NTHi

Die Apikal-Out-Organoiden wurden jeweils 8 Tage, 96 Stunden und 48 Stunden mit hitze-inaktivierten NTHi (1:50) stimuliert. Über den Kultivierungszeitraum wurden lichtmikroskopische Aufnahmen der Organoiden gemacht.

Nach 8 Tagen, 96 Stunden und 48 Stunden wurden die Organoiden in einem Falcon gesammelt. Die Organoiden wurden zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und 500 µl TrypLE dazu pipettiert und bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert, um die Organoiden in Einzelzellen aufzulösen. Mittels Pipettierens und Vortexen wurden die Zellen vereinzelt und anschließend mit 10 ml PBS das TrypLE verdünnt. Es wurde erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS aufgenommen und die Zellen wurden mittels Neubauer Zählkammer gezählt (Tabelle 36).

Tabelle 36: Zellzahl pro Probe im 10X Single Cell Experiment (NTHi)

Probe	Zellzahl/µl
1 – B98, 8 Tage, Kontrolle	175
2 – B98, 8 Tage, NTHi	145
3 – B99, 8 Tage, Kontrolle	177,5
4 - B99, 8 Tage, NTHi	112,5
5 - B98, 96h, Kontrolle	327,5
6 - B98, 96h, NTHi	370
7 - B99, 96h, Kontrolle	455
8 - B99, 96h, NTHi	465
9 - B98, 48h, Kontrolle	422,5
10 - B98, 48h, NTHi	425
11 - B99, 48h, Kontrolle	537,5
12 - B99, 48h, NTHi	330

Anschließend wurden die Zellen, wie in Tabelle 37 gezeigt, pro Spur gepoolt und erneut gezählt.

Tabelle 37: Zellzahl nach Poolen der Gruppen

Lane	Gruppe	Zellzahl/ μ l
1 – 8T Kontrolle	B98, 8 Tage, Kontrolle + B99, 8 Tage, Kontrolle	370
2 – 8T NTHi	B98, 8 Tage, NTHi + B99, 8 Tage, NTHi	287
3 – 96h Kontrolle	B98, 96h, Kontrolle + B99, 96h, Kontrolle	390
4 – 96h NTHi	B98, 96h, NTHi + B99, 96h, NTHi	340
5 – 48h Kontrolle	B98, 48h, Kontrolle + B99, 48h, Kontrolle	342
6 – 48h NTHi	B98, 48h, NTHi + B99, 48h, NTHi	262

Es wurde eine Zellkonzentration von 300 Zellen/ μ l und eine erwartende Cell Recovery von 7.000 gewählt.

Die Einzelzellanalyse wurde mit dem Kit „Chromium Next GEM Single Cell 3' Reagent Kits v3.1 (Dual Index)“ gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

Die markierten Zellen wurden in eine Chromium Next GEM Chip-Kassette überführt und gemeinsam mit den Gel Beads, Puffern und Ölphasen in den Chromium Controller geladen. Innerhalb des Mikrofluidiksystems erfolgte die Bildung von GEMs, in denen idealerweise jeweils eine Einzelzelle und ein Gel Bead eingeschlossen wurden. Nach der Zelllyse innerhalb der GEMs banden die freigesetzten polyadenylierten mRNS an die Oligonukleotide der Gel Beads, die jeweils einen spezifischen Zellbarcode, einen UMI sowie eine poly-dT-Sequenz tragen. In dieser Phase wurden zusätzlich die Feature-Barcodes für das Multiplexing erfasst.

Die anschließende GEM-RT Inkubation, siehe Tabelle 38, generierte barcodierte cDNS, die nach Aufbrechen der Emulsionen mittels Recovery Agent und Dynabeads MyOne Silane (10X Genomics, USA) gereinigt und mittels PCR (Tabelle 39) amplifiziert wurde. Die cDNS wurde mittels SPRIselect (Beckman Coulter, USA) aufgereinigt.

Tabelle 38: GEM-RT Inkubation (NTHi)

Zyklus	Temperatur	Zeit (m:s)
1	53 °C	45:00
2	85 °C	05:00
3	4 °C	∞

Tabelle 39: cDNS-Amplifikation mittels PCR (NTHi)

Zyklus	Temperatur	Zeit (m:s)
1	98 °C	03:00
2	98 °C	00:15
3	63 °C	00:20
4	72 °C	01:00
Wiederholen der Zyklen 2-4, 10x		
5	72 °C	01:00
6	4 °C	∞

Die weitere Bibliothekspräparation umfasste die Fragmentierung der cDNS (Tabelle 40), Endreparatur, A-Tailing. Das Produkt wurde anschließend erneut mittels SPRIselect aufgereinigt. Es folgte die Ligation der Sequenzieradapter (Tabelle 41) sowie eine abschließende Index-PCR, durch die Dual-Indizes in die Bibliotheken integriert wurden (Tabelle 42). Das Produkt wurde anschließend erneut mittels SPRIselect aufgereinigt.

Tabelle 40: Fragmentierung der cDNS, Endreparatur und A-Tailing (NTHi)

Zyklus	Temperatur	Zeit (m:s)
1	4 °C (Pre-cool block)	∞
2	32 °C	05:00
3	65 °C	30:00
4	4 °C	∞

Tabelle 41: Ligation der Sequenzieradapter (NTHi)

Zyklus	Temperatur	Zeit (m:s)
1	20 °C	15:00
2	4 °C	∞

Tabelle 42: Index-PCR (NTHi)

Zyklus	Temperatur	Zeit (m:s)
1	98 °C	00:45
2	98 °C	00:20
3	54 °C	00:30
4	72 °C	00:20
Wiederholen der Zyklen 2-4, 13x		
5	72 °C	01:00
6	4 °C	∞

Es wurde mit Hilfe des Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies, USA) die Qualität der Probe kontrolliert. Die Bioanalyzer-Kontrolle zeigte einen breiten Peak von ~200 bis 1.000 bp. Mittels Bioanalyzer-Messung konnte auch die Konzentration der Probe zwischen 3000 und 4000 pg/μl bestimmt werden. Die Probe wurde bis zur Sequenzierung bei -20 °C eingefroren.

Die Einzelzellsequenzierung erfolgte mit der 10X Genomics-Plattform. Bibliotheken wurden mit Chromium RNA Profiling Reagent Kits for Multiplexed Samples (10X Genomics, Flex Gene Expression) erstellt. Die Bibliotheken wurden auf der DNBSEQ-G400-Plattform mit 30.000 Reads pro Zelle sequenziert. Die Rohsequenzierungs-Reads wurden mit der CellRanger-Plattform (10x) verarbeitet. Die Datenanalyse erfolgte mit dem Seurat-Paket (Version 5.0.1) in R (Version 4.3.1). Die Sequenzdateien wurden auf die Referenz des menschlichen Genoms (GRCh38) gemappt. Zellen geringer Qualität wurden aufgrund von Genexpression-Schwellenwerten (< 2.000 oder > 10.000 Gene) und wenn die mitochondrialen Reads 15 % der Gesamt-Reads pro Zelle überstiegen, ausgeschlossen. Der verbleibende Datensatz wurde mit Seurats *Normalize Data*-Funktion (Skalierungsfaktor: 10.000) normalisiert und mit der *ScaleData*-Funktion unter Standardeinstellungen skaliert. Zellcluster wurden mithilfe eines *Shared Nearest Neighbours* (SNN)-basierten Algorithmus mit einer Auflösung von 0,3 identifiziert. UMAP wurde zur nichtlinearen Dimensionsreduktion und Visualisierung eingesetzt. Die Pathway-Aktivitätsanalyse wurde mit dem AUCell-Paket (Version 1.24.0) in R durchgeführt. Für die Pathway-Anreicherungsanalyse wurde Seurat's *DEenrichRplot*-Befehl verwendet. Die Anreicherungsdatenbank wurde auf „GO_Cellular_Component_2023“ eingestellt (max. Gene 5000).

2.2.9 Statistische Analysen

Die statistische Analyse der Daten wurde mittels dem Programm GraphPad Prism 9.3.1 (San Diego, USA) durchgeführt.

Mittels Shapiro-Wilk-Test wurde die Normalverteilung der Daten geprüft. Bei einer Normalverteilung wurden Vergleiche zwischen zwei Gruppen mit dem Student-t-Test durchgeführt. Waren die Daten nicht normal verteilt, wurde zur Analyse der Mann-Whitney-Test verwendet. Bei mehr als zwei Gruppen wurde der parametrische two-way ANOVA mit Bonferroni durchgeführt. Die Ergebnisse wurden für $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen. Einzelheiten über die verwendeten statistischen Tests, Signifikanzen sowie n-Zahlen sind in den jeweiligen Abbildungsbeschriftungen aufgeführt.

Zusammensetzungsänderungen in den Anteilen einzelner Zellcluster in der Einzelzellanalyse wurden mithilfe eines in scCODA implementierten Bayes'schen Modells berechnet, das die geringe Anzahl von Replikaten ($n = 2$) verarbeiten kann. Die Analyse wurde gemäß den scCODA-Richtlinien durchgeführt. Der Grenzwert für die Falscherkennungsrate für die Auswahl glaubwürdiger Effekte basierend auf ihren Einschlusswahrscheinlichkeiten wurde auf 0,4 festgelegt. Um die Robustheit dieses Ansatzes sicherzustellen und falsch positive Effekte auszuschließen, wurde die Analyse unabhängig voneinander zehnmal wiederholt. Nur diejenigen Zusammensetzungsänderungen, die in 10 von 10 Durchläufen als glaubwürdige Auswirkung im Bayes'schen Rahmen erkannt wurden, wurden als signifikant gemeldet.

3. Ergebnisse

3.1 Identifikation seneszenzartiger Zellen in Lungenorganoiden

3.1.1 Behandlung mit Dox und Senolytika bewirkt keine Veränderung der Seneszenz in 2D-Basalzellen

Der Topoisomerase-II-Inhibitor Dox wird häufig zur Induktion der zellulären Seneszenz eingesetzt [119], wohingegen die pharmazeutischen Verbindungen Quer, ein pflanzliches Flavonoid-Naturprodukt, und Das, ein synthetischer Proteinkinase-Inhibitor, nachweislich die Seneszenz in verschiedenen präklinischen Modellen reduzieren [213,285].

Um die Wirkung von Dox, Quer und Das auf die SA- β -Gal-Aktivität zu beurteilen, wurden in 2D-kultivierte Basalzellen mit den Substanzen stimuliert. SA- β -Gal ist ein Marker für zelluläre Seneszenz [213]. Die Basalzellen, die unter herkömmlichen Bedingungen kultiviert wurden, wurden 48 Stunden lang mit Dox, Quer oder Das sowie mit der Kombination von Dox mit Quer oder Das behandelt. Die Behandlung mit Dox steigerte die SA- β -Gal-Aktivität in Basalzellen nicht signifikant, wohingegen Quer die SA- β -Gal-Aktivität signifikant verringerte, was durch Dox teilweise umgekehrt wurde (Abb. 3A). Dasatinib hatte keinen signifikanten Einfluss auf die SA- β -Gal-Aktivität. Die Anreicherung von LDH in den Überständen unterschied sich zwischen den Behandlungen nicht signifikant (Abb. 3B). Die Behandlung mit den verschiedenen Verbindungen führte zu einer leicht erhöhten Stoffwechselaktivität (Abb. 3C). Die Behandlung mit Quer, jedoch nicht mit Das, führte zu einer deutlich verringerten Freisetzung von GDF-15, einem Seneszenzmarker (Abb. 3D).

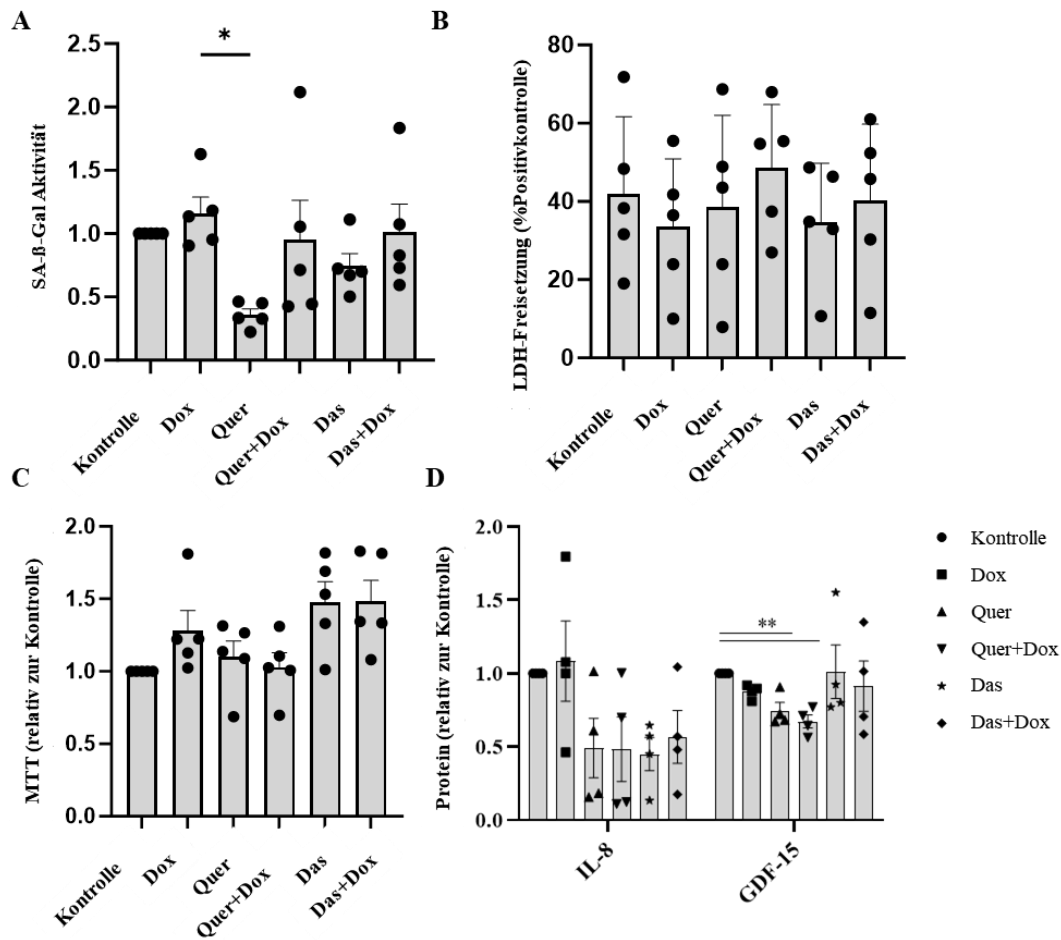


Abb. 3 Seneszenztest mit nicht-differenzierten Basalzellen. (A) SA-β-Gal-Aktivität, (B) Stoffwechselaktivität, (C) Freisetzung von LDH und (D) relative Konzentrationen von GDF-15 und IL-8 in Basazellüberständen nach Behandlung mit Dox, Quer und Das und die Kombination von Dox und Quer oder Das für 48 Stunden. Jeder Datenpunkt stellt ein unabhängiges Experiment dar, bei dem Zellen eines separaten Spenders verwendet werden. Die Daten wurden durch eine einfache ANOVA mit Tukeys Mehrfachvergleichen nach dem Test verglichen und sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. *p<0,05 und **p<0,01

3.1.2 Behandlung mit Dox und Senolytika bewirkt in 3D-Lungenorganoiden ein Anstieg der SA-β-Gal-Aktivität

Zunächst wurde getestet, ob Dox, Quer und Das Seneszenz in unserem Lungenorganoid-Modell beeinflussen. Primäre Basalzellen wurden 21 Tage lang in Matrigel differenziert. Zur Qualitätskontrolle wurde die Bildung von Lumen unter dem Phasenkontrastmikroskop überwacht. In die Experimente wurden nur Kulturen einbezogen, in denen mindestens 35 % der Organoiden ein sichtbares Lumen unter dem Phasenkontrastmikroskop aufwies, was einer durch HE-Färbung nachgewiesenen Lumenbildung von mehr als 90 % entspricht [235]. Nach der Differenzierung der

Organoide über 21 Tage in Matrigel wurden die Organoide 48 Stunden mit Kontrollmedium, Dox, Quer und Das stimuliert. Abbildung 4 zeigt, dass die Organoide auch nach der Behandlung Lumen und Zilien aufweisen.

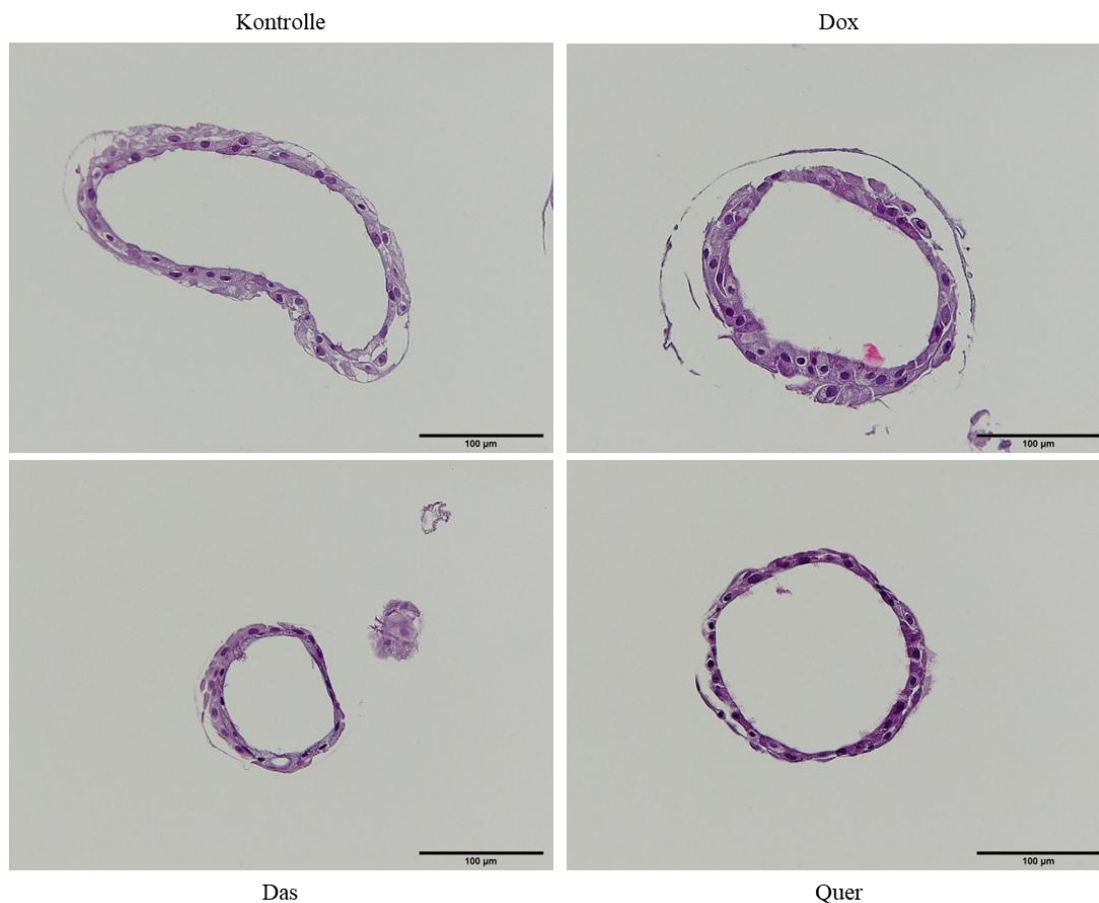


Abb. 4 Repräsentative Histologie eingebetteter Organoiden nach Stimulation (HE-Färbung). Die Organoiden wurden 48 Stunden mit Dox, Das, Quer und Kontrollmedium stimuliert. Maßstab = 100µm.

Die 48-stündige Inkubation der Organoiden mit Dox, Quer und Das führte zu keiner sichtbaren Beeinträchtigung der Integrität der Organoiden (Abb. 5A und B). Die Behandlung mit Dox führte zu einer im Mikropplattenleser gemessenen deutlich erhöhten Aktivität der SA-β-Gal (Abb. 5C). Im Gegensatz dazu hatte die Behandlung mit Quer und Das im Vergleich zur Kontrolle keinen signifikanten Einfluss auf die SA-β-Gal-Aktivität. Die Fluoreszenzmikroskopie von mit Seneszenzfarbstoff beladenen Organoiden zeigte auch eine erhöhte SA-β-Gal-Aktivität in Dox-behandelten Organoiden (Abb. 5D). Durchflusszytometrie bestätigte die Dox-induzierte erhöhte SA-β-Gal-Aktivität (Abb. 5E).

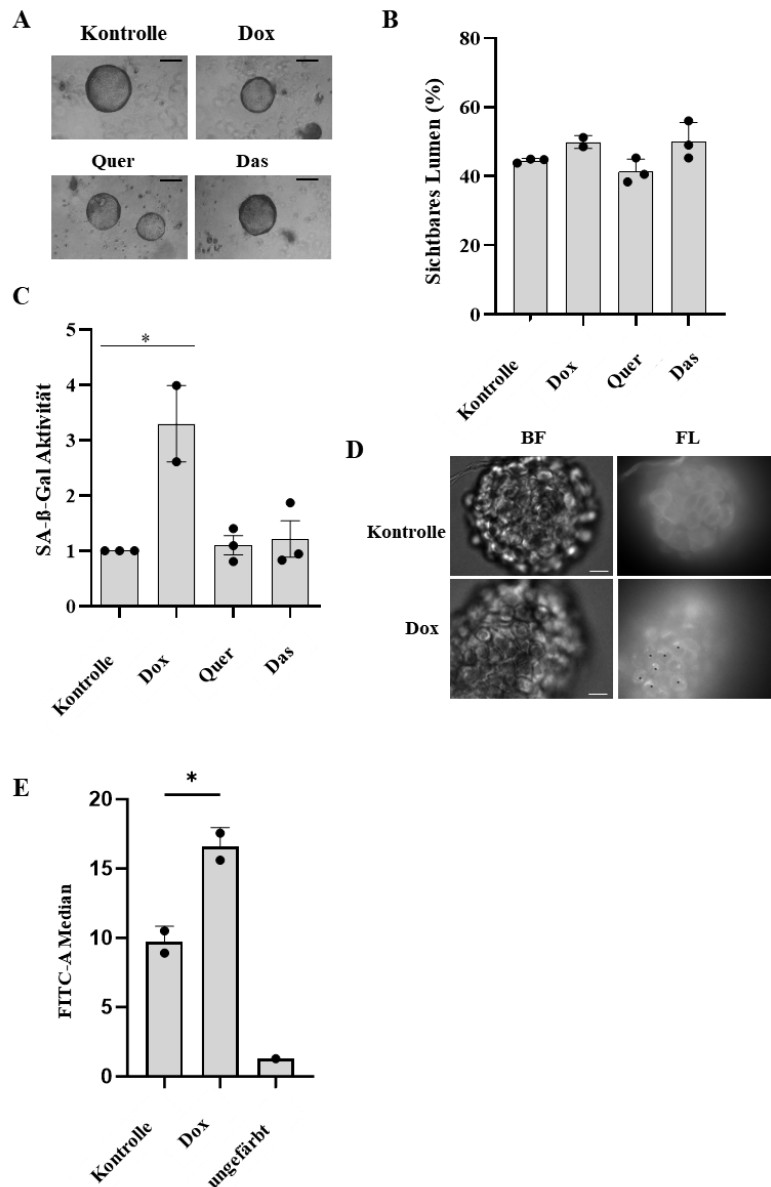


Abb. 5 Dox induziert einen Seneszenz-ähnlichen Phänotyp in 3D-Bronchialorganoiden. (A) Repräsentative Phasenkontrastbilder von Organoiden (Maßstabsbalken = 100 µm) (B) Prozentsatz der Organoiden mit sichtbarem Lumen und (C) SA-β-Gal-Aktivität 48 Stunden nach der Behandlung mit Dox, Quer und Das. Jeder Datenpunkt stellt ein unabhängiges Experiment dar, bei dem Zellen eines separaten Spenders verwendet werden. Die Daten wurden durch eine einfache ANOVA mit Tukeys Mehrfachvergleichen nach dem Test verglichen und sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. * $p < 0,05$ (D) Fluoreszenzmikroskopie von Organoiden 96 Stunden nach der Behandlung mit Dox (BF=Hellfeld, Maßstabsbalken = 50µm, * zeigt SA-β-Gal-Aktivität an. (E) Organoiden von zwei Spendern wurden 48 Stunden lang mit Dox behandelt und die SA-β-Gal-Aktivität wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die Daten wurden mittels t-test verglichen und sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. * $p < 0,05$

3.1.3 Senolytische Wirkstoffe unterdrücken die Wirkung von Dox in 3D-Lungenorganoiden

Als nächstes wurde getestet, ob die Lungenorganoiden zur Prüfung pharmazeutischer Wirkstoffe hinsichtlich zellulärer Seneszenz eingesetzt werden können. Die Organoiden wurden 48 Stunden lang mit Dox allein oder in Kombination mit Quer oder Das behandelt. Mittels lichtmikroskopischer Aufnahmen wurde die Integrität der Organoiden nach Behandlung mit Kontrollmedium, Dox, Quer+Dox und Das+Dox beurteilt. Die Organoiden zeigten nach der Behandlung ein sichtbares Lumen im Inneren (Abb. 6A). Die prozentuale Anzahl der Organoiden zu Beginn (Tag 0) und am Ende der Behandlung (Tag 2) wurde durch die Behandlung mit den Substanzen nicht verändert (Abb. 6B). Es wurde kontrolliert, ob die Organoiden nach Behandlung mit Dox, Quer+Dox und Das+Dox eine Veränderung in der Bildung eines Lumens zeigen. Es zeigte sich keine Veränderung in dem prozentualen Anteil der Organoiden, welche ein sichtbares Lumen aufzeigen (Abb. 6C). Die Integrität der Organoiden wurde also durch die Behandlung mit den gewählten Wirkstoffen nicht beeinträchtigt.

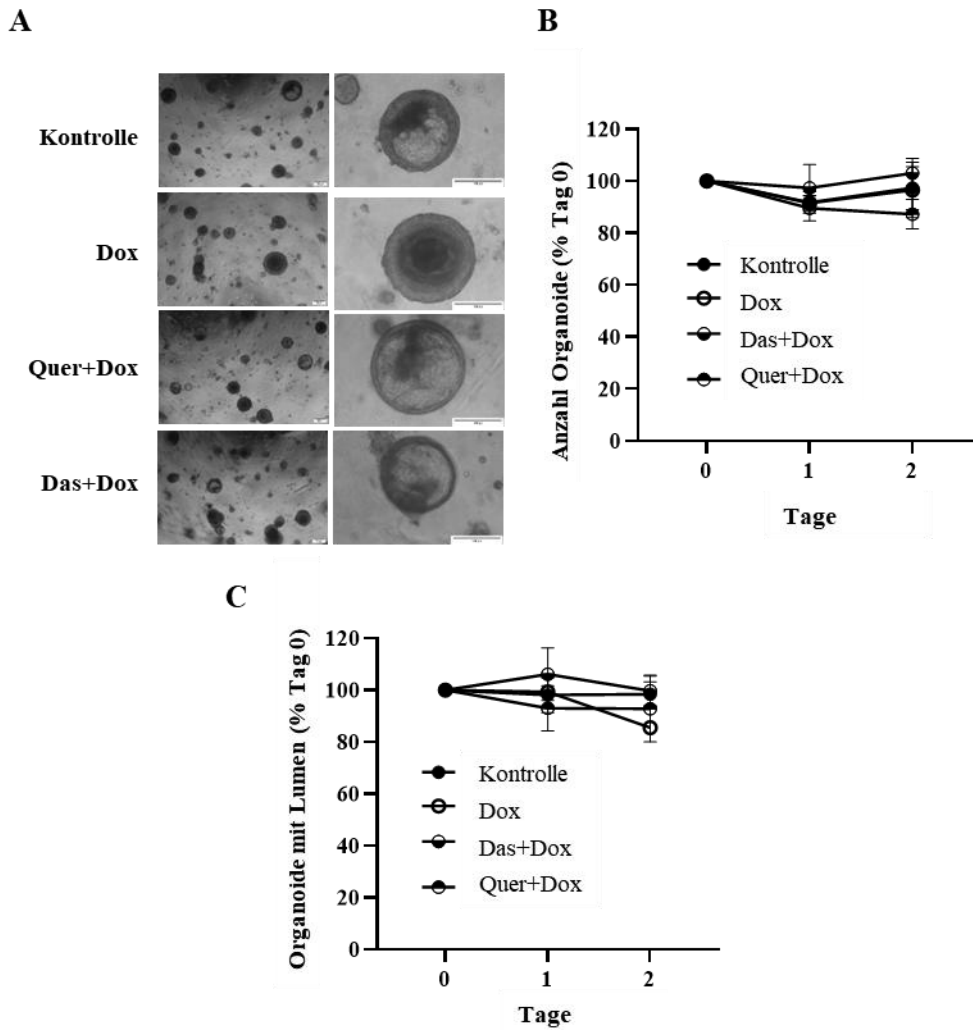


Abb. 6 Die Integrität der Organoide wurde durch die Stimulation mit Dox, Dox + Quer und Dox + Das nicht verändert. (A) Repräsentative Phasenkontrastbilder von Organoiden (Maßstabsbalken = 100 μ m) (B) Prozentuale Anzahl an Organoiden nach 0,1,2 Tage Stimulation. (C) Prozentualer Anteil an Organoiden mit sichtbarem Lumen nach 0,1,2 Tage Stimulation.

Die Behandlung mit Quer oder Das verringerte die Dox-induzierte SA- β -Gal-Aktivität signifikant (Abb. 7A). Die Inkubation mit Dox führte zu einer etwa 1,5-fach erhöhten Stoffwechselaktivität, die durch Quer oder Das nicht signifikant beeinflusst wurde (Abb. 7B). Es gab keine signifikanten Unterschiede in der Freisetzung von LDH im Überstand zwischen den verschiedenen Behandlungen (Abb. 7C).

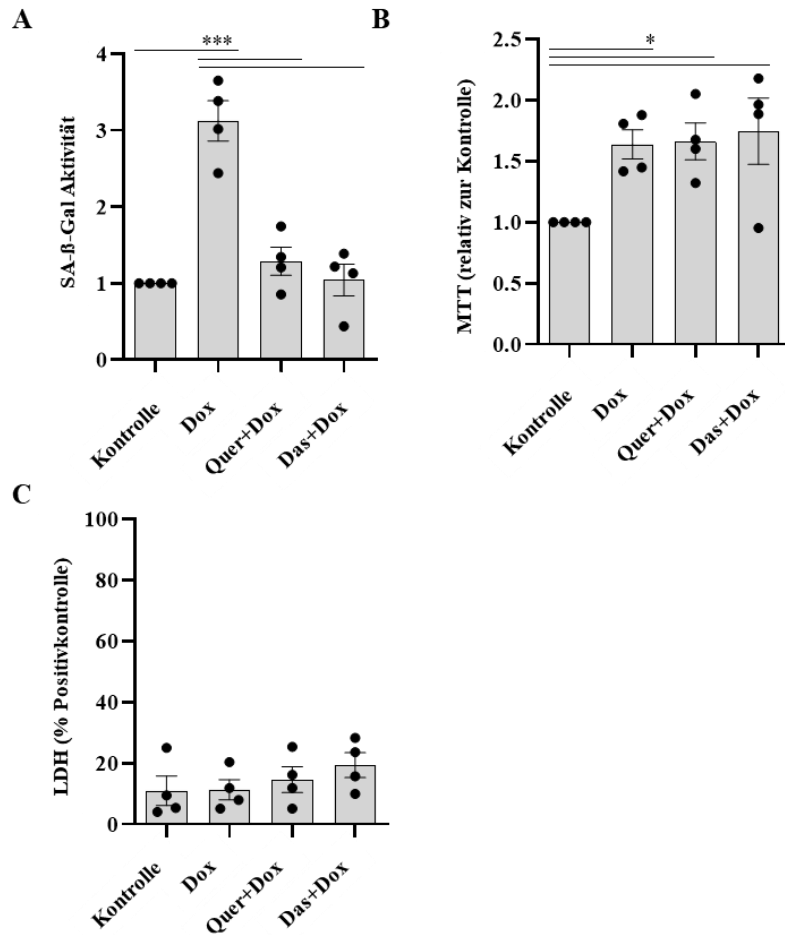


Abb. 7 Quer und Das wirken der Dox-induzierten Seneszenz entgegen. (A) SA-β-Gal-Aktivität, (B) Stoffwechselaktivität (MTT), (C) Freisetzung von LDH nach 48-stündiger Behandlung mit Dox und der Kombination von Dox mit Quer oder Das (relativ zur Kontrolle). Jeder Datenpunkt stellt ein unabhängiges Experiment dar, bei dem Zellen eines separaten Spenders verwendet werden. Die Daten wurden durch eine einfache ANOVA mit Tukeys Mehrfachvergleichen nach dem Test verglichen und sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. * $p < 0,05$ und *** $p < 0,001$

Entzündungen sind eine unerwünschte Nebenwirkung von Medikamenten und gehen oft mit Seneszenz einher. Daher wurde die Freisetzung von Entzündungsmediatoren in Überstände weiter analysiert. Die 48-stündige Behandlung von Organoiden mit Dox hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Hintergrundfreisetzung des entzündlichen Zytokins IL-8 und GDF-15, einem mit Seneszenz verbundenen Faktor [140]. Allerdings wurde die Freisetzung von GDF-15 durch zusätzliche Behandlung mit Quer oder Das verringert (Abb. 8).

Die Freisetzung mehrerer Zytokine wurde gemessen, um Aufschluss über Seneszenz und Entzündung zu erhalten. Die Freisetzung von IL-8 wurde nur durch die Behandlung mit Das+Dox signifikant reduziert. Die Expression von GDF-15 und TIMP-1 waren nach der Behandlung mit beiden

Kombinationen signifikant reduziert. Die Behandlung mit Quer+Dox führte zu einer signifikanten Abnahme von MIP-2 (Macrophage inflammatory protein-2). Die Freisetzung von IL-13 wurde durch die Behandlung nicht verändert (Abb. 8).

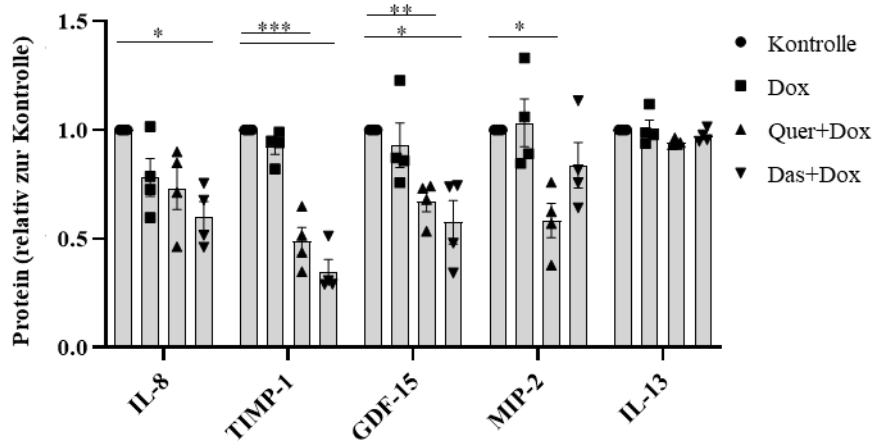


Abb. 8 Expression von IL-8, TIMP-1, GDF-15, MIP-2, IL-13 nach Stimulation. Organoide wurden 48 Stunden lang mit Dox und der Kombination von Dox mit Quer oder Das behandelt. Die Expression von IL-8, TIMP-1, GDF-15, MIP-2 und IL-13 wurde bestimmt. Die Daten wurden durch eine einfache ANOVA mit Tukeys Mehrfachvergleichen nach dem Test verglichen und sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$

Der Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitor p21 fördert den Stillstand des Zellzyklus und gilt als zentraler Mediator der zellulären Seneszenz [119,140]. Eine Western-Blot-Analyse zeigte eine gesteigerte Protein-Expression von p21 nach Behandlung mit Dox, welcher Quer oder Das entgegenwirkten (Abb. 9A und B).

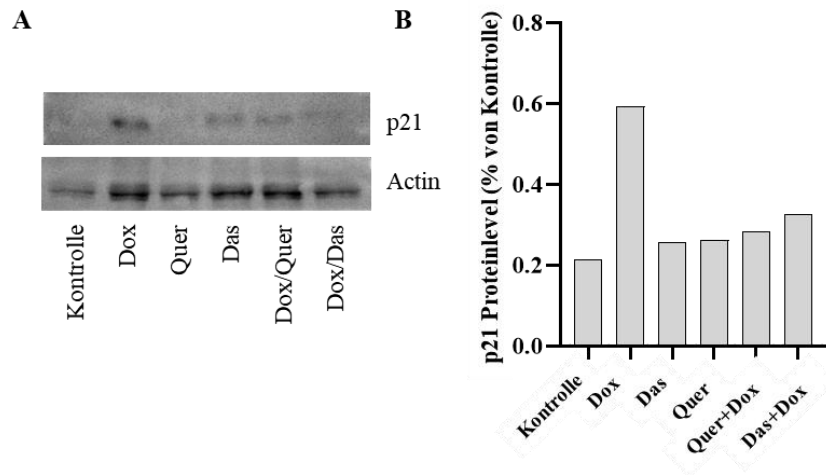
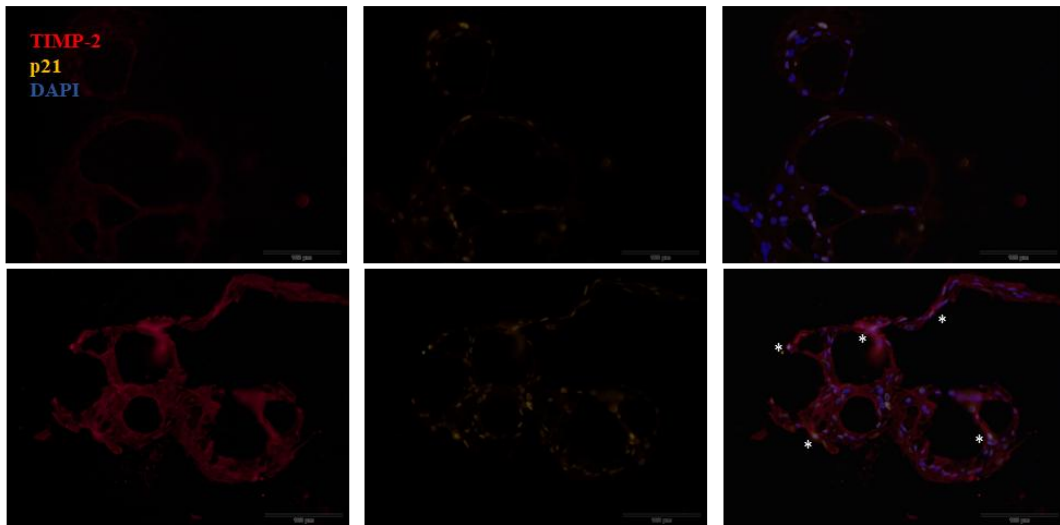


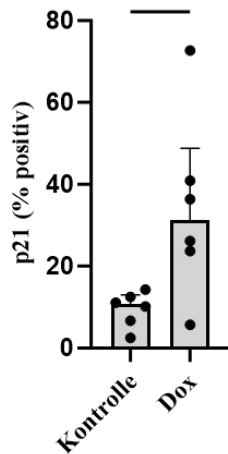
Abb. 9 Western-Blot nach Stimulation mit Dox, Das und Quer. Organoide wurden 48 Stunden lang mit Dox und der Kombination von Dox mit Quer oder Das behandelt. (A) Zelllysate wurden gelgetrennt und immungeblottet. (B) Semiquantitative Densitometrie normalisiert auf Aktin.

Zudem wurden die Expression von p21 und TIMP-2, ein weiterer Seneszenzmarker, mittels Fluoreszenzfärbungen bestimmt (Abb. 10). Die Dox-Behandlung führte zu einer erhöhten Anzahl p21-positiver Kerne und einer TIMP-2-Expression (Abb. 10B und C). TIMP-2 assoziierte mit p21-positiven Kernen.

A



B



C

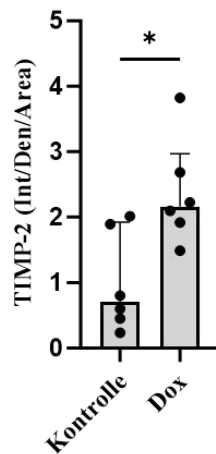


Abb. 10 TIMP-2 assoziiert mit p21-positiven Kernen. Organoide wurden 48 Stunden lang mit Dox- oder Kontrollmedien behandelt. (A) Immunfluoreszenzfärbung wurde für TIMP-2 (rot) und p21 (grün-gelb) durchgeführt. Kerne wurden mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) (blau) gefärbt. Maßstabsleiste: 100 μm . * weisen auf eine erhöhte Färbung von TIMP-2 in der Nähe von p21-positiven Kernen hin. Quantifizierung von (B) p21-positiven Kernen und (C) TIMP-2. Gepoolte Ergebnisse von zwei Spendern. Die Daten wurden mit dem Mann-Whitney-Test verglichen und werden als Mittelwert \pm SEM angezeigt. * $p < 0,05$.

3.1.4 Met zeigt keine signifikante Wirkung auf die Dox-induzierte SA- β -Gal-Aktivität

Da beschrieben wurde, dass Met die Seneszenz moduliert [147,279], haben wir auch die Wirkung von Met auf die Dox-induzierte Seneszenz getestet. Es gab keine signifikante Wirkung von Met auf die Dox-induzierte SA- β -Gal-Aktivität (Abb. 11A). Met hatte auch keinen signifikanten Einfluss auf die

Anzahl der Organoide mit Lumen, die Stoffwechselaktivität und die Freisetzung von LDH (Abb. 11B bis D).

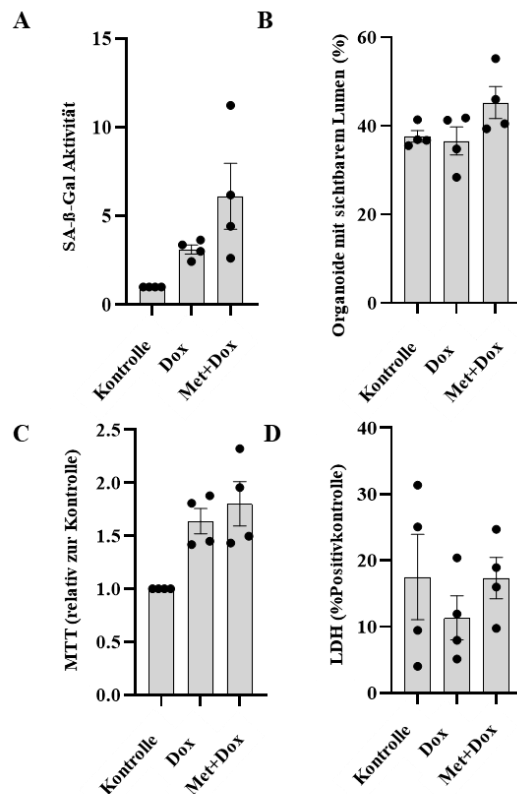


Abb. 11 Met hemmt die Seneszenz in Organoiden nicht. (A) SA-β-Gal-Aktivität, (B) Prozentsatz der Organoide mit sichtbarem Lumen, (C) Stoffwechselaktivität und (D) Freisetzung von LDH nach 48-stündiger Behandlung von Organoiden mit Dox und der Kombination von Dox mit Met. Jeder Datenpunkt stellt ein unabhängiges Experiment dar. Die Daten werden als Mittelwert ± SEM angezeigt.

3.1.5 Quer wirkt der Dox-induzierten Seneszenz entgegen

Es wurde getestet, ob Quer nach initialer Behandlung mit Dox der Seneszenz entgegenwirkt. Dazu wurden Organoide 48 Stunden lang mit Dox oder Kontrollmedium vorbehandelt. Die mit Kontrollmedium vorinkubierten Organoide wurden anschließend mit Kontrollmedium oder Quer behandelt, während die mit Dox vorinkubierten Organoide weitere 48 Stunden mit Dox oder der Kombination aus Quer und Dox behandelt wurden (Abb. 12A). Die Behandlung mit Quer reduzierte die Dox-induzierte SA-β-Gal-Aktivität signifikant (Abb. 12B). Die verschiedenen Behandlungen hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Integrität der Organoide (Abb. 12C und D). Die 96-stündige Behandlung mit Dox führte zu einer verstärkten Freisetzung von GDF-15, welche durch Quer deutlich reduziert wurde (Abb. 12E).

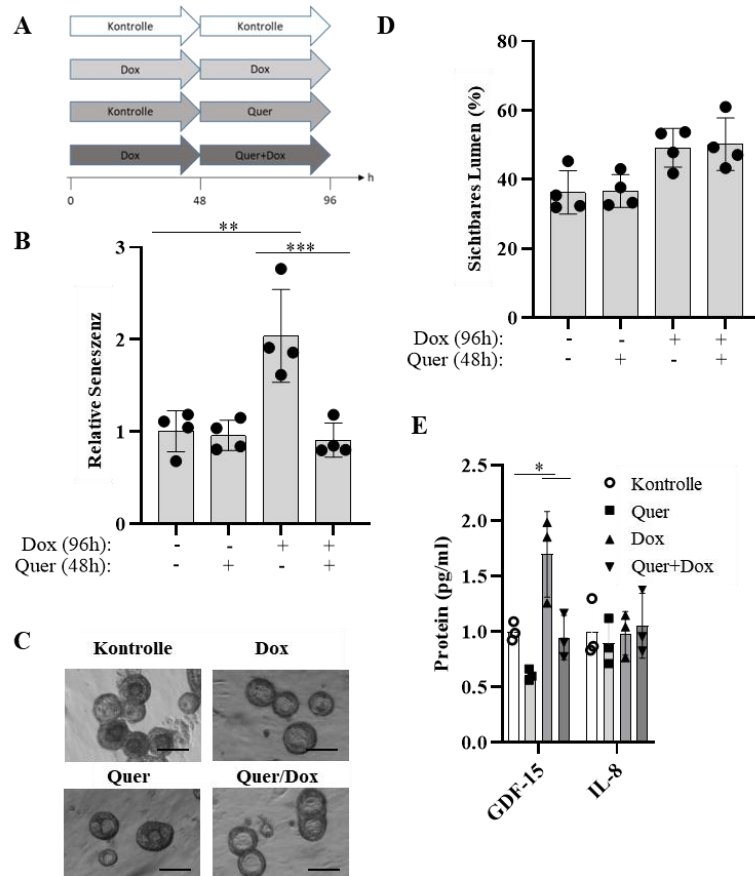


Abb. 12 Quercetin verringert die SA-β-Gal-Aktivität nach initialer Behandlung mit Dox. (A) Schema des Versuchsprotokolls. Organoide wurden 48 Stunden lang mit Dox oder Kontrollmedium vorbehandelt. Die mit Kontrollmedium vorinkubierten Organoide wurden mit Kontrollmedium oder Quercetin behandelt, die mit Dox vorinkubierten Organoide wurden weitere 48 Stunden mit Dox oder der Kombination aus Quercetin und Dox behandelt. (B) Relative SA-β-Gal-Aktivität, (C) repräsentative Phasenkontrastbilder von Organoiden (Maßstabsbalken =50 µm) und (D) Prozentsatz der Organoide mit sichtbarem Lumen. (E) Konzentrationen von GDF-15 und IL-8 in Überständen. Die präsentierten Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. Die Daten wurden durch eine einfache ANOVA mit Tukeys Mehrfachvergleichen nach dem Test verglichen und sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. *p < 0,05, **p < 0,01 und ***p < 0,001

3.1.6 Die Einzelzellanalyse identifiziert seneszenzartige Zellen in der Lunge

Die Einzelzell-RNA-Sequenzierung (scRNA-seq) hat sich als leistungsfähiger Ansatz zur Messung von Zelllinienhierarchien herausgestellt, indem Zellen auf unterschiedlichen Differenzierungsebenen erfasst werden [219]. Bei der scRNA-seq-Analyse werden Zellen mit ähnlichen Genexpressionsprofilen geclustert und können auf der Grundlage bekannter Markergene mit einer Annotation versehen werden [111]. ScRNA-seq liefert eine molekulare Grundlage, um zu verstehen, wie Lungenzellidentitäten, -funktionen und -interaktionen während der Entwicklung und im adulten Organismus vorliegen und wie sie in Krankheitszuständen verändert sind. Es wurden Marker identifiziert, die verschiedene Zelltypen zugeschrieben werden können [247]. So werden *KRT5* und

TP63 von Basalzellen, *SCGB1A1* und *MUC5B* von sekretorischen/Becherzellen und *FOXJ1* von Zilienzellen exprimiert [174,179].

Mithilfe von scRNA-seq wurde analysiert, wie Dox und Quer die zelltyp-spezifische mRNA-Expression und die Zusammensetzung der Organoiden beeinflussen. Hierzu wurden Organoiden nach dem Schema, wie in Abb. 12A dargestellt, behandelt, die von zwei verschiedenen Spendern stammen. Zur Annotation von Clustern wurden repräsentative Marker verwendet [174,176]. Es konnten Basalzellen, sekretorische Zellen, Becherzellen, deuteromale und Flimmerzellen unterschieden werden (Abb. 13A und B). Bemerkenswerterweise wurde ein Cluster identifiziert, hier definiert als seneszente Zellen, mit hoher Expression der allgemeinen Seneszenzmarker *CDKN1A* (p21), *CDKN2A* (p16), *TIMP2* und *GDF15* [94,140] (Abb. 13B bis C). Die Analyse der Signalweganreicherung zeigte auch eine Anreicherung des zellulären Seneszenzpfades im seneszenten Zellcluster (Abb. 13D). Die RNS-Velocity-Analyse zeigte, dass sich Basalzellen über Übergangsbasalzellen zu sekretorischen Zellen sowie über deuteromale Zellen zu Flimmerzellen differenzieren, was die normale Differenzierung des Atemwegsepithels korrekt widerspiegelt (Abb. 13E) [176]. Darüber hinaus zeigten auch Übergangsbasalzellen und sekretorische Zellen eine Velocity in Richtung seneszenter Zellen, was darauf hindeutet, dass seneszente Zellen von Zellen im Übergang stammen. Zudem wurden diese Einzelzellendaten auch mit einem weiteren eigenen unabhängigen Datensatz kombiniert, der unbehandelte Organoiden von fünf Spendern enthält. Der Cluster mit Seneszenz-ähnlichen Zellen war auch in diesen Organoiden vorhanden (Abb. 13F).

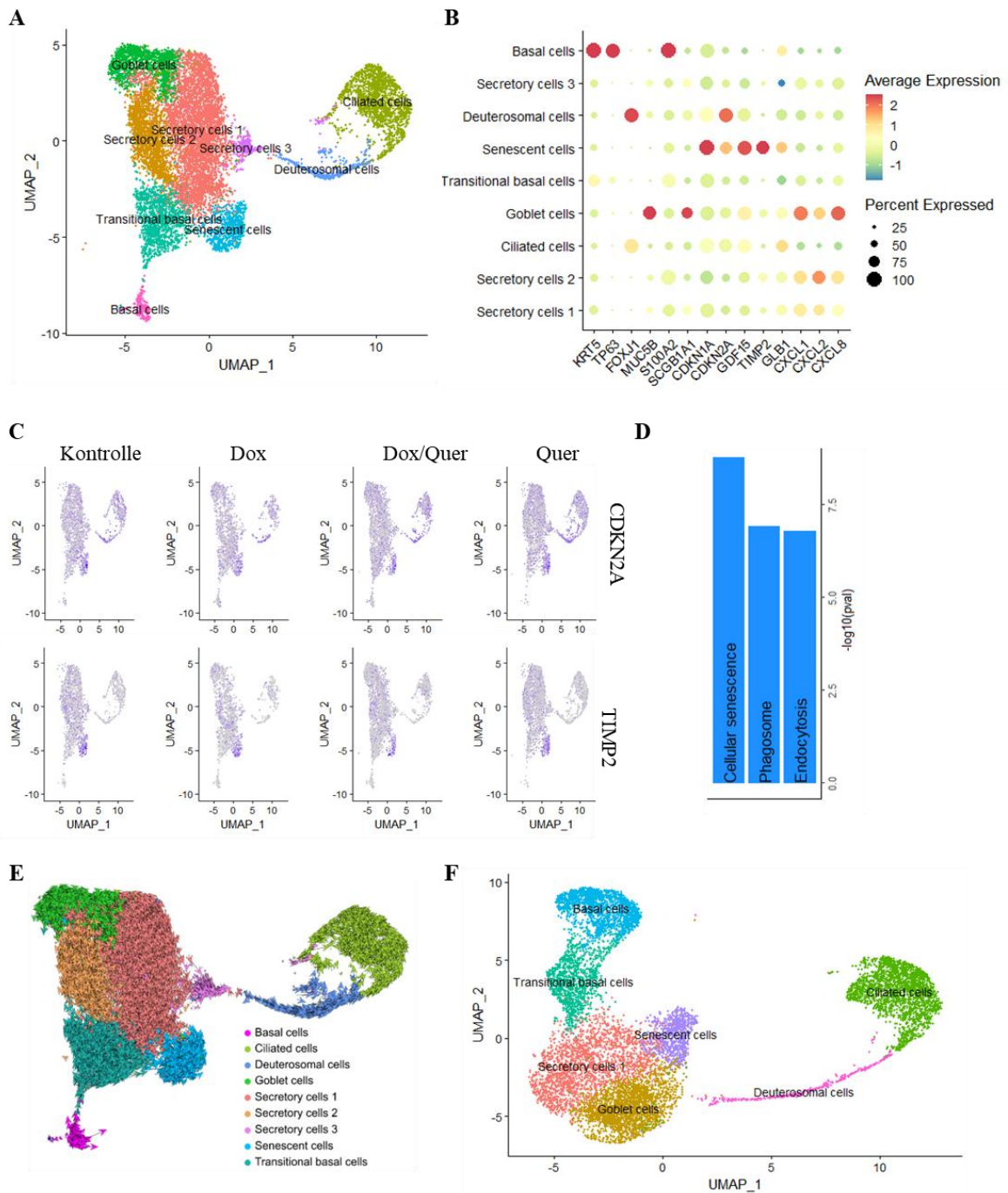


Abb. 13 Die Einzelzellanalyse zeigt unterschiedliche Epithelzellpopulationen. (A–D) Organoide wurden 48 Stunden lang mit Dox oder Kontrollmedium vorbehandelt. Die mit Kontrollmedium vorinkubierten Organoide wurden mit Kontrollmedium oder Quer behandelt, die mit Dox vorinkubierten Organoide wurden weitere 48 Stunden mit Dox oder der Kombination aus Quer und Dox behandelt. (A) UMAP-Visualisierung der wichtigsten Epithelzelltypen. (B) Dotplot, der die Expression von Epithelzelltyp-Markern zeigt. (C) UMAP-Visualisierung von Zellmarkern für Seneszenz. (D) Balkendiagramm der Hallmark-Genset-Anreicherungsanalyse (KEGG_2019_Human, zweiseitige Wilcoxon-Rangsumme) für Pfade, die in seneszenten Zellen angereichert sind. (E) RNS-Velocity-Analyse von Einzelzelldaten. (F) UMAP-Visualisierung der wichtigsten Epithelzelltypen kombinierter Datensätze.

Die Monokel-Analyse (Anhang S1) ergab, dass sich Basalzellen entweder über Übergangsbasalzellen zu sekretorischen Zellen oder über deuteromale Zellen zu Flimmerzellen entwickeln, ein Prozess, der die normale Differenzierung des Atemwegsepithels zutreffend widerspiegelt. Zudem zeigte sich, dass sowohl Übergangsbasalzellen als auch sekretorische Zellen in Richtung seneszenter Zellen differenzieren können, was darauf hinweist, dass seneszente Zellen bevorzugt aus Übergangszellen hervorgehen.

Anhang S2-S4 zeigt die unterschiedlichen Zellcluster nach Spender aufgeteilt. Zwischen den Spendern zeigten sich kaum Unterschiede in dem Punktediagramm bezüglich kanonischer Zellmarker wie *KRT5*, *SCGB1A1*, *E2F7* (E2F Transcription Factor 7) und *FOXJ1* sowie Entzündungsmarker (z.B. *CXCL1*, *CXCL8*).

Anhang S5/S6 zeigt, dass die kombinierten Datensätze sich bezüglich der Cluster einheitlich zusammensetzten. Die Analyse der Signalwegenreicherung zeigte auch eine Anreicherung des zellulären Seneszenzpfads im seneszenten Zellcluster. Es ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede in den kanonischen Zellmarkern zwischen den beiden Kohorten.

Es wurde der prozentuale Anteil der verschiedenen Zellcluster für jeden Spender berechnet (Abb. 14A). Die Behandlung mit Quer führte zu einem deutlich verringerten Anteil seneszenter Zellen (Abb. 14B).

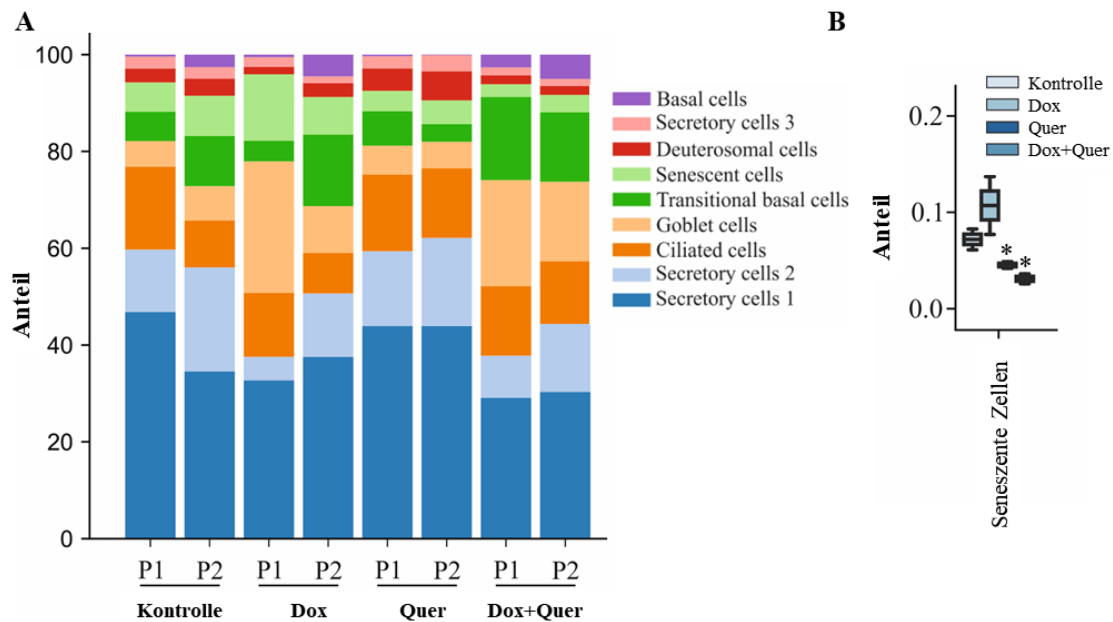


Abb. 14 Quer verringert die Anzahl der Zellen, die Seneszenzmarker exprimieren. Organotide wurden 48 Stunden lang mit Dox oder Kontrollmedium vorbehandelt. Die mit Kontrollmedium vorinkubierten Organotide wurden mit Kontrollmedium oder Quer behandelt, die mit Dox vorinkubierten Organotide wurden weitere 48 Stunden mit Dox oder der Kombination aus Quer und Dox behandelt. (A) Anteil der verschiedenen Zellcluster. (B) Anteil des seneszenten Zellclusters von allen Clustern. Die Daten wurden mit einem Bayes'schen Modell verglichen. * $p < 0,05$

3.1.7 Die Behandlung mit Dox erhöht die Expression von Entgiftungsgenen ausschließlich in Becherzellen

Cytochrom P450s CYP1A1 (Cytochrom P450, Familie 1, Unterfamilie A, Polypeptid 1) und CYP1A2 (Cytochrom P450, Familie 1, Unterfamilie A, Polypeptid 2) können eine breite Palette von Fremdverbindungen und Medikamenten metabolisieren. Humanes CYP1A1 und CYP1A2 sind wichtig für die Definition der Wirksamkeit und Toxizität/Karzinogenität von Arzneimitteln und Fremdstoffen. CYP1A2 ist ein wichtiges Cytochrom P450, das etwa 12 % des gesamten hepatischen P450 ausmacht [130].

Aldehyde sind hochreaktive Moleküle, die Zwischenprodukte oder Produkte sind, die an einem breiten Spektrum physiologischer, biologischer und pharmakologischer Prozesse beteiligt sind. Einer der wichtigsten Wege für den Stoffwechsel von Aldehyden ist ihre Oxidation zu Carbonsäuren durch Aldehyddehydrogenasen (ALDHs). Bei der Biotransformation einer Vielzahl von Arzneimitteln und Umwelteinflüssen entstehen Aldehyde. Das zytosolische ALDH1A1 (Aldehyddehydrogenase-1-Familie, Mitglied A1) und das mitochondriale ALDH1B1 (Aldehyddehydrogenase-1-Familie, Mitglied B1) könnten am Acetaldehydstoffwechsel beteiligt sein. ALDH1A2 und ALDH1A3

(Aldehyddehydrogenase-1-Familie, Mitglied A2/3) sind integraler Bestandteil der Oxidation von Retinal zu Retinsäure [255].

Die Dox-Behandlung führte zu einem erhöhten Anteil an Becherzellen, der durch die zusätzliche Behandlung mit Quer nicht beeinträchtigt wurde (Abb. 15A). Darüber hinaus war die Expression von Genen, die mit der Entgiftung assoziiert sind (z. B. *CYP1A1*, *ALDH1A3*), im Becherzellcluster stark erhöht. Auch dies wurde durch die Quer-Behandlung nicht beeinflusst (Abb. 15B und C).

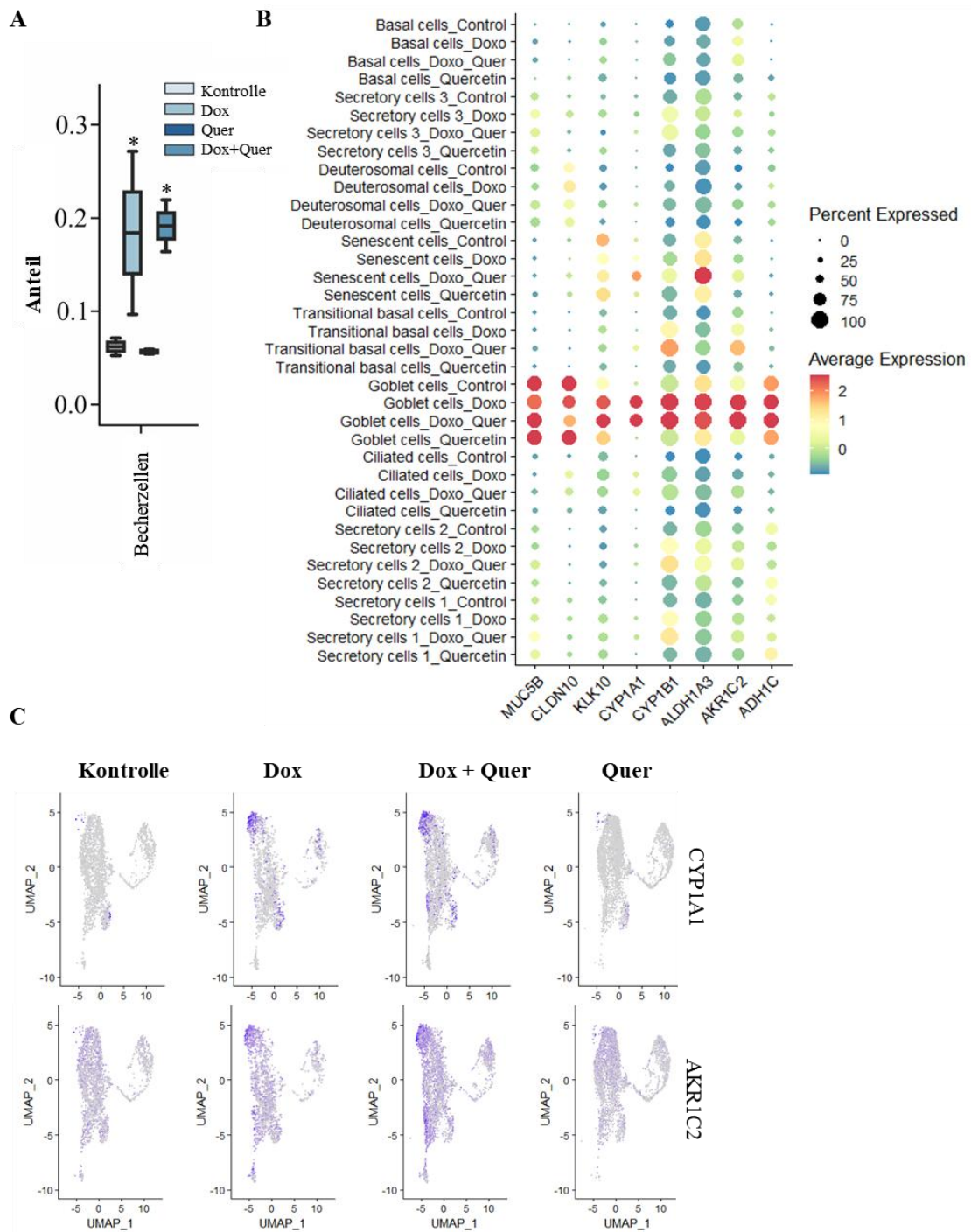


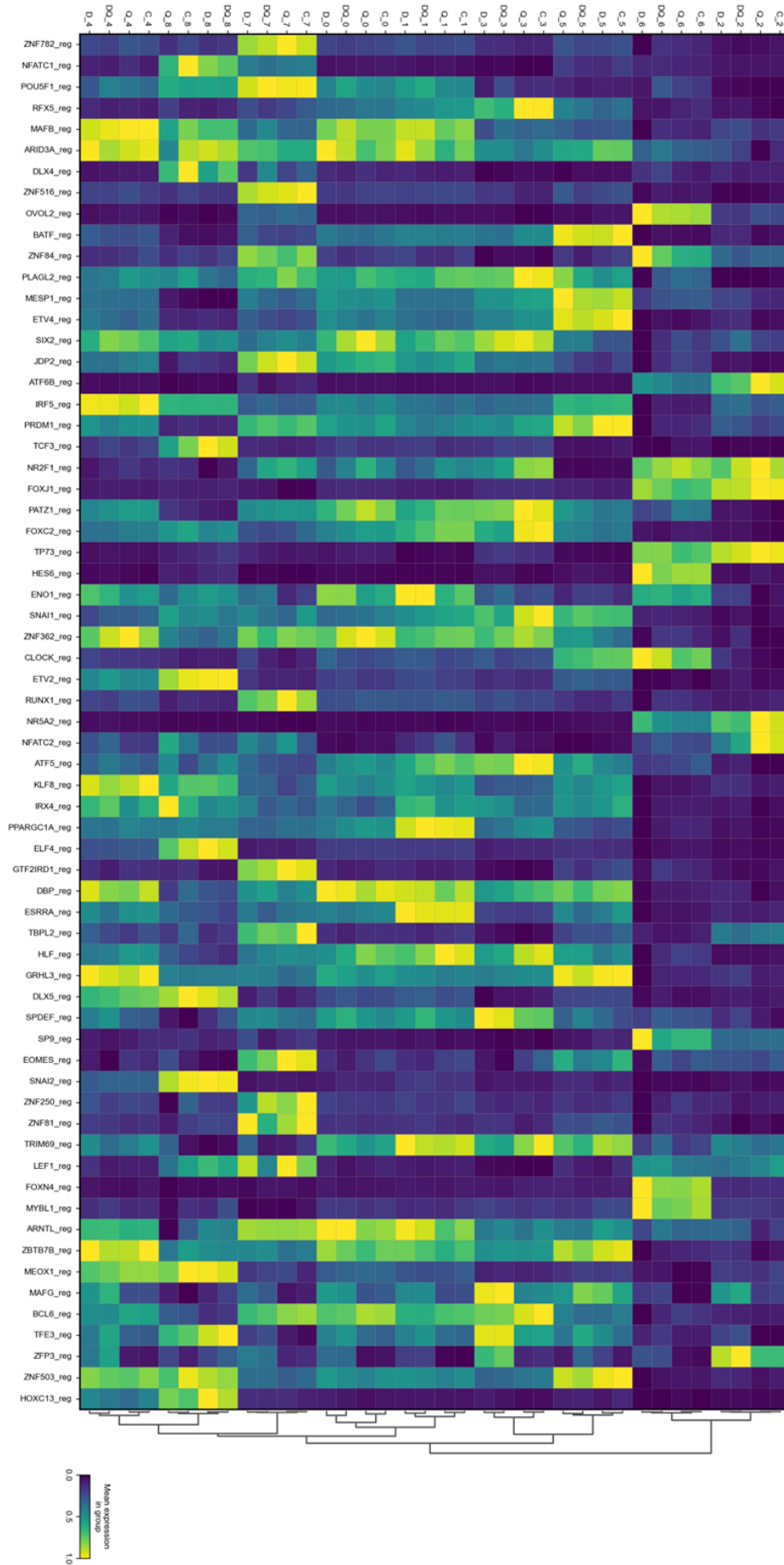
Abb. 15 Dox induziert die Expression von Entgiftungsfaktoren in Becherzellen. Organoide wurden 48 Stunden lang mit Dox oder Kontrollmedium vorbehandelt. Die mit Kontrollmedium vorinkubierten Organoide wurden mit Kontrollmedium oder Quer behandelt, die mit Dox vorinkubierten Organoide wurden weitere 48 Stunden mit Dox oder der Kombination aus Quer und Dox behandelt. (A) Anteil des Becherzellclusters von allen Clustern. Die Daten wurden mit einem Bayes'schen Modell verglichen. * $p < 0,05$ (B) Dotplot, der die Expression von Becherzellmarkern und mit der Entgiftung verbundenen Faktoren zeigt. (C) UMAP-Visualisierung von Faktoren, die mit der Entgiftung verbunden sind.

3.1.8 Seneszente Zellen sind durch eine erhöhte Aktivität der BATF- und PRDM1-Regulone gekennzeichnet

Der Transkriptionsfaktor SPDEF (steriler α -motif point domain epithelial specific transcription factor) ist ein wichtiger Regulator von MUC5AC. Die Aktivität des SPDEF-Regulons war in sekretorischen Zellen erhöht, es wurde gezeigt, dass SPDEF MUC5B in Atemwegsepithelzellen reguliert. SPDEF wird für die Differenzierung von Mukuszellen und die MUC5B-Expression im oberflächlichen Epithel benötigt [49].

Die Aktivität des FOXJ1-Regulons war in Flimmerzellen erhöht (Abb. 16A und B). Seneszierende Zellen waren durch eine erhöhte Aktivität der BATF (Basic Leucine Zipper ATF-Like Transcription Factor)- und PRDM1 (PR-Domänen-Zinkfingerprotein 1)-Regulone gekennzeichnet. Es wurde gezeigt, dass BATF und PRDM1 die Selbsterneuerung der Zellen begrenzen und eine Funktion bei der Aufrechterhaltung von Entwicklungsstadien haben [116,160,264].

A



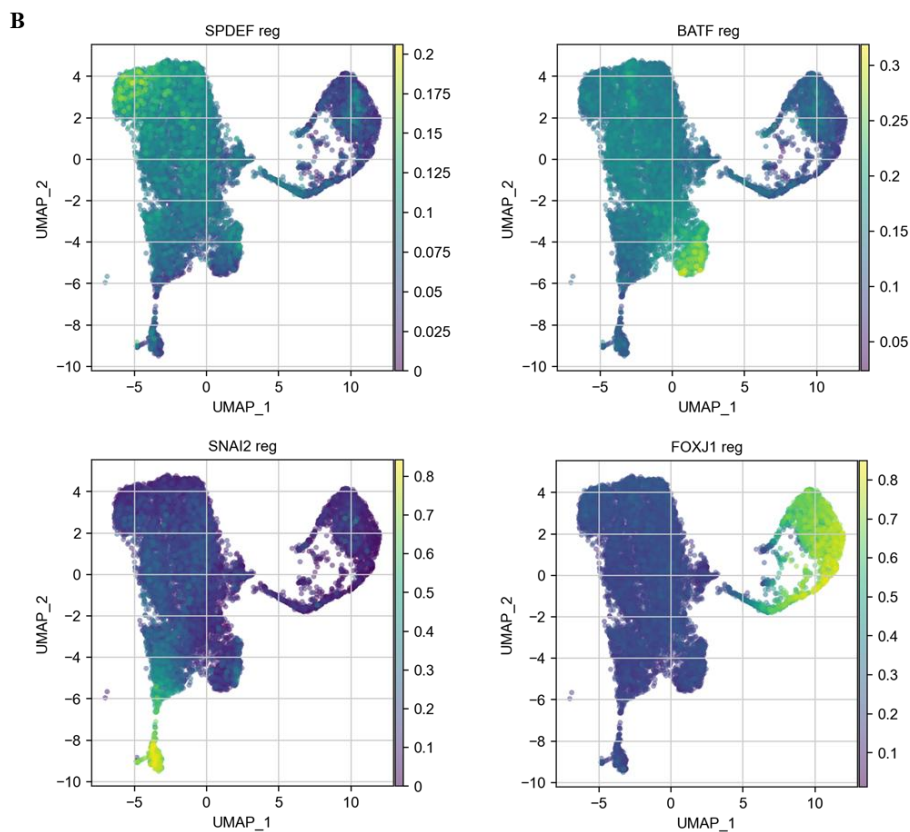


Abb. 16 Regulon-Analyse der Einzelzellendaten. Organoide wurden 48 Stunden lang mit Dox oder Kontrollmedium vorbehandelt. Die mit Kontrollmedium vorinkubierten Organoide wurden mit Kontrollmedium oder Quer behandelt, die mit Dox vorinkubierten Organoide wurden weitere 48 Stunden mit Dox oder der Kombination aus Quer und Dox behandelt. (A) Heatmap der Regulon-Aktivität der obersten Regulons, die die Cluster unterscheiden. C, Kontrollmedium; D, Dox-Medien; CQ, Medien mit Quer; DQ, Dox/Quer-Medien. (B) UMAP-Darstellungen der Regulon-Aktivität der obersten Regulons, die die Cluster unterscheiden.

3.2 Etablierung und Charakterisierung Matrigel-freier Apikal-Out-Organoide

3.2.1 IL-13 induziert einen sekretorischen Phänotyp in Apikal-Out-Organoiden

3.2.1.1 Die Behandlung mit IL-13 führte zu einer verminderten Ziliogenese

Die geschlossene Organoidstruktur von Organoiden, welche in Matrigel kultiviert werden, begrenzt die Zugänglichkeit zur luminalen apikalen Zelloberfläche, die der Umgebung *in vitro* ausgesetzt ist. Zudem ist es im Sinne des Tierschutzes notwendig, Matrigel-freie Organoid-Modelle zu entwickeln, da Matrigel aus stark Tumor-belasteten Mäusen gewonnen wird. Daher wurden Apikal-Out-Organoide kultiviert, welche nach außen-gerichtete Zilien besitzen. Sie bestehen hauptsächlich aus Basal- und

Zilienzellen. Der einfache Zugang zur apikalen Oberfläche des Epithels und der Skalierbarkeit dieses Kultursystems bietet ein leistungsstarkes *in vitro*-Modell, das für die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Wirtspathogen und Arzneimittelscreening geeignet ist [237].

Die Organoiden wurden 14 Tage mit 100 ng/ml IL-13 stimuliert, um den Effekt von IL-13 auf die Differenzierung der Organoiden zu untersuchen. Nach der Behandlung mit IL-13 stieg die Anzahl an Organoiden signifikant an (Abb. 17A). Der Durchmesser der Apikal-Out-Organoide nahm nach Stimulation mit IL-13 signifikant ab (Abb. 17B). Die prozentuale Anzahl an Organoiden mit Zilien nahm nach Stimulation mit IL-13 ab (Abb. 17C). In lichtmikroskopischen Aufnahmen der Organoiden zeigte sich ebenfalls eine erhöhte Anzahl an Organoiden mit kleinerem Durchmesser (Abb. 17D).

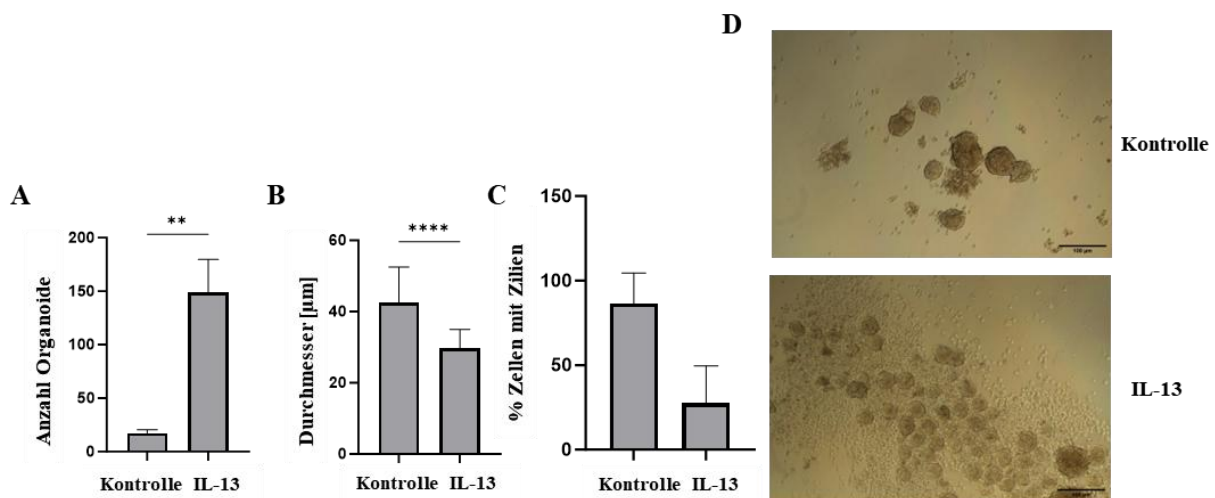


Abb. 17 Integrität, Anzahl und Durchmesser der Apikal-Out-Organoide nach Stimulation mit IL-13. Die Apikal-Out-Organoide wurden während der Differenzierungsphase für 14 Tage mit 100 ng/ml IL-13 stimuliert. (A) Anzahl der Organoiden. (B) Durchmesser der Organoiden in μm . (C) Prozentualer Anteil der Organoiden mit sichtbaren Zilien. (D) Phasenkontrastbilder von apikal nach außen gerichteten Organoiden (Maßstabsbalken = 100 μm). Die präsentierten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Die Daten wurden mit dem Mann-Whitney-Test verglichen und werden als Mittelwert \pm SD dargestellt. $**p < 0,01$ und $****p < 0,0001$

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung konnte gezeigt werden, dass Apikal-Out-Organoide nach Stimulation mit IL-13 eine erhöhte Expression von MUC5B aufweisen. Kontroll-Organoide ohne Behandlung zeigten keine Expression von MUC5B (Abb. 18).

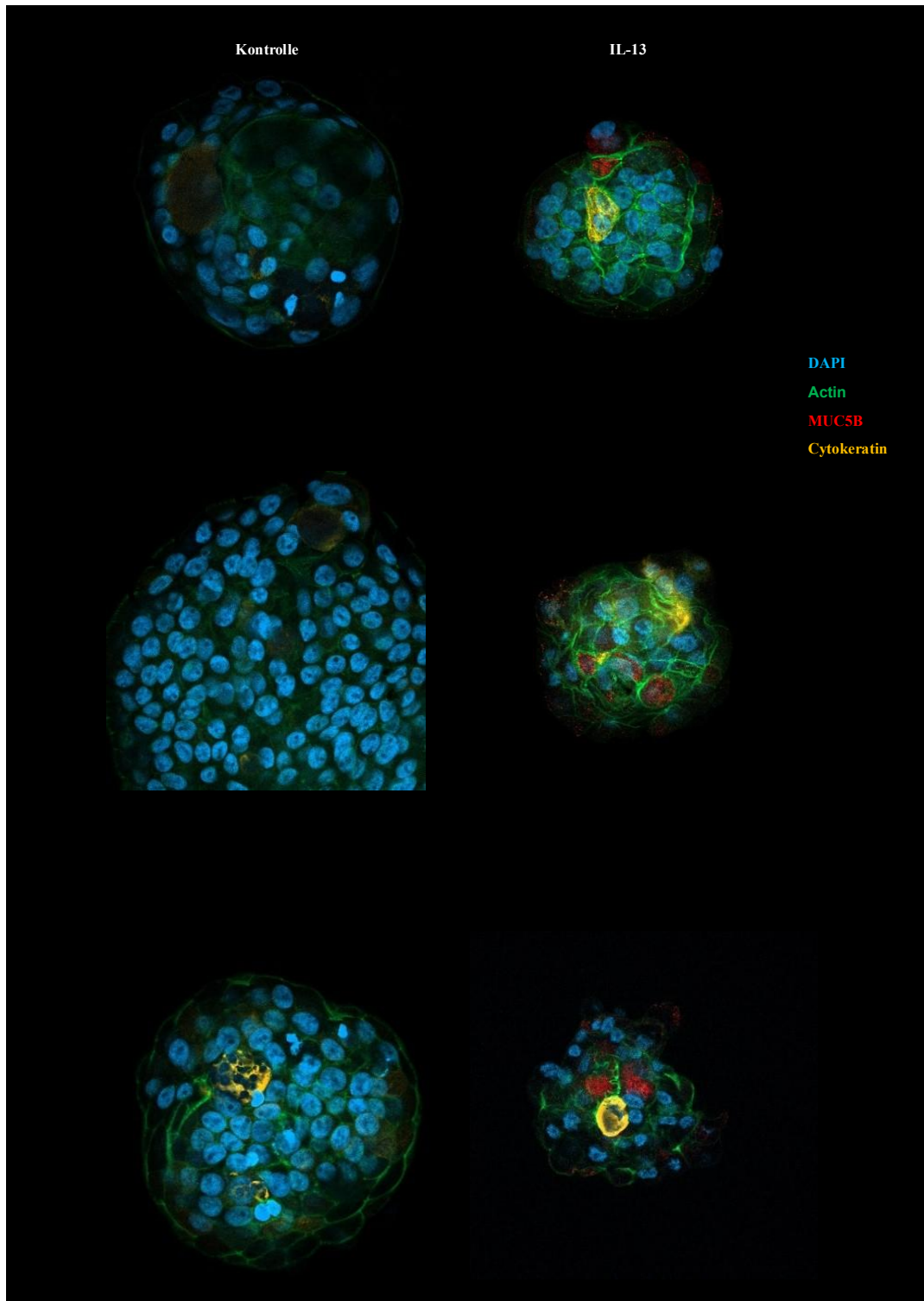


Abb. 18 Fluoreszenzfärbung für MUC5B nach Stimulation mit IL-13. Die Apikal-Out-Organoiden wurden während der Differenzierungsphase für 14 Tage mit 100 ng/ml IL-13 stimuliert. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigen die Expression von MUC5B, Actin und Cytokeratin in Kontroll- und IL-13-stimulierten Organoiden.

3.2.1.2 IL-13 führt zu einer signifikanten Zunahme der *MUC5AC*-Expression sowie zu einer signifikanten Abnahme der *FOXJ1*-Expression

Um die Umdifferenzierung der Organoide nach Stimulation mit IL-13 zu beurteilen, wurde eine Immunhistochemische Färbung für *MUC5AC* sowie eine qRT-PCR für die Expression von *MUC5AC* und *FOXJ1* durchgeführt. Die Immunhistochemische Färbung für *MUC5AC* zeigte nach der Behandlung mit IL-13 eine deutlich erhöhte Expression von *MUC5AC* im Vergleich zu den Kontroll-Organoiden ohne Behandlung (Abb. 19A). In der qRT-PCR zeigte sich nach Behandlung mit IL-13 eine signifikant erhöhte Expression von *MUC5AC* (Abb. 19B) sowie eine signifikante Abnahme der Expression von *FOXJ1* (Abb. 19C).

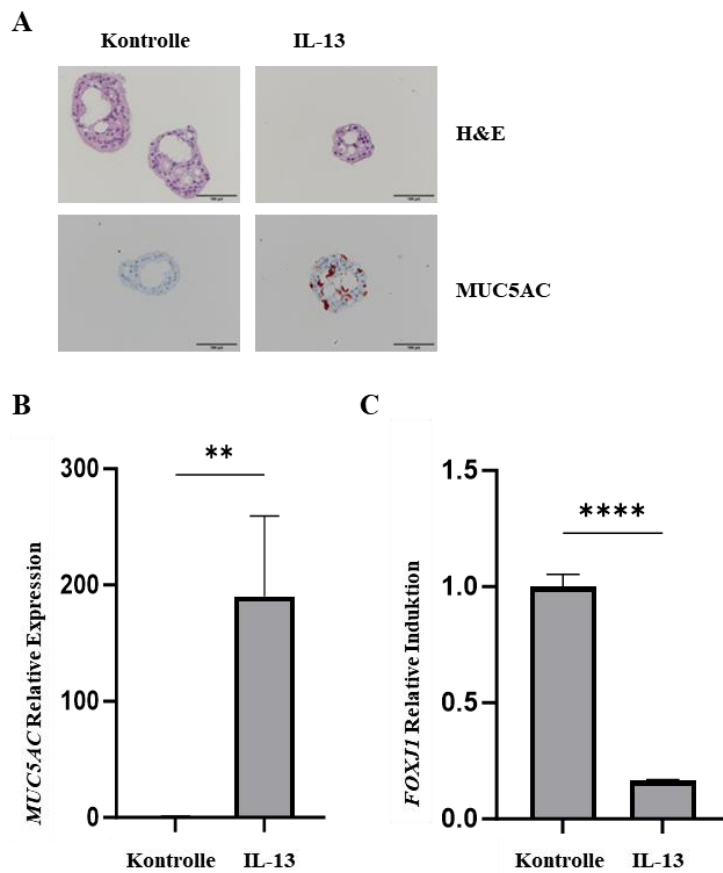


Abb. 19 IL-13-stimulierte Apikal-Out-Organoide zeigten eine erhöhte Expression von *MUC5AC* sowie eine verringerte Expression von *FOXJ1*. (A) Immunfärbung für *MUC5AC* (Maßstabsbalken = 100 μ m). (B/C) Semiquantitative RT-PCR. Die präsentierten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Die Daten wurden mit dem Mann-Whitney-Test verglichen und werden als Mittelwert \pm SD dargestellt. ** $p < 0,01$ und **** $p < 0,0001$

3.2.1.3 Proteomik-Analysen und Einzelzellanalysen zeigen eine verminderte Ziliogenese nach IL-13 Stimulation

Die Bewegung der Apikal-Out-Organoiden wurde mittels lichtmikroskopischer Videoaufnahme in einem Zeitraum von 7 Sekunden aufgenommen. Die Kontroll-Organoiden zeigten eine deutliche Bewegung aufgrund der vorhandenen Zilien. Die Organoiden, welche mit IL-13 behandelt wurden, zeigten aufgrund fehlender Zilien keine Bewegung. IL-13 hemmt die freie Bewegung der Organoiden durch das Zellkulturmedium (Abb. 20A). Mit Hilfe einer Proteomik-Analyse wurden die herunter- und hochregulierten Proteine der Organoiden nach Behandlung mit IL-13 dargestellt. Proteine (z.B. DAW1 (Dynein Assembly Factor with WD Repeats 1), WDR19 (WD Repeat Domain 19)), die mit Zilien in Verbindung stehen, waren vermindert exprimiert, während IL-13-assoziierte Proteine (z.B. FCGBP (Fc-Gamma-Binding-Protein), ALOX15 (Arachidonate 15-Lipoxygenase)) verstärkt gebildet wurden (Abb. 20B). Eine Anreicherungsanalyse der Gene Ontology (GO) ergab eine starke Herunterregulierung von Proteinen, die an der Organisation und Zusammensetzung der Zilien beteiligt sind, während Proteine, die mit Lysosomen und sekretorischen Vesikeln assoziiert sind, hochreguliert waren (Abb. 20C). Immunhistochemische Färbung bestätigten eine IL-13-induzierte Expression von FCGBP (Abb. 20D).

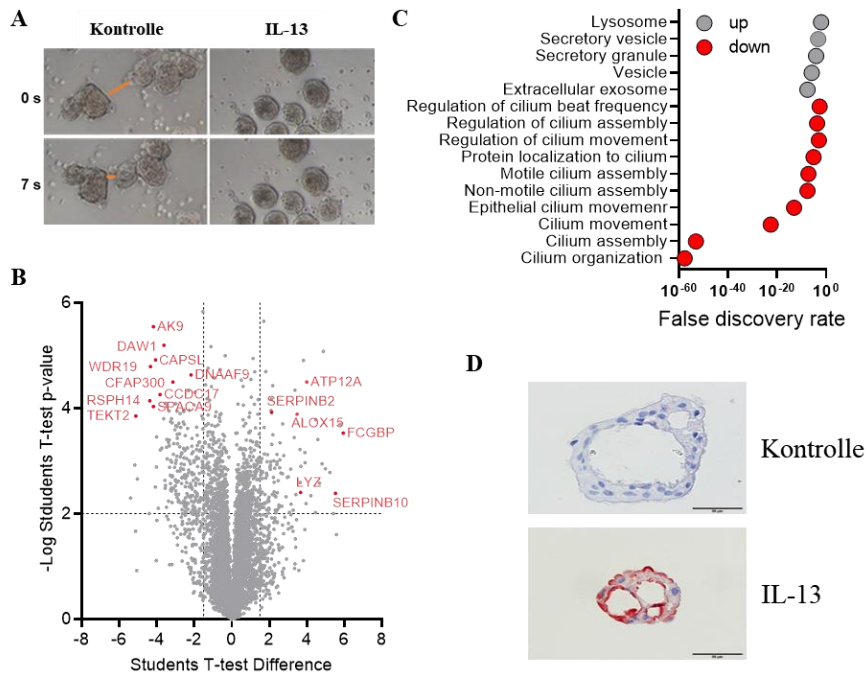


Abb. 20 Nach Stimulation mit IL-13 zeigten die Apikal-Out-Organoiden eine herunterregulierte Bewegung sowie eine geringere Anzahl an Zilien. (A) Phasenkontrastbilder von Apikal-Out-Organoiden. Die roten Balken zeigen die Bewegung der Organoiden nach 7 Sekunden. (B) Differenziell exprimierte Proteine in IL-13-behandelten vs. Kontroll-Organoiden. (C) GO-Termanreicherung für unterschiedlich häufig vorkommende Proteine. (D) Immunfärbung für FCGBP (Maßstabsbalken = 50 μ m).

Mit Hilfe von Einzelzellsequenzierung und Annotierung mittels Zellmarker konnte eine eindeutige Trennung zwischen Kontroll-Organoiden und IL-13-Organoiden gezeigt werden. Die Einzelzellsequenzierung bestätigt, dass die Kontroll-Organoiden überwiegend aus Zilienzellen bestehen. IL-13 hemmte die Expression von Markern für Zilien und erhöhte die Expression von Markern für sekretorische Zellen (Abb. 21A und B). Zur Annotierung wurden Marker für Ziliogenese (*RSPH1* (Radial Spoke Head Component 1), *C9ORF24* (Chromosome 9 open reading frame 24)) sowie Marker für Mukus (*BPIFB1* (BPI Fold Containing Family B Member 1)) verwendet. Die Zilien-Marker waren in der Kontrollgruppe hochreguliert und in der Gruppe mit IL-13 herunterreguliert. Die Expression von Markern für Mukusekretion war in den Organoiden ohne Behandlung niedrig, bei den Organoiden mit IL-13 war die Expression erhöht. Gene, deren entsprechende Proteine sich in der Proteomanalyse differenziell exprimiert zeigten, waren auch in der Einzelzellanalyse weitestgehend differenziell exprimiert (Abb. 21C). Auch der Violinplot zeigt die IL-13-regulierten Gene. Auch hier zeigte sich nach der Behandlung mit IL-13 eine Herunterregulierung der Gene, die mit Zilien verbunden sind. Gene, die mit Mukus assoziiert sind, waren hochreguliert (Abb. 21D).

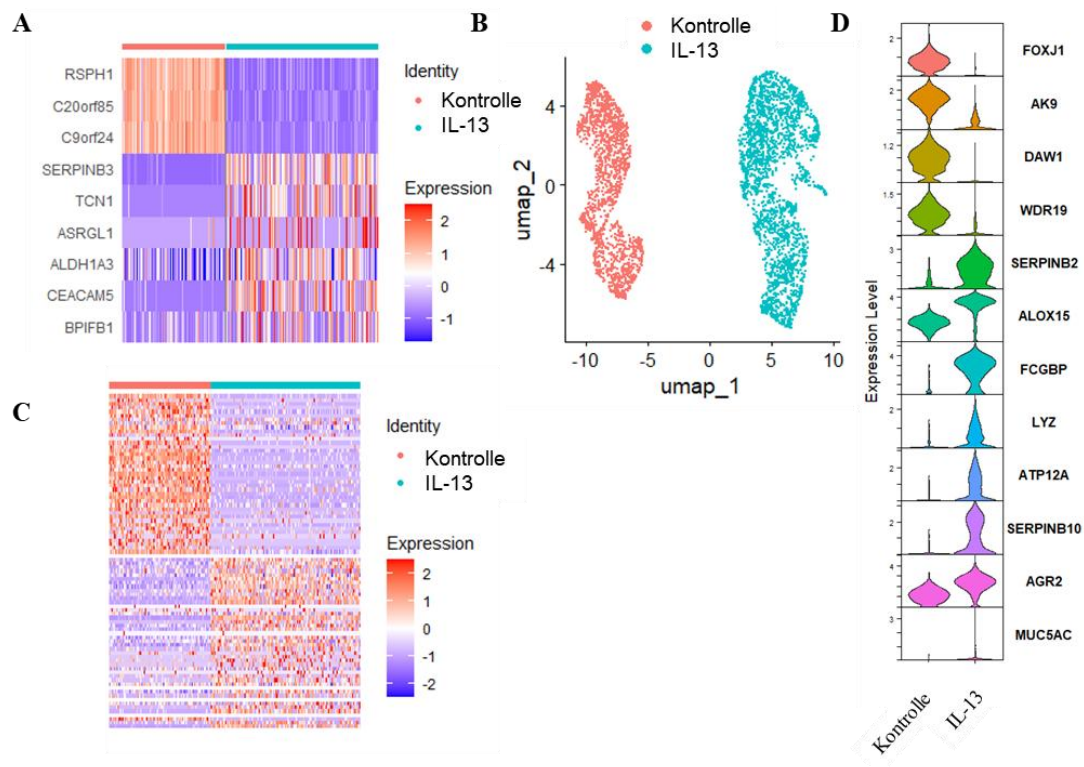


Abb. 21 Stimulation mit IL-13 führte zum Verlust der Zilien. (A) Heatmap für Marker von Flimmer- und Sekretionszellen. (B) UMAP-Visualisierung, farblich nach Gruppen geordnet. (C) Heatmap für Gene, deren entsprechende Proteine in der Proteomanalyse differenziell exprimiert werden. (D) Violinplot, welcher IL-13-regulierte Gene zeigt.

Mit Hilfe der AUCell-Analyse wurde die relative Gensatzanreicherung dargestellt. Die Anreicherung von Genen assoziiert mit Zilienbewegung und Zilienorganisation waren in den Organoide mit IL-13 herunterreguliert im Vergleich zu den Kontroll-Organoiden ohne Behandlung. Die Anreicherung von Gene, welche im Zusammenhang mit Mukussekretion und Sekretorische Zelldifferenzierung stehen, waren in den Organoiden nach Behandlung mit IL-13 erhöht (Abb. 22A). Auch eine Signalweg-Analyse zeigte, dass Signalwege für Zilien nach Behandlung mit IL-13 am stärksten herunterreguliert waren (Abb. 22B).

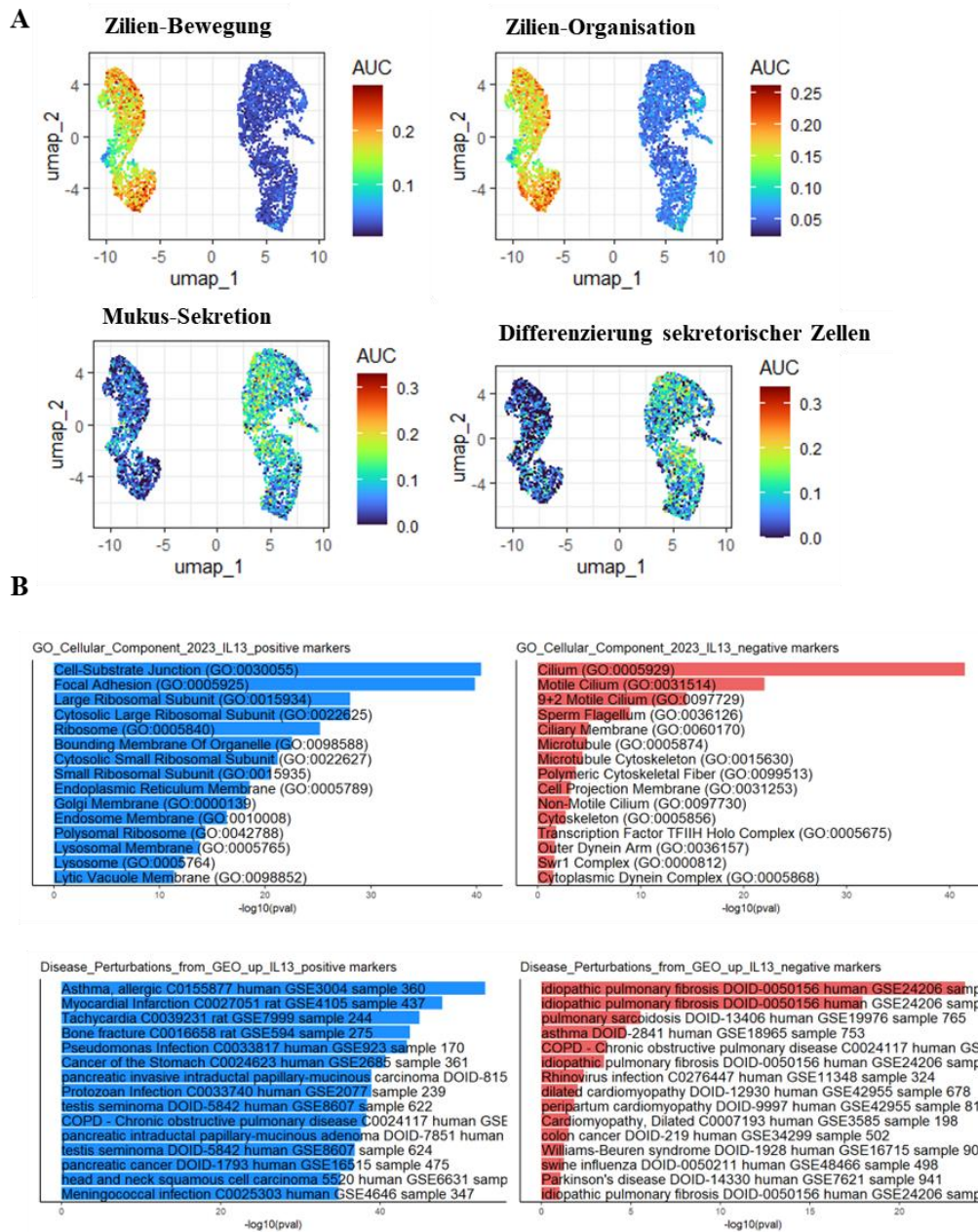


Abb. 22 Die Apikal-Out-Organoiden zeigten nach Stimulation mit IL-13 eine reduzierte Zilienbewegung sowie eine erhöhte sekretorische Zelldifferenzierung. (A) AUCell-Analyse der relativen Gensatzanreicherung. (B) Balkendiagramm der Analyse der Anreicherung von Hallmark-Gensätzen für angereicherte Pfade (GO: Gene Ontology-Gensätze).

3.2.2 Charakterisierung der Differenzierung von Apikal-Out-Organoiden

Im Apikal-Out-Modell differenzieren die Basalzellen zu zilientragenden Organoiden, ohne dass sich Keulenzellen und Becherzellen ausbilden. Es wurden Apikal-Out-Organoiden in An- und Abwesenheit Hitze-inaktivierter NTHi differenziert. Es wurden Einzelzellanalysen an Tag 2, 4 und 8 während der Differenzierungsphase durchgeführt. Es zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede in den Zellclustern zwischen mit NTHi und Kontrollmedium behandelten Kulturen (Abb. 23A). An Tag 2 waren hauptsächlich *KRT15* und *KRT17* exprimierende Basalzellen vorhanden, während an Tag 4 sich eine Differenzierung über frühe und späte deuterosomale Zellen hin zu Zilienzellen zeigte. An Tag 8 machten die Zilienzellen über ein Drittel aller Zellen aus (Abb. 23B bis D). Es zeigte sich eine erhöhte Expression von Markern für Basal (*KRT15*)- und Zilienzellen (*RSPHI*), während Marker für Becherzellen (*SCGB1A1*) nicht exprimiert wurden (Abb. 23E).

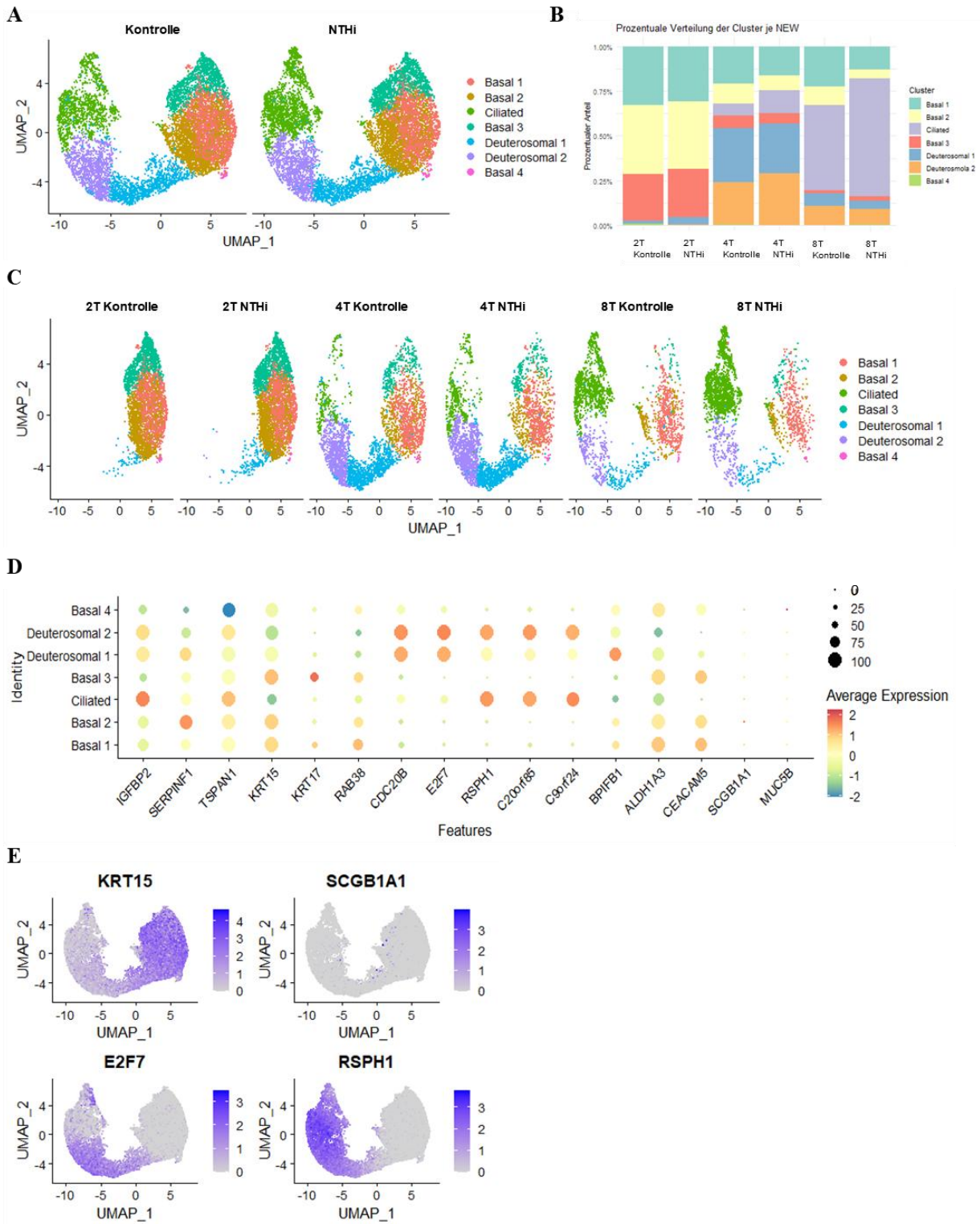


Abb. 23 Die Basalzellen differenzieren über einen Zeitraum von 8 Tagen zu zilienträgenden Organoiden, ohne Becherzellen auszubilden. (A) UMAP-Visualisierung der beiden Gruppen. (B) Anteil der einzelnen Zellcluster. (C) UMAP-Visualisierung der unterschiedlichen Zeitpunkte und Gruppen. (D) Dotplot, der die Expression von Zelltyp-Markern zeigt. (E) UMAP-Visualisierung von Zellmarkern für Basal-, Becher- und Zilienzellen.

Die Monokel-Analyse zeigte, dass sich Basalzellen über deuteromale Zellen zu Flimmerzellen differenzieren (Abb. 24A). Dies zeigte sich auch in AUCell-Analysen, die auf eine Ausprägung sekretorischer Basalzellen über den Differenzierungsweg hinwies, ohne dass es zu einer Expression klassischer Marker für Keulen- und Becherzellen kam (Abb. 24B und C).

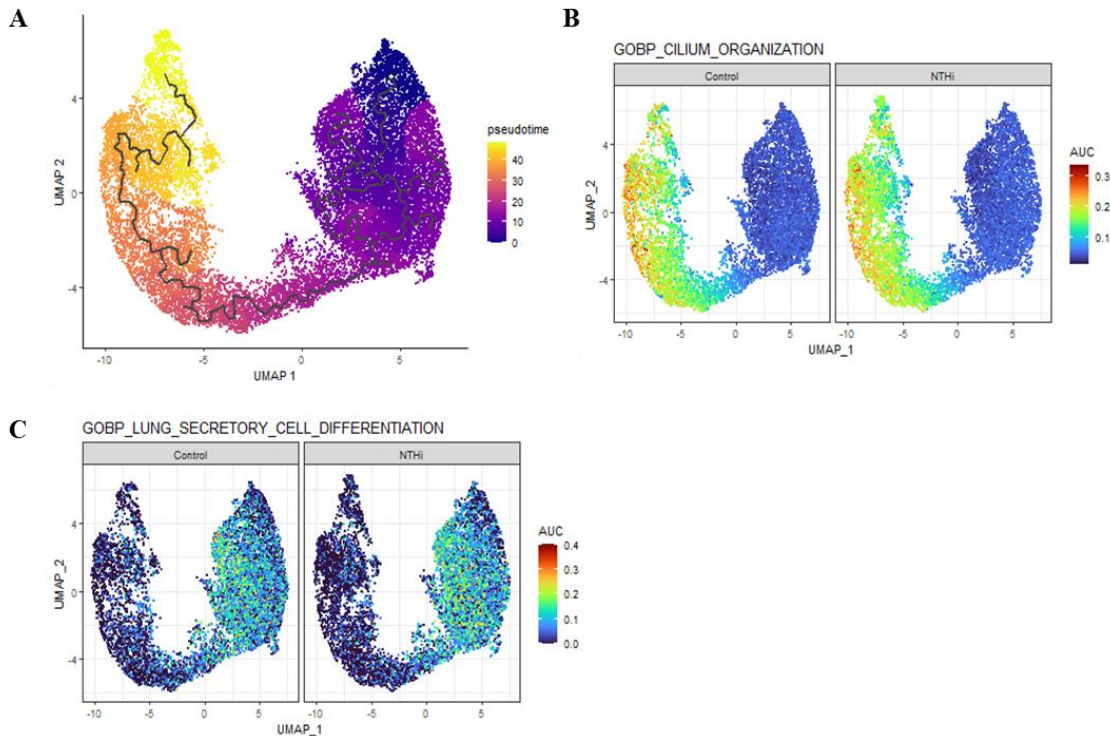


Abb. 24 Basalzellen differenzieren über deuteromale Zellen zu Zilienzellen. (A) Monokelanalyse der Einzelzelldaten. (B-C) AUCell-Analyse der relativen Gensatzanreicherung für Zilienorganisation (B) und sekretorische Zelldifferenzierung (C).

Die Behandlung mit NTHi während der Differenzierungsphase führte zu einer verstärkten Expression von Entzündungsmediatoren (*CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL8*) in Basalzellen. In Richtung Zilienzellen nahm die NTHi-induzierte Entzündung ab (Abb. 25A). Auch eine Signalweg-Analyse zeigte, dass Signalwege für die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und Immunreaktionen durch NTHi aktiviert wurden (Abb. 25B). Dies spiegelte sich auch in der AUCell-Analyse wider (Abb. 25C und D).

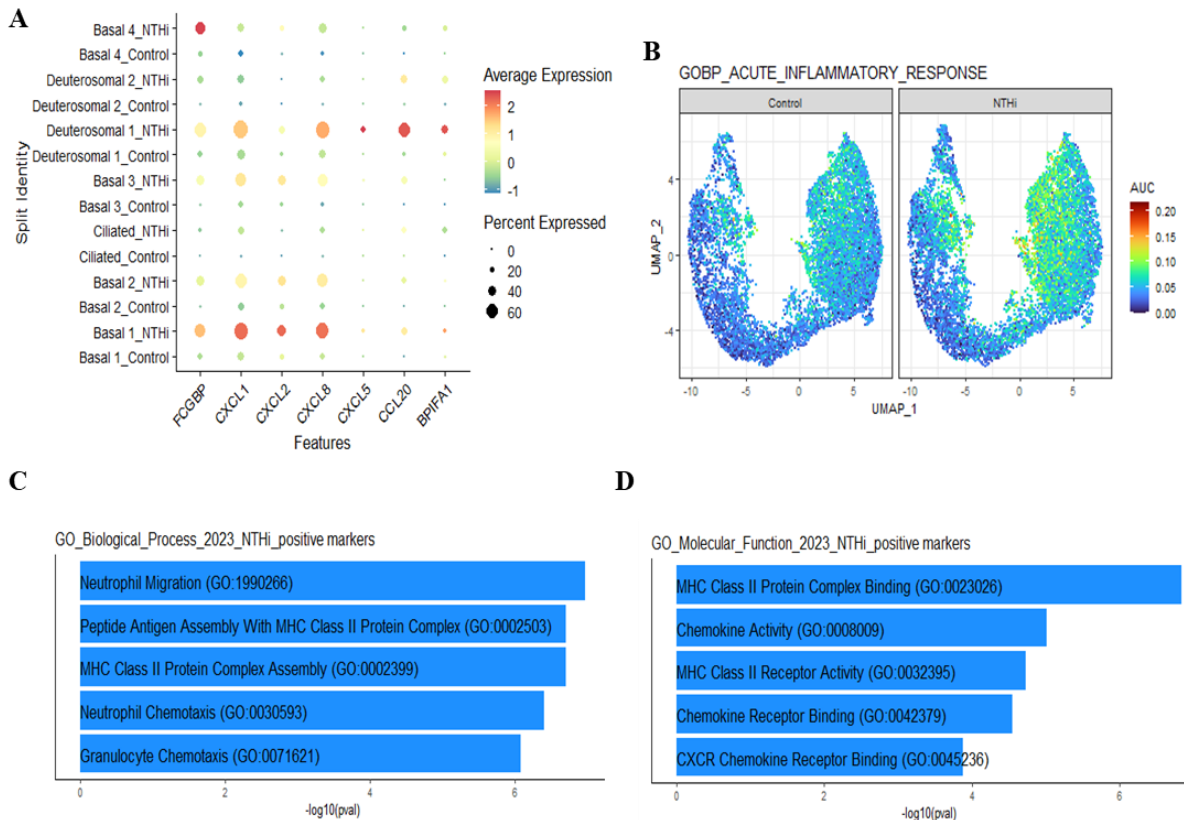


Abb. 25 Die Behandlung mit NTHi während der Differenzierungsphase führte zu einer verstärkten Expression von Entzündungsmediatoren in Basalzellen. (A) Dotplot, der die Expression von Entzündungsmarkern zeigt. (B) AUCCell-Analyse der relativen Gensatzanreicherung für akute Inflammation. (C) Balkendiagramm der Analyse der Anreicherung von Hallmark-Gensätzen für angereicherte Pfade (GO: Gene Ontology-Gensätze).

3.2.3 Testung von Naturstoffen

Im Rahmen mit dem Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland (HIPS) wurden 36 Naturstoffe mit Hilfe der Apikal-Out-Organoiden hinsichtlich Toxizität, Entzündung und Stressantwort getestet. Hierfür wurden Apikal-Out-Organoiden für 14 Tage differenziert und 48 Stunden mit den Naturstoffen in An- und Abwesenheit von hitzeinaktivierten NTHi stimuliert. Die Organoiden wurden nach Behandlung hinsichtlich der Integrität mikroskopisch bewertet, es wurde die Abgabe von LDH, der Entzündungsmediatoren IL-8 und IL-6 und der Stressfaktoren GDF-15 und TIMP-1 in den Kulturüberständen gemessen. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse sind in Tabelle S1 im Anhang aufgeführt. Alle getesteten Substanzen, ausgenommen einer Substanz, zeigten keine Zytotoxizität und Einfluss auf die Integrität der Organoiden nach Stimulation mit den Substanzen in An- und Abwesenheit von inaktivierten Bakterien. Die Substanzen zeigten keine signifikante Veränderung in Entzündung (Expression von IL-6). Die Expression von TIMP-1 war nach Stimulation mit sechs Substanzen signifikant verändert. Acht Naturstoffe zeigten einen Effekt auf die Expression von GDF-15.

Im Folgenden werden die Ergebnisse für ausgewählte Substanzen beispielhaft gezeigt. Die HIPS-Substanz 86 (Leupyrrin) hat eine Wirkungsweise als Hemmer der DNS-, RNS- und Proteinsynthese in Bakterien. Sie wirkt als hochwirksames Antimykotika und besitzt antiproliferative Eigenschaften. Die Substanz wird aus dem gramnegativen Myxobakterium *Sorangium cellulosum* isoliert. Humane Leukozyten-Elastase wurde als erstes molekulares Ziel der Leupyrrine entdeckt [245,276]. Die Substanz 86 zeigte keine Veränderung in der Integrität der Organoide sowie keine Zytotoxizität auf die Organoide (Abb. 26A). Nach Stimulation mit der Kombination aus Bakterien und Substanz zeigte sich eine signifikante Abnahme der IL-8-Expression (Abb. 26B). Die Substanz zeigte eine deutliche anti-inflammatorische Wirkung. Auf die basale Abgabe von GDF-15 und TIMP-1 hatte dieser Naturstoff keine Wirkung (Abb. 26C und D).

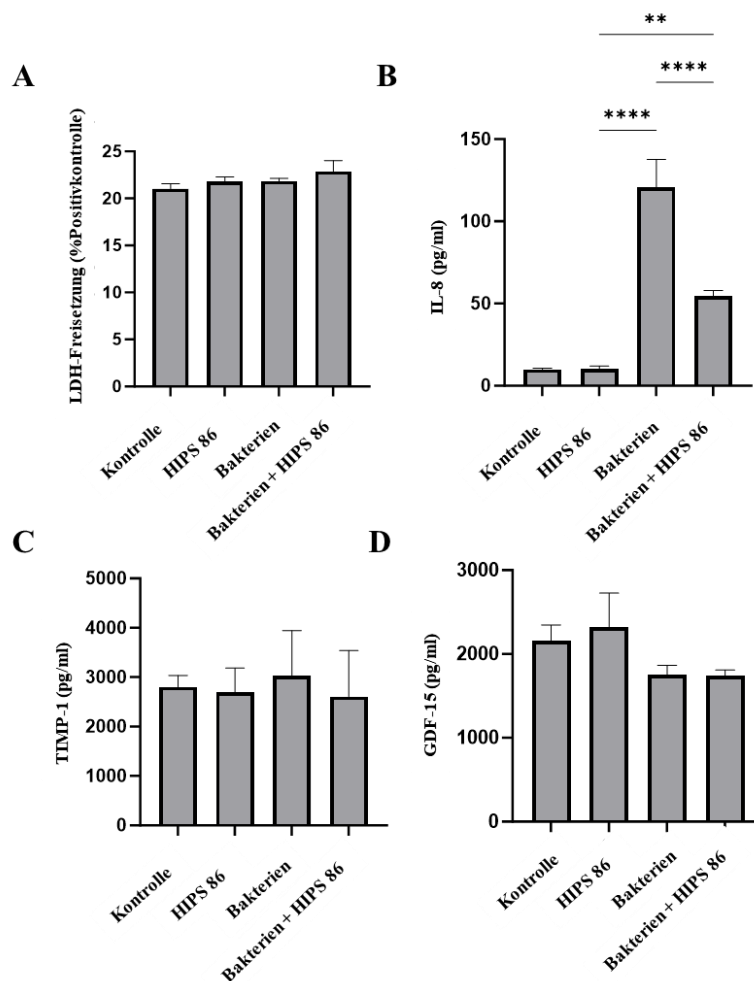


Abb. 26 Die Apikal-Out-Organoide wurden für 48 Stunden mit der HIPS-Substanz 86 und inaktivierten Bakterien stimuliert. (A) Freisetzung von LDH nach Stimulation. Freisetzung von (B) IL-8, (C) TIMP-1 und (D) GDF-15 nach 48-stündiger Stimulation. Die Daten wurden durch eine einfache ANOVA mit Tukeys Mehrfachvergleichen nach dem Test verglichen und sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. ** $p < 0,01$ und * $p < 0,0001$**

Die HIPS-Substanzen 42 und 43 (Argyrine) haben eine Wirkungsweise bei der Proteinsynthese mit dem Ziel des Elongationsfaktor G (FusA). Argyrine hemmen die Proteinsynthese, indem sie die Bindung des Elongationsfaktors EF-G (FusA) an das Ribosom stören. Die Substanzen stammen aus den myxobakteriellen Produzentenstämmen *Archangium gephyra* Ar8082 und *Cystobacter* sp. SBCb004. Sie besitzen antitumor- und immunmodulatorische Eigenschaften und zielen auf den mitochondrialen Elongationsfaktor (EF-G1) in Hefe- und Säugetierzellen ab und reduzieren dadurch die IL-17-Produktion der menschlichen T-Helferzellen. Sie gehören zur Familie natürlich produzierter zyklischer Octapeptide mit vielversprechender antimikrobieller Aktivität gegen *Pseudomonas aeruginosa* und andere gramnegative Erreger [3,200,268].

Die Substanzen zeigten ebenfalls keine Veränderung in der Integrität der Organoide sowie keine Zytotoxizität auf die Organoide (Abb. 27A und E). Nach Stimulation mit der Kombination aus Bakterien und Substanz zeigte sich eine signifikante Zunahme der IL-8-Expression (Abb. 27B und F). Beide Substanzen zeigten eine deutliche pro-inflammatorische Wirkung. Auf die Seneszenz und den Zellstress zeigte sich keine signifikante Wirkung nach Behandlung mit der Substanz (Abb. 27C, D, G und H).

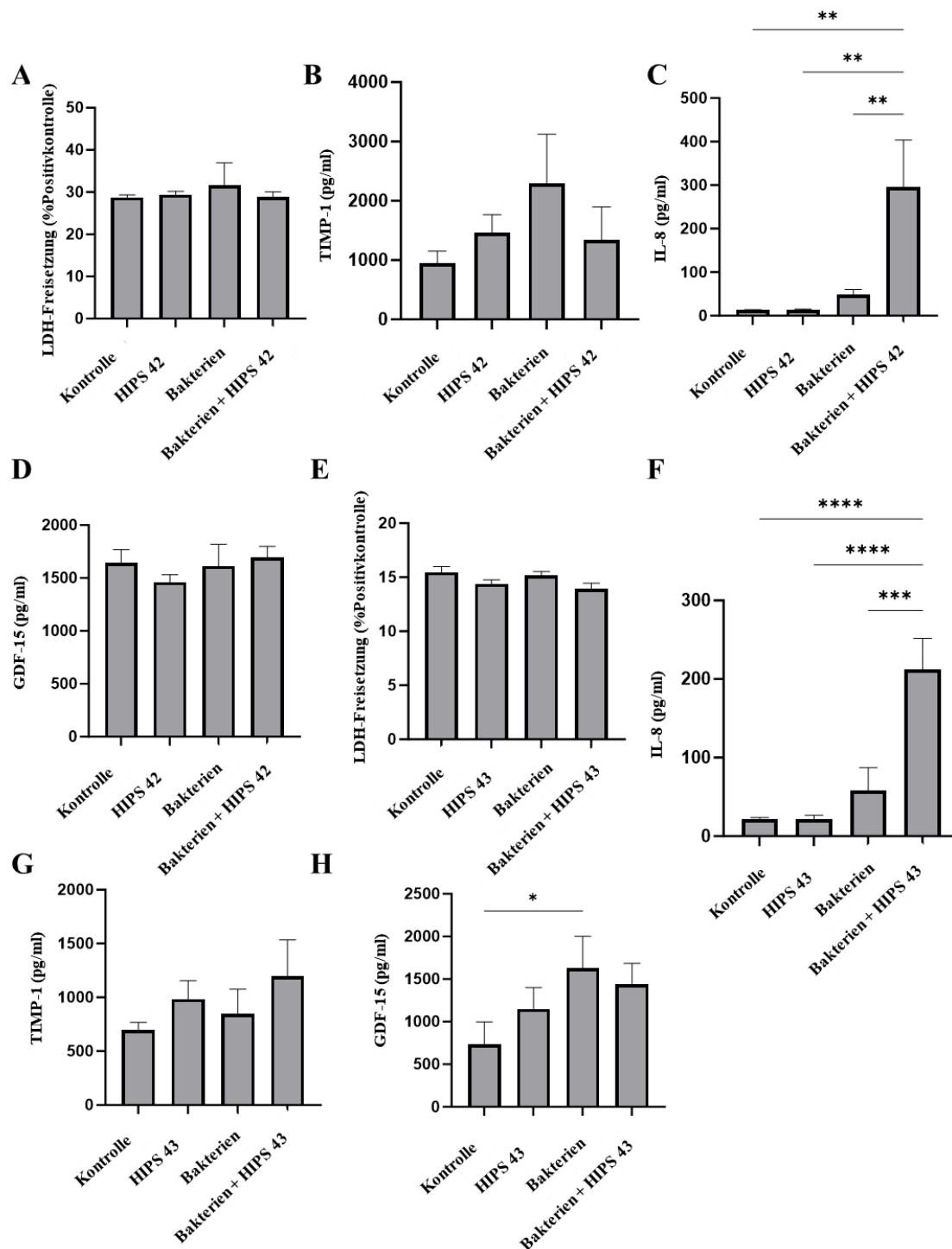


Abb. 27 Die Apikal-Out-Organoiden wurden für 48 Stunden mit den HIPS-Substanz 42 und 43 sowie inaktivierten Bakterien stimuliert. (A) Freisetzung von LDH nach Stimulation mit der Substanz 42. Freisetzung von (B) IL-8, (C) TIMP-1 und (D) GDF-15 nach 48-stündiger Stimulation mit der Substanz 42. (E) Freisetzung von LDH nach Stimulation mit der Substanz 43. Freisetzung von (F) IL-8, (G) TIMP-1 und (H) GDF-15 nach 48-stündiger Stimulation mit der Substanz 43. Die Daten wurden durch eine einfache ANOVA mit Tukeys Mehrfachvergleichen nach dem Test verglichen und sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ und **** $p < 0,0001$.

Die Testung der Naturstoffe belegt die Eignung des Matrigel-freien Organoid-Modells für die präklinische Wirkstoffprüfung.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde ein 3D-Lungenorganoid-Modell zur präklinischen Testung pharmazeutischer Wirkstoffe im Kontext chronischer Atemwegserkrankungen wie COPD und Asthma bronchiale etabliert. Im 96-Well-Format mit in Matrigel kultivierten Organoiden können verschiedene Endpunkte wie Seneszenz, Toxizität, metabolische Aktivität, Bildung und Abgabe von Entzündungsmediatoren und Stressfaktoren, Morphologie, Integrität der Organoiden sowie Proteinexpression innerhalb eines einzigen Versuchszyklus erfasst werden (Abb. 28). Zudem wurde ein Matrigel-freies Organoid-Modell zur Testung von Wirkstoffen weiterentwickelt. Beide Lungenorganoid-Modelle wurden mittels Einzelzellsequenzierung umfassend charakterisiert. In den in Matrigel kultivierten Organoiden konnten zum Beispiel seneszenzartige Zellen und in den Matrigel-freien Organoiden nach IL-13-Behandlung sekretorische Zelltypen identifiziert werden. Zahlreiche innovative Wirkstoffe wurden getestet.

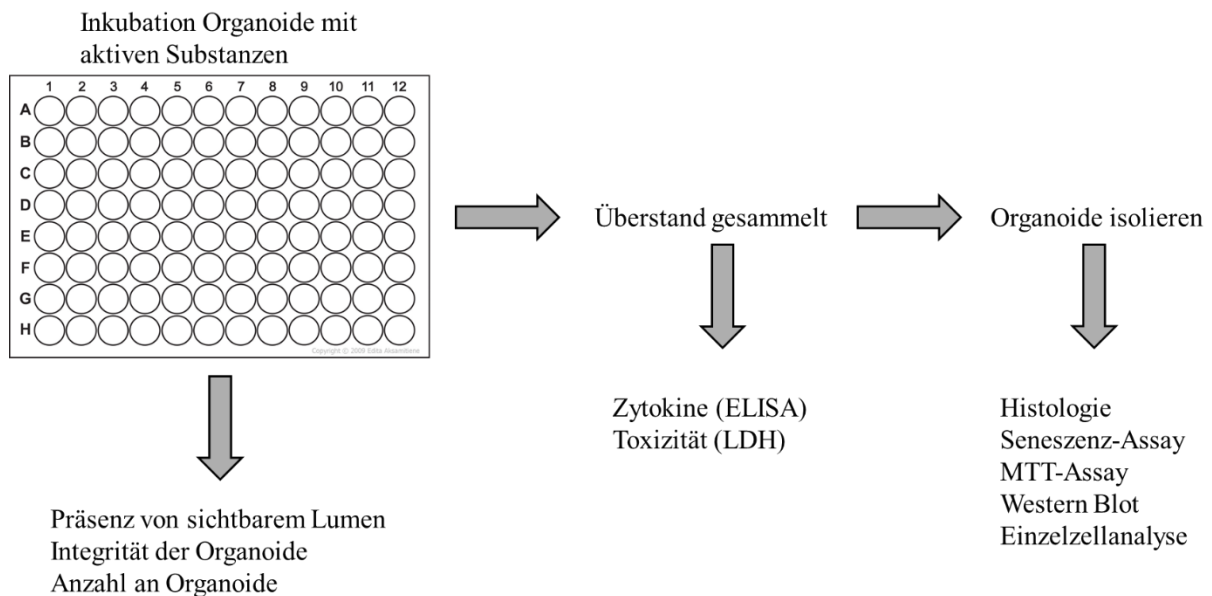


Abb. 28 Schema der 3D-Lungenorganoid-Plattform zur präklinischen Prüfung von Wirkstoffen. Mit der 96-Well-Plattform können verschiedene Endpunkte in einem Testlauf gemessen werden. Fluoreszenzmessungen und mikroskopische Bilder können direkt in der Platte aufgezeichnet werden. In den Überständen können verschiedene Faktoren wie Zytokine gemessen werden. Mit isolierten Organoiden können zahlreiche Methoden wie biochemische Tests und Einzelzellsequenzierung durchgeführt werden.

4.1 Charakterisierung von seneszenzartigen Zellen in 3D-Lungenorganoiden

In der Lunge, wie auch in anderen Organen, steigt die Anzahl der seneszenten Zellen mit zunehmendem Alter an. Es wird angenommen, dass die zelluläre Seneszenz zur Pathogenese chronischer Lungenkrankheiten wie COPD oder Lungenfibrose beiträgt [156]. In der COPD-Lunge sind verschiedene Zelltypen von der Seneszenz betroffen, darunter Epithelzellen der Atemwege, alveoläre Epithelzellen, pulmonale vaskuläre Endothelzellen sowie Fibroblasten [11]. Da sich seneszenzartige Zellen für therapeutische Interventionen eignen, wurde in der vorliegenden Doktorarbeit eine 3D-Lungenorganoid-Plattform zur Identifizierung von Wirkstoffen erstellt, die unter standardisierten Bedingungen auf die Seneszenz, Toxizität und Entzündung des Epithels abzielen.

Der seneszente Phänotyp umfasst einen im Wesentlichen dauerhaften Wachstumsstopp, Resistenz gegen Apoptose, erhöhte Zellgröße mit vergrößerten Kernen und Vakuolen, eine mehrkernige Morphologie, eine veränderte Zusammensetzung der Plasmamembran und eine stark erhöhte SA- β -Gal-Aktivität [62,148,75,103,181,230]. Seneszente Zellen sind unempfindlich gegenüber äußeren Wachstumsreizen bzw. Signalen [105,110,154] und weisen aufgrund aktivierter anti-apoptotischer Signalwege, insbesondere der Bcl-2-Familie, eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Zelltod auf [208,286]. Es gibt jedoch keinen einzigen Marker, über den der seneszente Status einer Zelle zuverlässig und eindeutig bestimmt werden kann [208]. Der erste dokumentierte Biomarker für die Seneszenz ist die erhöhte Aktivität der sauren lysosomalen β -Galactosidase, die als SA- β -Gal bezeichnet wird. SA- β -Gal ist in den meisten seneszenten Zellen aktiv und fehlt in der Mehrzahl der proliferierenden und ruhenden Zellen [140]. Dieser Prozess nutzt die Galactosidase-Aktivität im Lysosom bei einem pH-Wert von 6,0, um seneszente Zellen zu identifizieren, die ein Substrat metabolisieren, um Gewebe und Zellen blau zu färben [194].

Zellkulturstudien zeigten, dass die Induktion von Seneszenz fast jeden Aspekt der Zellbiologie beeinflusst, von deutlichen Veränderungen im Transkriptom und Proteom, epigenetischen Umbau des Chromatins und Veränderungen in der Menge und Funktionalität der Organellen bis hin zu einer verstärkten Sekretion von entzündungsfördernden Molekülen, die allgemein als SASP bekannt sind [100]. Um Seneszenz zu induzieren, verwendeten verschiedene Arbeitsgruppen [119] den Topoisomerase-II-Inhibitor Dox, der eines der am häufigsten verwendeten Chemotherapeutika ist und nachweislich in klinisch relevanten Dosen Seneszenz über mehrere Krebszelllinien hinweg induziert. Dox ist am schädlichsten für Zellen in S/G2-Phasen, und p21 wird transkriptionell als Reaktion auf DNS-Schäden aktiviert [133,159,195,201]. Zur Induktion von Seneszenz in Zellkulturexperimenten können auch andere Stimulatoren wie H₂O₂ [50] sowie Strahlung [121] verwendet werden.

In einer Reihe unabhängiger Experimente mit in konventioneller 2D-Kultur kultivierten Basalzellen verschiedener Spender wurde geprüft, inwieweit die Senotherapeutika Quer und Das der durch Dox induzierten Seneszenz entgegenwirken. Die erzielten Ergebnisse zeigten, dass undifferenzierte Basalzellen nur geringfügig geeignet sind, Wirkstoffe hinsichtlich zellulärer Seneszenz zu testen. Die verschiedenen Behandlungen mit den Wirkstoffen zeigte keine Zytotoxizität auf die 2D-Basalzellen in Kultur. Nach Gabe von Dox konnte keine signifikant erhöhte SA- β -Gal-Aktivität festgestellt werden. Quer reduzierte jedoch die Hintergrundseneszenz. Dies könnte daran liegen, dass sich seneszente Zellen in konventioneller Flüssigkultur ansammeln [40] und durch Quer reduziert werden, wie dies bereits für seneszente menschliche Nabelvenenzellen und aus Knochenmark stammende murine mesenchymale Stammzellen gezeigt wurde [285]. Darüber hinaus erlauben reine Basalzellen keine tiefergehende Analyse der unterschiedlichen Auswirkungen neuartiger Substanzen auf die verschiedenen Zelltypen des Atemwegsepithels, wie sekretorische Zellen und Flimmerzellen. Daher sind Basalzellen und Zelllinien (z. B. Calu-3, A549) im Vergleich zu 3D-Organoiden für die Arzneimittelentwicklung sehr eingeschränkt, insbesondere im Hinblick auf zelluläre Differenzierung, Signalwege und Barrierebildung bzw. Integrität.

Um die 3D-Lungenorganoid-Plattform zu etablieren und verifizieren, wurde in einer Reihe unabhängiger Experimente mit Organoiden verschiedener Spender getestet, inwieweit Dox Seneszenz in differenzierten Atemwegsepithelzellen induziert und Quer und Das der durch Dox induzierten Seneszenz entgegenwirken. Um mögliche zytotoxische Effekte der verwendeten Substanzen zu beurteilen, wurde die Integrität der Bronchosphären dokumentiert und die Stoffwechselaktivität sowie die Freisetzung von LDH und Zytokinen bestimmt. Im Gegensatz zu Zellen, die Apoptose durchlaufen haben, bleiben seneszente Zellen metabolisch aktiv [27,77,78,98,131,282]. Sowohl der Import von Glukose als auch die Aktivität vieler glykolytischer Enzyme sind in seneszenten Zellen erhöht [186]. Der MTT-Assay zeigte, dass Dox zu einer erhöhten metabolischen Aktivität der Organoiden führte. Dies kann an einer erhöhten Aktivität von seneszenzartigen Zellen liegen. Die Einzelzellanalysen zeigten aber auch, dass die Anzahl sekretorischer Zellen unabhängig von Quer nach Dox-Behandlung zunimmt und sekretorische Zellen verstärkt Gene exprimierten, die mit Entgiftung assoziiert sind. Die erhöhte metabolische Aktivität kann also auch im Zusammenhang mit einer Umdifferenzierung des Atemwegsepithels und einer gesteigerten Aktivierung von Becherzellen im Zusammenhang stehen.

Die Dox-Behandlung führte zu einer signifikanten Zunahme der SA- β -Gal, während Quer und Das allein keine Veränderung der Seneszenz im Vergleich zur Kontrolle zeigten. Die Fluoreszenzmikroskopie von mit Seneszenzfarbstoff beladenen Organoiden zeigte auch eine erhöhte SA- β -Gal-Aktivität in Dox-behandelten Organoiden. Zudem wurde die Dox-induzierte erhöhte SA- β -Gal-Aktivität mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen. Die Ergebnisse zeigten, dass Quer und Das der durch Dox induzierten Seneszenz ohne zytotoxische Effekte entgegenwirkten. So verminderten Quer und Das die SA- β -Gal-Aktivität sowohl nach 48-stündiger als auch 96-stündiger Dox-Behandlung.

Es wurde gezeigt, dass Seneszenzmarker, einschließlich p16 und p21, sowohl im Atemwegsepithel als auch im Endothel von Lungenproben von Patienten mit COPD verstärkt exprimiert werden [13,18,64,106,187,196,274]. Die Fluoreszenzfärbung zeigte eine erhöhte Anzahl p21-positiver Kerne sowie eine erhöhte TIMP-2-Expression, ein in dieser Arbeit identifizierter Marker für seneszenzartige Zellen in Lungenorganoiden, nach Behandlung mit Dox. Ebenso zeigte sich eine erhöhte Färbung für TIMP-2 im Zusammenhang mit p21-positiven Kernen. Die Behandlung mit Das und Quer reduzierte die Anzahl der p21-positiven Zellen.

Die Hauptfunktionen von SASP-Proteinen bestehen darin, die Reparatur von geschädigtem Gewebe zu fördern und Makrophagen und Lymphozyten zu rekrutieren sowie die alternden Zellen entfernen, was zur Wiederherstellung normaler Gewebefunktionen führt [20]. IL-6 und IL-8, aber auch Proteasen, anti-Proteasen und Wachstumsfaktoren sind Hauptkomponenten von SASP, von denen gezeigt wurde, dass sie sowohl positive als auch negative Rollen in verschiedenen biologischen Prozessen wie Wundheilung, Gewebereparatur und Tumorprogression spielen [148]. Der SASP gilt als stark zelltypabhängig und vielfältig in sezernierten Faktoren, sodass kein Marker wirklich spezifisch für den Phänotyp allein ist [47]. Die Analyse der Überstände zeigte, dass Quer und Das die Hintergrundfreisetzung von Epithelmediatoren wie TIMP-2 und GDF-15 selektiv hemmen. Die gesteigerte Konzentration von GDF-15 nach 96-stündiger Behandlung mit Dox wurde durch die Behandlung mit Quer in den letzten 48 Stunden vermindert. Die Expression von GDF-15 steigt unter zellulärem Stress und pathologischen Bedingungen. Es wurde berichtet, dass GDF-15 ein Seneszenz-assoziiertes sekretorischer Faktor ist, was auf eine Rolle als autonomer Regulator der zellulären Seneszenz hinweist [261]. Das Protein mit einer Assoziation mit Alterungsprozessen, GDF-15, gehörte zu den am stärksten sezernierten Proteinen in seneszenten Fibroblasten und Epithelzellen, die durch Strahlung induziert wurden [17]. Neue Studien zeigen, dass GDF-15 systemisch wirkt. So vermittelt in der Plazenta gebildetes GDF-15 in der Schwangerschaft Übelkeit [88]. Inwiefern bei Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen systemisch wirkende Faktoren wie GDF-15 aus gealterten bzw. seneszenten Zellen zu einem reduzierten Gesundheitszustand beiträgt ist eine spannende Frage, die weiterer Forschung bedarf.

Die 3D-Lungenorganotide wurden auch mit dem Wirkstoff Metformin behandelt. Met ist ein Antidiabetikum mit pleiotroper Wirkung, das auch auf senescente Zellen wirkt. Met beeinträchtigt unter anderem die SASP von seneszenten Zellen, ohne den proliferativen Arrest zu behindern [66]. Es bekämpft altersbedingte Störungen und verbessert die Gesundheitsspanne durch Abschwächung der Kennzeichen des Alterns. Beim Menschen wird Met seit über 60 Jahren klinisch eingesetzt. Es ist umfassend untersucht, hat ein hohes Sicherheitsprofil und ist einzigartig positioniert, um in mehrere entscheidende Signalwege einzugreifen, die für das Altern und altersbedingte Krankheiten verantwortlich sind [147]. Met hatte keinen Effekt im Seneszenz-Assay. Die Integrität der Organotide wurde durch die Behandlung nicht verändert und es wurde keine Zytotoxizität durch die Behandlung verursacht. Die metabolische Aktivität war nach Behandlung mit Met erhöht. Andere Paper [147,279]

zeigten, dass Met entzündungsfördernde Zytokine unterdrückt und die Proteinspiegel von p16 und p21 sowie die RNS-Spiegel von SASP-Kennzeichen einschließlich IL-6 und IL-8 in menschlichen Fibroblasten durch Met reduziert wurden. HepG2-Zellen, die einer niedrigen Konzentration von Met ausgesetzt waren, waren durch einen vergrößerten und abgeflachten Zellphänotyp gekennzeichnet, der wahrscheinlich mit zellulärer Seneszenz verbunden ist [279]. Es zeigt sich also mehr und mehr, dass die Reaktion auf Wirkstoffe wie Met, Quer, Das und Dox kontext- und zelltypabhängig ist und nur möglichst differenzierte Zellkulturmodelle, im Gegensatz zu Zelllinien, realistische Aufschlüsse über Wirkmechanismen im Organismus geben.

Senescente Zellen sind in vielerlei Hinsicht heterogen – zwischen Individuen, zwischen Geweben und sogar innerhalb der betroffenen Zellpopulation als Reaktion auf denselben Auslöser. Mit dem Aufkommen von Einzelzellanalysen ist eine genaue Charakterisierung von Zellen in ihrem natürlichen Kontext als zum Beispiel seneszent oder nicht-seneszent möglich und überwindet die Schwierigkeiten bei der Markierung seneszenter Zellen [100]. Die Einzelzellsequenzierung ermöglicht Einblicke in die menschliche Evolution, Organentwicklung und -regeneration. Die Technologie basiert auf der Grundannahme, dass die Untergruppe von Genen, die aktiv von einer Zelle transkribiert wird, ein zuverlässiger Messwert für Zelltypen ist und dass die Etablierung dieser Aktivitätsmuster einer Trajektorie folgt, die die Spezifikation des Zellschicksals rekapituliert [155]. In der Lunge liefern Einzelzellanalysen bemerkenswerte Einblicke in die Zelltypzusammensetzung, insbesondere in Bezug auf die alveolären Stammzellen und die mesenchymale Population und ihre Rolle bei der Lungenfibrose [63]. Die Einzelzellanalyse mittels RNS-Sequenzierung beleuchtet die zelluläre Heterogenität, die in den Atemwegen existiert, und hat neue Zellpopulationen mit einzigartigen molekularen Signaturen, Differenzierungsverläufen und vielfältigen Funktionen in Gesundheit und Krankheit identifiziert [111]. Der Vergleich von Organoiden und sich *in vivo* entwickelndem humanem Lungenepithel mittels scRNA-seq zeigt einen hohen Grad an transkriptomischer Ähnlichkeit [174]. Mittels auf der BD Rhapsody-Plattform durchgeführte Einzelzellanalyse konnten in den Organoiden Zellcluster identifiziert werden, die aufgrund allgemein akzeptierter Marker Atemwegsepithelzellen zugeordnet werden konnten: Basalzellen (*KRT5*, *TP63*), Becherzellen (*MUC5B*), deuterosomale Zellen (*E2F7*, *KDELC2*(KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) containing 2)) und Zilienzellen (*FOXJ1*). Die Übergangsbasalzellen waren durch eine graduelle Abnahme der *KRT5*-Expression gekennzeichnet. Trajektorieanalysen können verwendet werden, um dynamische, differenzierende Zelltypen zu untersuchen [111]. Die Trajektorieanalyse zeigte, dass sich Basalzellen über Übergangsbasalzellen zu sekretorischen Zellen sowie über deuterosomale Zellen zu Flimmerzellen differenzieren, was die normale Differenzierung des Atemwegsepithels korrekt widerspiegelt.

p16 ist ein Tumorsuppressorgen, das an der Regulierung der zellulären Seneszenz beteiligt ist, insbesondere durch die Induktion des G1-Zellzyklus-Arrests durch Hemmung von Cyclin-abhängigen Kinasen [132]. p16^{INK4A} ist erforderlich, um den seneszenten Zustand aufrechtzuerhalten. Die

Inaktivierung oder der Verlust von p16^{INK4A} führt zur Umgehung der Seneszenz. Der Zellzyklus-Arrest bei Seneszenz wird weitgehend durch die Aktivierung eines oder beider p53/p21^{WAF1/CIP1} und p16^{INK4A}-Tumorsuppressorwege vermittelt [10,148,168]. Es wurde ein Cluster mit seneszenzartigen Zellen identifiziert, in dem die Zellen die Seneszenzmarker *CDKN1A1* (p21) und *CDKN2A1* (p16) stark exprimierten. Zudem war dieser Cluster durch eine verstärkte Expression der Seneszenzmarker *GDF15* und *TIMP2* gekennzeichnet [94,140]. Auch die Enrichment Analysis (KEGG_2019_Human) wies auf eine seneszenzartige Identität dieser Zellen hin.

Die Velocity-Analyse zeigte, dass Übergangsbazalzellen und sekretorische Zellen auch eine Richtung zu seneszenten Zellen aufweisen, was darauf hindeutet, dass seneszente Zellen aus Zellen im Übergang entstehen. Bemerkenswerterweise war dieser Seneszenzcluster der einzige Cluster, der durch die Quer-Behandlung reduziert wurde. Dies passt zu der Vorstellung, dass Quer durch die selektive Entfernung seneszenten Zellen als senolytisches Medikament wirkt [11]. Es ist jedoch auch möglich, dass Quer die Induktion der Seneszenz unterdrückt oder einen alternativen Zellzustand induziert, der in diesem Fall nicht mit der Eliminierung seneszenten Zellen durch Apoptose einhergehen würde. Weitere Studien sind erforderlich, um die zellulären Mechanismen hinter den Wirkungen von Quer aufzuklären. Weitere Arbeiten [66,92,156,226,285] zeigten, dass die Behandlung mit senolytischen Verbindungen (Kombination Das und Quer) sowohl in Experimenten mit Mäusen als auch in humanen Zellkulturexperimenten die Gesamtzahl der Zellen und der Prozentsatz der seneszenten Zellen und des p16-Expressionsniveaus signifikant verringert. Quercetin schwächte auch die durch Siliziumdioxid (SiO₂) induzierte Seneszenz der Makrophagen von Mäusen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ab und regulierte die Expression von Seneszenzmarker p16, p21 und p53 in der Silikosegruppe herunter [92]. Es wurde auch gezeigt, dass Lungenepithelzellen eine erhöhte p16- und p21-Expression sowie eine SA-β-Gal-Aktivität in experimentellen und humanen Lungenfibrosegeweben und Primärzellen aufweisen [156].

Die Daten der Einzelzellanalyse wurden zudem mit einem weiteren Datensatz unbehandelter Organoide von fünf Spendern kombiniert. Auch in diesem Datensatz konnte der Seneszenzcluster mit Hilfe von Seneszenzmarkern (p21, p16, GDF-15, TIMP-2) annotiert werden. Zusammengenommen konnte in den Organoiden seneszenzartige Zellen identifiziert werden, die durch eine starke Expression von p21, p16, GDF-15 und TIMP-2 gekennzeichnet sind. Inwiefern diese Zellen auch in der Lunge von zum Beispiel COPD-Patienten vorhanden sind oder etwa nach viralen Pneumonien vermehrt vorkommen, müssen künftige Arbeiten zeigen.

Darüber hinaus zeigten die Einzelzelldaten, dass Dox einen starken Effekt auf Becherzellen hat. Die Behandlung mit Dox führte nur in Becherzellen zu einer erhöhten Expression von Genen, die die Entgiftung und den Arzneimittelstoffwechsel vermitteln (z. B. *CYP1A1*, *CYP1B1*, *ALDH1A3*, *AKR1C2*, *ADH1C*) [130,255]. Während Dox keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Organoide hatte, wurden

Becherzellen aktiviert und ihre Anzahl nahm proportional zu. Diese Daten zeigen, dass die verschiedenen Zelltypen des Epithels sehr unterschiedlich auf Wirkstoffe reagieren. In der Plattform zeigen Wirkstoffe daher potenziell akute Nebenwirkungen in bestimmten Zelltypen eines differenzierten Epithels, die z. B. in Zelllinien oder klassischen 2D-Kulturen mit primären Zellen nicht gezeigt werden können. Weitere Paper zeigten, dass Cytochrom P450 CYP1A1 und CYP1A2 eine breite Palette von Fremdverbindungen und Medikamenten metabolisieren können. Humanes CYP1A1 und CYP1A2 sind wichtig für die Definition der Wirksamkeit und Toxizität/Karzinogenität von Arzneimitteln und Fremdstoffen [130]. Clubzellen sind für die Entgiftung schädlicher Substanzen in der Lunge verantwortlich, indem sie eingeatmete Schadstoffe aufnehmen und über ihre Cytochrom-P450-Enzyme abbauen. [26,87,216].

Es wird angenommen, dass die zelluläre Seneszenz eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie chronischer Lungenerkrankungen wie der COPD spielt und seneszente Zellen die Regeneration der Lunge beeinträchtigen und zum Verlust an Lungenfunktion beitragen. Zudem ist es denkbar, dass sich seneszente Zellen im Alter auch in der Lunge anreichern und zum altersbedingten Verlust an Lungenfunktion beitragen, auch ohne zugrundeliegende Lungenerkrankungen. Im Gegensatz zu apoptotischen Zellen, beeinflussen seneszente Zellen weiterhin ihre umgebenden Zellen [132,239]. Dies kann unter anderem über die SASP-Proteine, die zum Beispiel in höheren Konzentrationen von COPD-abgeleiteten Fibroblasten sezerniert werden und an der chronischen Entzündungsreaktion bei COPD beteiligt sein könnten, vermittelt werden [275]. Senolytika werden derzeit in mehr als zehn klinischen Studien zur Behandlung von Erkrankungen getestet, bei denen seneszente Zellen eine Schlüsselrolle in der Pathologie spielen, einschließlich Gebrechlichkeit, chronischer Nierenerkrankungen, Lungenfibrose und Alzheimer. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass Das und Quer die Expression von Seneszenzmarkern in Fettgewebe, Haut und Serum reduzierte [213]. Inwieweit Senolytika in der Lage sind, seneszenzartige Zellen in der Lunge von Patienten effektiv zu eliminieren und so zu einem verminderten Krankheitsverlauf oder sogar zu einer Regeneration der Lunge beizutragen, müssen künftige Studien zeigen.

4.2 Matrigel-freie Organoide entwickeln nach Behandlung mit IL-13 einen sekretorischen Phänotyp

Bei in Matrigel kultivierten Lungenorganoiden sind die Zilien nach innen ins Lumen gerichtet. Das schränkt den Zugang zur apikalen Zelloberfläche ein, also zu der Seite der Zellen, die *in vivo* der Umgebung ausgesetzt ist. Besonders betroffen sind Partikel (z. B. Feinstaub, Bakterien, Nano-Carrier) und allgemein Wirkstoffe, die über die Atemwege verabreicht werden sollen. Diese Unzugänglichkeit behindert die Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Wirtspathogen und Reaktionen auf Umweltstimuli, die hauptsächlich an der apikalen Oberfläche auftreten. Um diese Einschränkung zu umgehen, wurden in der vorliegenden Arbeit Apikal-Out-Organoide weiterentwickelt. Apikal-Out-

Organoide bestehen ausschließlich aus Basal- und Zilienzellen, wobei die Zilien nach außen gerichtet sind. Der einfache Zugang zur apikalen Oberfläche des Epithels bieten daher ein leistungsstarkes *in vitro*-Modell, das für die Untersuchung von Umweltstimuli und Arzneimittel geeignet ist [237].

Zytokine wie IL-13 tragen bei chronischen Lungenerkrankungen wie Asthma wesentlich zur Becherzellhyperplasie und zur vermehrten Schleimproduktion bei [151]. Die Zugabe von IL-13 während der Differenzierungsphase konnte diese Effekte teilweise nachbilden und führte zu einer deutlichen Verschiebung der Zellpopulationen, weg von Zilienzellen hin zu sekretorischen Zellen. In der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie zeigte sich nach IL-13-Stimulation eine verstärkte MUC5B-Färbung. Entsprechend belegte auch die IHC-Färbung eine Zunahme becherzellartiger Zellen. Die semiquantitative RT-PCR-Analyse bestätigte diese Befunde: Die relative Expression von *MUC5AC* war signifikant erhöht, während die Expression des Zilienmarkers *FOXJ1* deutlich abnahm. Funktionell äußerte sich die IL-13-Behandlung in den Apikal-Out-Organoiden durch eine stark reduzierte Bewegung bzw. Rotation der Organoide und eine geringere Anzahl an Zilien. Darüber hinaus führte die Stimulation zu einer signifikanten Zunahme der Organoidanzahl, ging jedoch mit einem verringerten Durchmesser einher. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit einer parallel zu dieser Arbeit erschienenen Studie von Wijesekara et al. [269], in der Apikal-Out-Organoide ebenfalls während des gesamten Differenzierungsprozess mit IL-13 stimuliert wurden. Auch hier führt die Stimulation mit IL-13 zu einer massiven Induktion von Becherzellen und einer verminderten Beweglichkeit [269].

Weitere Paper [69,124,255] zeigten, dass die IL-13-Stimulation den zellulären Umbau des mukoziliären Epithels vorantreibt. Die IL-13-Behandlung von Bronchosphären reduzierte den Anteil der Flimmerzellen in den Kulturen signifikant. Es wurde gezeigt, dass sich entwickelnde Bronchosphären auf IL-13 mit einer Zunahme der Expression von Markern von Becherzellen und einer Abnahme der Anzahl der Flimmerzellen reagieren [70]. In Zellkulturexperimenten mit humanen Air-Liquid Interface Kulturen erhöhte IL-13 nicht nur die Sekretion von Schleim oder MUC5AC-Protein in schleimsekretorischen Zellen, sondern verändert transkriptionell und funktionell die Natur aller Zelltypen im Epithel [127]. Eine akute IL-13-Stimulation reicht aus, um die zelluläre Zusammensetzung des reifen Atemwegsepithels zu verändern. Weder die Proliferation noch die Apoptose nahmen mit IL-13-Stimulation zu. Der IL-13-modifizierte Schleim verlangsamt die Frequenz des Zilienschlags und stoppt den mukoziliären Transport. Es zeigte sich ein nahezu vollständiger Verlust der mukoziliären Bewegung in Kulturen, die chronisch mit IL-13 stimuliert wurden. Dieser Verlust könnte auf eine Dysfunktion oder Verminderung der Zilien und/oder auf die Veränderung der Schleimeigenschaften zurückzuführen sein [269]. IL-13 und das eng verwandte Zytokin IL-4 beeinflussen das Atemwegsepithel direkt über gemeinsame Rezeptoren [96,151,258].

Diese Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist, mit spezifischen Zytokinen die Differenzierung weiterer Zelltypen, wie Becherzellen, zu induzieren und dass das Apikal-Out-Modell auf entzündliche,

krankheitsrelevante Reize reagiert. Das Apikal-Out-Modell ist also zur Testung von Wirkstoffen geeignet. So ist zum Beispiel die Zilienfunktionsstörung bei chronischen Lungenerkrankungen ein pathologischer Befund [269]. Die Beweglichkeit der Organoide ist ein, gerade auch in Hochdurchsatz-Formaten, einfach zu erhebender Parameter, der aufzeigt, inwiefern Wirkstoffe Ziliogenese stützen und den durch Zytokine wie IL-13 hervorgerufenen Umbau des Atemwegsepithels entgegenwirken.

Um das Modell näher zu charakterisieren, wurden die Organoide an Tag 14 mittels Proteom- und Einzelzellanalysen untersucht. Durch die Einzelzellanalyse und die Annotierung anhand spezifischer Zellmarker ließ sich eine klare Unterscheidung zwischen Kontroll- und IL-13-behandelten Organoiden feststellen. Während die Kontroll-Organoide überwiegend aus wenigen Basal- und Zilienzellen zusammengesetzt waren, führte IL-13 zu einer verminderten Expression von Zilien-Markern und einer verstärkten Expression sekretorischer Zellmarker. Die IL-13 behandelten Organoide zeigten eine Hochregulierung von Becherzell-assoziierten Genen, während in unbehandelten Organoiden Gene assoziiert mit Zilienzellen hochreguliert waren. IL-13 hemmte somit die Expression von Markern für Zilien und erhöhte die Expression von Markern für sekretorische Zellen. Die Proteom- und Einzelzellanalyse zeigten, dass IL-13 behandelte Apikal-Out-Organoide eine erhöhte Expression von Sekretionsmarkern wie *FCGBP*, *ALOX15* und *SERPINB2* sowie eine entsprechende Abnahme der Flimmerzellmarker aufwiesen. Die AUCell-Analyse zeigte, dass die Anreicherung von Genen assoziiert mit Zilienbewegung und Zilienorganisation in den Organoiden mit IL-13 herunterreguliert waren im Vergleich zu den Kontroll-Organoiden ohne Behandlung. Die Anreicherung von Genen, welche im Zusammenhang mit Mukussekretion und Sekretorische Zelldifferenzierung stehen, waren in den Organoiden nach Behandlung mit IL-13 erhöht. Auch eine Signalweg-Analyse zeigte, dass Signalwege für Zilien nach Behandlung mit IL-13 am stärksten herunterreguliert waren. Es ergab sich eine hohe Korrelation zwischen der Proteom- und der Einzelzellanalyse bezüglich der Herunterregulierung von Zilien-assoziierten Signalwegen und differenziell exprimierten Genen. Die IHC-Färbung bestätigte, dass *FCGBP* und *ALOX15* nach Stimulation mit IL-13 hochreguliert vorliegen. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit der Studie von Jackson et al., die zeigte, dass die Stimulation von Air-Liquid Interface Kulturen mit IL-13 zu einer verstärkten Expression von Genen führt, wie es auch im Epithel von Kindern mit dem Asthma endotype T2H (type 2 cytokine-high) der Fall ist [127].

Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass IL-13 die zelluläre Zusammensetzung von Apikal-Out-Organoiden in Richtung eines sekretorischen Phänotyps verschiebt, was die Umgestaltung der Atemwege bei Krankheiten wie Asthma nachahmt und mit früheren Beobachtungen seiner Rolle bei Zilienverlust, Becherzellhyperplasie und Schleimproduktion übereinstimmt. Die Fähigkeit von Apikal-Out-Organoiden, durch IL-13 induzierte zelluläre Veränderungen robust nachzubilden, unterstreicht ihr Potenzial als physiologisch relevantes Modell für die Untersuchung der Epithel-Umgestaltung bei entzündlichen Atemwegserkrankungen.

Die Apikal-Out-Konformation der Organoide ermöglicht die direkte Einführung von respiratorischen Krankheitserregern und Schadstoffe auf die apikale Atemwegsoberfläche in einer nicht-invasiven Weise. In der nativen menschlichen Lunge ist die apikale Atemwegsoberfläche direkt der äußeren Umgebung ausgesetzt und ist daher die Hauptschnittstelle, die mit respiratorischen Pathogenen wie Bakterien und Viren interagiert [269]. Zur Charakterisierung der Matrigel-freien Organoide wurden diese in Anwesenheit von Hitze-inaktivierten NTHi differenziert und nach 2, 4 und 8 Tagen mittels Einzelzellanalysen untersucht. An Tag 2 lagen hauptsächlich Basalzellen vor, während an Tag 4 neben Basalzellen zahlreiche deuteromale Zellen und wenige Zilienzellen nachgewiesen werden konnten. An Tag 8 waren neben Basal- und deuteromalen Zellen ein ausgeprägtes Cluster mit Zilienzellen vorhanden. In dem Modell kann also nachvollzogen werden, wie Basalzellen über deuteromale Zellen zu Zilienzellen differenzieren. Der sekretorische Zellmarker *SCGB1A1* wird von Apikal-Out-Organoiden nicht exprimiert. In diesem Modell ist die Differenzierung zu Zilienzellen also nicht auf Keulen- oder Becherzellen angewiesen wie es für Air-Liquid-Interface-Kulturen gezeigt wurde [176].

Zwischen NTHi und Kontrollmedium behandelten Kulturen zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede in den Zellclustern. Es zeigte sich eine verstärkte Expression von Entzündungsmediatoren in Basalzellen nach der Behandlung mit NTHi, die die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten vermitteln. Dieses Ergebnis ist besonders für COPD-Patienten relevant, die häufig chronisch mit NTHi besiedelt sind [231]. Inwiefern sich solche entzündlichen Basalzellen in den Bronchien von COPD-Patienten wiederfinden, müssen weitere Studien zeigen.

4.3 3D-Lungenorganoid-Modelle als Ersatz von Tierversuchen

Trotz wichtiger Fortschritte in der Therapie akuter und chronischer Lungenerkrankungen besteht nach wie vor ein großer ungedeckter Bedarf an der Entwicklung sicherer und wirksamer Medikamente und krankheitsmodifizierter Behandlungen. So gibt es zum Beispiel keine medikamentösen Behandlungen, die das Fortschreiten der COPD und die hiermit verbundenen Alterungsprozesse verringern [13]. Tiermodelle, meist Mäuse und Ratten, spielen nach wie vor eine wichtige Rolle bei der Charakterisierung der Pathophysiologie von Krankheit und dem hiermit verbundenen Verlust an Regenerationsfähigkeit sowie der Identifizierung von Wirkstoffzielen, der Bewertung neuer Therapeutika auf Toxizität, Sicherheit, Pharmakokinetik, Pharmakodynamik und Wirksamkeit für die Wirkstoffentwicklung. Dennoch sind Tiermodelle aus ethischen Gründen und wegen ihrer Mängel bei der Vorhersage von Krankheitsmechanismen, Toxizität, Sicherheit und Wirksamkeit neuer Medikamente beim Menschen in der Kritik [233].

Humane Organoid-Modelle haben gegenüber Tiermodellen eine Reihe erheblicher Vorteile: Zunächst vermeiden sie ethische Probleme der Tierversuche. Eine Translation der Ergebnisse in die Situation im Menschen ist unmittelbar möglich, da menschliche Primärzellen verwendet werden können und die Problematik der evolutionären Divergenz von Lungenzelltypen und Expressionsmustern zwischen

Nagern und Mensch umgangen wird [247]. Zudem können Organoide in großen Zahlen in kleinen Formaten bis hin zu 384-Well-Platten kultiviert werden, was zahlreiche Testungen in einem Durchlauf ermöglicht. Sie liefern schnelle und robuste Ergebnisse und sind leicht zugänglich. Darüber hinaus ermöglichen sie patientenspezifische Untersuchungen im Sinne der personalisierten Medizin und sind gut geeignet, komplexe Krankheitsverläufe sowie die Wirkung neuer Medikamente in einem humanrelevanten Kontext nachzubilden [135].

Die Charakterisierung der Modelle mit ausgewählten Substanzen wie Dox und Quer sowie die Testung neuer Wirkstoffe zeigten, dass sie sich zur Untersuchung zahlreicher Parameter, wie Toxizität, Viabilität, Entzündung und metabolische Aktivität, eignen. Dabei können gängige und leicht durchführbare molekulare und biochemische Testverfahren ebenso eingesetzt werden wie Fluoreszenzmikroskopie und Histologie, sodass sich eine Vielzahl von Analysen parallel in einem Durchlauf realisieren lassen. Zudem zeigten die Einzelzellanalysen, dass sich die Systeme auch für die Aufklärung Wirkstoff-induzierter zellulärer Prozesse bzw. Zelltyp-spezifischer Effekte eignen. So führte die Behandlung mit Dox zu einer verstärkten Expression von Entgiftungsgenen nur in Becherzellen und die Stimulation mit IL-13 zu einer verminderten Ziliogenese und Differenzierung zu sekretorischen Zellen. Eine ähnlich genaue Darstellung der Zelltyp-spezifischen Wirkungsweise von Wirkstoffen ist mit einfachen 2D-Kulturen und Zelllinien nicht möglich. Solche eingehenden Analysen mit menschlichen Organoiden sind hinsichtlich zellulärer Mechanismen und der Wirkung auf den Menschen aufschlussreicher als Tierstudien, insbesondere wenn die Unterschiede zwischen den Arten berücksichtigt werden [63].

Die am häufigsten verwendete Basalmembran bzw. Matrix zur Kultivierung von Organoiden, Matrigel, wird aus dem EHS-Sarkom tumorbelasteter Mäuse gewonnen. Das notwendige Wachstum von Tumoren bei Mäusen geht mit erheblichen ethischen Bedenken einher [63]. Matrigel enthält eine große, heterogene Menge an EZM-Komponenten wie Laminin, Kollagen IV und Wachstumsfaktoren [79]. Matrigel ist eine komplexe, weitgehend undefinierte Mischung aus Tausenden von Proteinen, die aufgrund von Variationen von Charge zu Charge sowie Variationen der mechanischen Eigenschaften Variabilität in Organoid-Kulturen einführen kann. Der Hauptvorteil dieser natürlichen Matrices ist das Vorhandensein einer komplexen Mischung aus EZM-Komponenten und Wachstumsfaktoren, die das Zellwachstum und die Differenzierung sehr effizient macht. Diese Komplexität und die Variabilität in der Zusammensetzung erschweren jedoch die Kontrolle der Kulturmgebung und können die Reproduzierbarkeit verringern [217]. Die Untersuchung von Wirkstoffen im Hinblick auf Toxizität und Entzündungsreaktionen bei NTHi-induzierter Entzündung sowie ergänzende Einzelzellanalysen verdeutlichen, dass Matrigel-freie Lungenorganoid-Modelle hervorragend für die Wirkstoffentwicklung und die Erforschung zellulärer Mechanismen geeignet sind. Durch Stimulation mit IL-13 ließ sich zudem ein Phänotyp induzieren, der die Testung von Wirkstoffen ermöglicht, die krankheitsrelevante

Signalwege, beispielsweise im Kontext von Asthma, adressieren. Damit lassen sich in diesem tierfreien Modell gezielt zentrale Aspekte chronischer Lungenerkrankungen nachbilden.

Organoid-Modelle haben aber auch Nachteile. Da es sich bei Organoiden um geschlossene Strukturen handelt, denen Gewebe-Gewebe-Schnittstellen, Gefäßfluss, zirkulierende Immunzellen und physiologisch relevante mechanische Signale fehlen, können sie die Reaktionen auf Organebene nicht vollständig rekapitulieren und daher im Moment noch unzureichend zur Untersuchung von Arzneimittelwirkungen unter pharmakologisch relevanten Bedingungen verwendet werden [122]. Vor allem Prozesse, an denen das adaptive Immunsystem beteiligt ist, sind in Organoid-Modellen schwer abbildbar. Ein wesentlicher Grund für die begrenzte Lebensdauer von Organoiden liegt darin, dass die Diffusion ab einer bestimmten Größe nicht mehr ausreicht, um alle Zellen ausreichend mit Nährstoffen zu versorgen und so ihr weiteres Wachstum und ihre Entwicklung zu unterstützen. Zudem zeigen die Zellen im Vergleich zur Situation im Organismus eine wesentlich höhere Proliferation. Eine weitere Entwicklung der Organoid-Modelle ist notwendig, um zum Beispiel über die Vaskularisierung der Organoiden sich der Situation im Organismus weiter anzunähern, sodass zum Beispiel Nährstoffe über Kapillare verteilt werden. Eine weitere Strategie, um die Vaskularisierung des wachsenden Gewebe zu fördern, wäre die Integration von Endothelzellen oder deren Vorläuferzellen während der Organoidbildung [217].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die 3D-Lungenorganoid-Plattform eine verbesserte Bewertung und Vorauswahl einer breiten Palette von Verbindungen (z. B. Naturstoffe, pharmazeutisch zugelassene Phytoextrakte oder Antiphlogistika) hinsichtlich Seneszenz, Entzündung und Toxizität in präklinischen Studien ermöglicht. Durch die Verwendung differenzierter menschlicher Zellen und moderner Methoden zur Analyse zellulärer Signalwege werden solche Plattformen zunehmend Tierversuche ersetzen. Auf diese Weise leistet das Testsystem einen wesentlichen Beitrag zu einer angemessenen Auswahl von Substanzen, die für eine weitere präklinische Bewertung von Interesse sind und, falls überhaupt erforderlich, in Tierversuchen weiter evaluiert werden.

4.4 Schlussbemerkung

In dieser Arbeit wurden innovative 3D-Lungenorganoid-Modelle als präklinische Plattformen für die Testung pharmakologischer Wirkstoffe im Kontext chronischer Atemwegserkrankungen entwickelt und charakterisiert. Die Modelle erlauben eine Vielzahl relevanter Endpunkte, von Zellviabilität und Stressreaktionen bis hin zu Signalweg-Analysen durch Einzelzellsequenzierung, innerhalb eines einzigen Versuchszyklus standardisiert zu erfassen. Gerade gegenüber Tiermodellen bietet die Organoid-Technologie entscheidende Vorteile. Sie basiert auf humanen Primärzellen, kann bei Bedarf patientenspezifische Unterschiede berücksichtigen und ermöglicht potenziell eine personalisierte Identifikation vielversprechender Wirkstoffe. All dies steigert die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die klinische Situation und trägt maßgeblich zur Reduktion von Tierversuchen bei. Langfristig eröffnen die hier entwickelten Analyseplattformen das Potenzial, nicht nur zur Wirkstoffentwicklung bei COPD und Asthma beizutragen und Krankheitsmechanismen besser zu verstehen, sondern auch auf weitere Lungenerkrankungen wie Lungenfibrose ausgeweitet zu werden. Somit stellt diese Arbeit einen wichtigen Schritt in Richtung einer patientennahen, präzisen und ethisch verantwortungsvollen Wirkstofftestung dar.

Literaturverzeichnis

1. Acosta JC, O’Loghlen A, Banito A, Guijarro MV, Augert A, Raguz S, Fumagalli M, Da Costa M, Brown C, Popov N, Takatsu Y, Melamed J, d’Adda Di Fagagna F, Bernard D, Hernando E, Gil J (2008) Chemokine Signaling via the CXCR2 Receptor Reinforces Senescence. *Cell* 133:1006–1018
2. Algire C, Moiseeva O, Deschênes-Simard X, Amrein L, Petruccelli L, Birman E, Viollet B, Ferbeyre G, Pollak MN (2012) Metformin Reduces Endogenous Reactive Oxygen Species and Associated DNA Damage. *Cancer Prevention Research* 5:536–543
3. Almeida L, Dhillon-LaBrooy A, Castro CN, Adossa N, Carriche GM, Guderian M, Lippens S, Dennerlein S, Hesse C, Lambrecht BN, Berod L, Schauser L, Blazar BR, Kalesse M, Müller R, Moita LF, Sparwasser T (2021) Ribosome-Targeting Antibiotics Impair T Cell Effector Function and Ameliorate Autoimmunity by Blocking Mitochondrial Protein Synthesis. *Immunity* 54:68–83.e6
4. Amsellem V, Gary-Bobo G, Marcos E, Maitre B, Chaar V, Validire P, Stern J-B, Noureddine H, Sapin E, Rideau D, Hue S, Le Corvoisier P, Le Gouvello S, Dubois-Randé J-L, Boczkowski J, Adnot S (2011) Telomere Dysfunction Causes Sustained Inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 184:1358–1366
5. Angelidis I, Simon LM, Fernandez IE, Strunz M, Mayr CH, Greiffo FR, Tsitsiridis G, Ansari M, Graf E, Strom T-M, Nagendran M, Desai T, Eickelberg O, Mann M, Theis FJ, Schiller HB (2019) An atlas of the aging lung mapped by single cell transcriptomics and deep tissue proteomics. *Nat Commun* 10:963
6. Anisimov VN, Berstein LM, Egormin PA, Piskunova TS, Popovich IG, Zabezhinski MA, Tyndyk ML, Yurova MV, Kovalenko IG, Poroshina TE, Semenchenko AV (2008) Metformin slows down aging and extends life span of female SHR mice. *Cell Cycle* 7:2769–2773
7. Aumann I, Prenzler A, Welte T, Gillissen A (2014) Epidemiologie und Kosten von Asthma bronchiale in Deutschland – eine systematische Literaturrecherche. *Pneumologie* 68:557–567
8. Bailey KL, Bonasera SJ, Wilderdyke M, Hanisch BW, Pavlik JA, DeVasure J, Robinson JE, Sisson JH, Wyatt TA (2014) Aging causes a slowing in ciliary beat frequency, mediated by PKC ϵ . *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 306:L584–L589

9. Baker DJ, Wijshake T, Tchkonja T, LeBrasseur NK, Childs BG, Van De Sluis B, Kirkland JL, Van Deursen JM (2011) Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 479:232–236
10. Baker DJ, Childs BG, Durik M, Wijers ME, Sieben CJ, Zhong J, A. Saltness R, Jeganathan KB, Verzosa GC, Pezeshki A, Khazaie K, Miller JD, Van Deursen JM (2016) Naturally occurring p16Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* 530:184–189
11. Baker JR, Donnelly LE, Barnes PJ (2020) Senotherapy: A New Horizon for COPD Therapy. *Chest* 158:562–570
12. Bao L, Deng W, Huang B, Gao H, Liu J, Ren L, Wei Q, Yu P, Xu Y, Qi F, Qu Y, Li F, Lv Q, Wang W, Xue J, Gong S, Liu M, Wang G, Wang S, Song Z, Zhao L, Liu P, Zhao L, Ye F, Wang H, Zhou W, Zhu N, Zhen W, Yu H, Zhang X, Guo L, Chen L, Wang C, Wang Y, Wang X, Xiao Y, Sun Q, Liu H, Zhu F, Ma C, Yan L, Yang M, Han J, Xu W, Tan W, Peng X, Jin Q, Wu G, Qin C (2020) The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice. *Nature* 583:830–833
13. Barnes PJ, Baker J, Donnelly LE (2019) Cellular Senescence as a Mechanism and Target in Chronic Lung Diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 200:556–564
14. Barnes PJ (2022) Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Antioxidants* 11:965
15. Bartalesi B, Cavarra E, Fineschi S, Lucattelli M, Lunghi B, Martorana PA, Lungarella G (2005) Different lung responses to cigarette smoke in two strains of mice sensitive to oxidants. *Eur Respir J* 25:15–22
16. Basil MC, Cardenas-Diaz FL, Kathiriya JJ, Morley MP, Carl J, Brumwell AN, Katzen J, Slovik KJ, Babu A, Zhou S, Kremp MM, McCauley KB, Li S, Planer JD, Hussain SS, Liu X, Windmueller R, Ying Y, Stewart KM, Oyster M, Christie JD, Diamond JM, Engelhardt JF, Cantu E, Rowe SM, Kotton DN, Chapman HA, Morrissey EE (2022) Human distal airways contain a multipotent secretory cell that can regenerate alveoli. *Nature* 604:120–126
17. Basisty N, Kale A, Jeon OH, Kuehnemann C, Payne T, Rao C, Holtz A, Shah S, Sharma V, Ferrucci L, Campisi J, Schilling B (2020) A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development. *PLoS Biol* 18:e3000599
18. Bateman G, Guo-Parke H, Rodgers AM, Linden D, Bailey M, Weldon S, Kidney JC, Taggart CC (2023) Airway Epithelium Senescence as a Driving Mechanism in COPD Pathogenesis. *Biomedicines* 11:2072

19. Beausejour CM (2003) Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *The EMBO Journal* 22:4212–4222
20. Beck J, Turnquist C, Horikawa I, Harris C (2020) Targeting cellular senescence in cancer and aging: roles of p53 and its isoforms. *Carcinogenesis* 41:1017–1029
21. Benning L, Peintner A, Finkenzeller G, Peintner L (2020) Automated spheroid generation, drug application and efficacy screening using a deep learning classification: a feasibility study. *Sci Rep* 10:11071
22. Ben-Porath I, Weinberg RA (2005) The signals and pathways activating cellular senescence. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37:961–976
23. Bernadotte A, Mikhelson VM, Spivak IM (2016) Markers of cellular senescence. Telomere shortening as a marker of cellular senescence. *Aging* 8:3–11
24. Birch J, Barnes PJ, Passos JF (2018) Mitochondria, telomeres and cell senescence: Implications for lung ageing and disease. *Pharmacology & Therapeutics* 183:34–49
25. Bissell MJ, Kenny PA, Radisky DC (2005) Microenvironmental Regulators of Tissue Structure and Function Also Regulate Tumor Induction and Progression: The Role of Extracellular Matrix and Its Degrading Enzymes. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 70:343–356
26. Blackburn JB, Li NF, Bartlett NW, Richmond BW (2023) An update in club cell biology and its potential relevance to chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 324:L652–L665
27. Blagosklonny MV (2014) Geroconversion: irreversible step to cellular senescence. *Cell Cycle* 13:3628–3635
28. Bode-Böger SM, Scalera F, Martens-Lobenhoffer J (2005) Asymmetric dimethylarginine (ADMA) accelerates cell senescence. *Vasc Med* 10:S65–S71
29. Boers JE, Ambergen AW, Thunnissen FBJM (1998) Number and Proliferation of Basal and Parabasal Cells in Normal Human Airway Epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 157:2000–2006
30. Bootcov MR, Bauskin AR, Valenzuela SM, Moore AG, Bansal M, He XY, Zhang HP, Donnellan M, Mahler S, Pryor K, Walsh BJ, Nicholson RC, Fairlie WD, Por SB, Robbins JM, Breit SN (1997) MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF- β superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:11514–11519

31. Booth S, Hsieh A, Mostaco-Guidolin L, Koo H-K, Wu K, Aminazadeh F, Yang CX, Quail D, Wei Y, Cooper JD, Paré PD, Hogg JC, Vasilescu DM, Hackett T-L (2023) A Single-Cell Atlas of Small Airway Disease in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Cross-Sectional Study. *Am J Respir Crit Care Med* 208:472–486
32. Boussaad I, Cruciani G, Bolognin S, Antony P, Dording CM, Kwon Y-J, Heutink P, Fava E, Schwamborn JC, Krüger R (2021) Integrated, automated maintenance, expansion and differentiation of 2D and 3D patient-derived cellular models for high throughput drug screening. *Sci Rep* 11:1439
33. Bowdish DME (2019) The Aging Lung: Is Lung Health Good Health for Older Adults? *Chest* 155:391–400
34. Brancato V, Oliveira JM, Correlo VM, Reis RL, Kundu SC (2020) Could 3D models of cancer enhance drug screening? *Biomaterials* 232:119744
35. Brand M, Ritzmann F, Kattler K, Milasius D, Yao Y, Herr C, Kirsch SH, Müller R, Yildiz D, Bals R, Beisswenger C (2024) Biochemical and transcriptomic evaluation of a 3D lung organoid platform for pre-clinical testing of active substances targeting senescence. *Respir Res* 25:3
36. Brandsma C-A, De Vries M, Costa R, Woldhuis RR, Königshoff M, Timens W (2017) Lung ageing and COPD: is there a role for ageing in abnormal tissue repair? *Eur Respir Rev* 26:170073
37. Brightling CE, Saha S, Hollins F (2010) Interleukin-13: prospects for new treatments. *Clin Experimental Allergy* 40:42–49
38. Bringold F, Serrano M (2000) Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Experimental Gerontology* 35:317–329
39. Brown JP, Wei W, Sedivy JM (1997) Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science* 277:831–834
40. Butler CR, Hynds RE, Gowers KHC, Lee DDH, Brown JM, Crowley C, Teixeira VH, Smith CM, Urbani L, Hamilton NJ, Thakrar RM, Booth HL, Birchall MA, De Coppi P, Giangreco A, O’Callaghan C, Janes SM (2016) Rapid Expansion of Human Epithelial Stem Cells Suitable for Airway Tissue Engineering. *Am J Respir Crit Care Med* 194:156–168
41. Campisi J (2013) Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Annu Rev Physiol* 75:685–705
42. Campisi J (2014) Cell biology: The beginning of the end. *Nature* 505:35–36

43. Campisi J (2016) Senescence and Lung Function during Aging. Yin and Yang. *Annals ATS* 13:S402–S406
44. Canino C, Mori F, Cambria A, Diamantini A, Germoni S, Alessandrini G, Borsellino G, Galati R, Battistini L, Blandino R, Facciolo F, Citro G, Strano S, Muti P, Blandino G, Cioce M (2012) SASP mediates chemoresistance and tumor-initiating-activity of mesothelioma cells. *Oncogene* 31:3148–3163
45. Castro P, Giri D, Lamb D, Ittmann M (2003) Cellular senescence in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *The Prostate* 55:30–38
46. Cazzalini O, Scovassi AI, Savio M, Stivala LA, Prosperi E (2010) Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21CDKN1A in the DNA damage response. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 704:12–20
47. Chambers CR, Ritchie S, Pereira BA, Timpson P (2021) Overcoming the senescence-associated secretory phenotype (SASP): a complex mechanism of resistance in the treatment of cancer. *Molecular Oncology* 15:3242–3255
48. Chan LLY, Anderson DE, Cheng HS, Ivan FX, Chen S, Kang AEZ, Foo R, Gamage AM, Tiew PY, Koh MS, Lee KCH, Nichol K, Pathinayake PS, Chan YL, Yeo TW, Oliver BG, Wark PAB, Liu L, Tan NS, Wang L-F, Chotirmall SH (2022) The establishment of COPD organoids to study host-pathogen interaction reveals enhanced viral fitness of SARS-CoV-2 in bronchi. *Nat Commun* 13:7635
49. Chen G, Volmer AS, Wilkinson KJ, Deng Y, Jones LC, Yu D, Bustamante-Marin XM, Burns KA, Grubb BR, O’Neal WK, Livraghi-Butrico A, Boucher RC (2018) Role of Spdef in the Regulation of Muc5b Expression in the Airways of Naive and Mucoobstructed Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 59:383–396
50. Chen J-H, Ozanne SE, Hales CN (2007) *Methods of Cellular Senescence Induction Using Oxidative Stress*. Humana Press, Totowa, NJ. URL: http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-361-5_14
51. Chen S, Schoen J (2019) Air-liquid interface cell culture: From airway epithelium to the female reproductive tract. *Reprod Domestic Animals* 54:38–45
52. Chen Y-W, Huang SX, De Carvalho ALRT, Ho S-H, Islam MN, Volpi S, Notarangelo LD, Ciancanelli M, Casanova J-L, Bhattacharya J, Liang AF, Palermo LM, Porotto M, Moscona A,

- Snoeck H-W (2017) A three-dimensional model of human lung development and disease from pluripotent stem cells. *Nat Cell Biol* 19:542–549
53. Childs BG, Gluscevic M, Baker DJ, Laberge R-M, Marquess D, Dananberg J, Van Deursen JM (2017) Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. *Nat Rev Drug Discov* 16:718–735
 54. Chilosi M, Poletti V, Rossi A (2012) The pathogenesis of COPD and IPF: Distinct horns of the same devil? *Respir Res* 13:3
 55. Cho SJ, Stout-Delgado HW (2020) Aging and Lung Disease. *Annu Rev Physiol* 82:433–459
 56. Choo N, Ramm S, Luu J, Winter JM, Selth LA, Dwyer AR, Frydenberg M, Grummet J, Sandhu S, Hickey TE, Tilley WD, Taylor RA, Risbridger GP, Lawrence MG, Simpson KJ (2021) High-Throughput Imaging Assay for Drug Screening of 3D Prostate Cancer Organoids. *SLAS Discovery* 26:1107–1124
 57. Collado M, Blasco MA, Serrano M (2007) Cellular Senescence in Cancer and Aging. *Cell* 130:223–233
 58. Coppé J-P, Kauser K, Campisi J, Beauséjour CM (2006) Secretion of Vascular Endothelial Growth Factor by Primary Human Fibroblasts at Senescence. *Journal of Biological Chemistry* 281:29568–29574
 59. Coppé J-P, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Muñoz DP, Goldstein J, Nelson PS, Desprez P-Y, Campisi J (2008) Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *PLoS Biol* 6:e301
 60. Coppé J-P, Desprez P-Y, Krtolica A, Campisi J (2010) The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 5:99–118
 61. Coppé J-P, Patil CK, Rodier F, Krtolica A, Beauséjour CM, Parrinello S, Hodgson JG, Chin K, Desprez P-Y, Campisi J (2010) A Human-Like Senescence-Associated Secretory Phenotype Is Conserved in Mouse Cells Dependent on Physiological Oxygen. *PLoS ONE* 5:e9188
 62. Coppé J-P, Rodier F, Patil CK, Freund A, Desprez P-Y, Campisi J (2011) Tumor Suppressor and Aging Biomarker p16INK4a Induces Cellular Senescence without the Associated Inflammatory Secretory Phenotype. *Journal of Biological Chemistry* 286:36396–36403
 63. Corsini NS, Knoblich JA (2022) Human organoids: New strategies and methods for analyzing human development and disease. *Cell* 185:2756–2769

64. Cottage CT, Peterson N, Kearley J, Berlin A, Xiong X, Huntley A, Zhao W, Brown C, Migneault A, Zerrouki K, Criner G, Kolbeck R, Connor J, Lemaire R (2019) Targeting p16-induced senescence prevents cigarette smoke-induced emphysema by promoting IGF1/Akt1 signaling in mice. *Commun Biol* 2:307
65. Crystal RG (2014) Airway Basal Cells. The “Smoking Gun” of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 190:1355–1362
66. Cuollo L, Antonangeli F, Santoni A, Soriani A (2020) The Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP) in the Challenging Future of Cancer Therapy and Age-Related Diseases. *Biology* 9:485
67. Da Silva-Álvarez S, Guerra-Varela J, Sobrido-Cameán D, Quelle A, Barreiro-Iglesias A, Sánchez L, Collado M (2020) Cell senescence contributes to tissue regeneration in zebrafish. *Aging Cell* 19:e13052
68. d’Adda Di Fagagna F (2008) Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer* 8:512–522
69. Dajani R, Zhang Y, Taft PJ, Travis SM, Starner TD, Olsen A, Zabner J, Welsh MJ, Engelhardt JF (2005) Lysozyme Secretion by Submucosal Glands Protects the Airway from Bacterial Infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32:548–552
70. Danahay H, Pessotti AD, Coote J, Montgomery BE, Xia D, Wilson A, Yang H, Wang Z, Bevan L, Thomas C, Petit S, London A, LeMotte P, Doelemeyer A, Vélez-Reyes GL, Bernasconi P, Fryer CJ, Edwards M, Capodiecici P, Chen A, Hild M, Jaffe AB (2015) Notch2 Is Required for Inflammatory Cytokine-Driven Goblet Cell Metaplasia in the Lung. *Cell Reports* 10:239–252
71. De Man R, McDonough JE, Adams TS, Manning EP, Myers G, Vos R, Ceulemans L, Dupont L, Vanaudenaerde BM, Wuyts WA, Rosas IO, Hagood JS, Ambalavanan N, Niklason L, Hansen KC, Yan X, Kaminski N (2023) A Multi-omic Analysis of the Human Lung Reveals Distinct Cell Specific Aging and Senescence Molecular Programs.
72. Demaria M, Ohtani N, Youssef SA, Rodier F, Toussaint W, Mitchell JR, Laberge R-M, Vijg J, Van Steeg H, Dollé MET, Hoeijmakers JHJ, de Bruin A, Hara E, Campisi J (2014) An Essential Role for Senescent Cells in Optimal Wound Healing through Secretion of PDGF-AA. *Developmental Cell* 31:722–733

73. Deprez M, Zaragosi L-E, Truchi M, Becavin C, Ruiz García S, Arguel M-J, Plaisant M, Magnone V, Lebrigand K, Abelanet S, Brau F, Paquet A, Pe'er D, Marquette C-H, Leroy S, Barbry P (2020) A Single-Cell Atlas of the Human Healthy Airways. *Am J Respir Crit Care Med* 202:1636–1645
74. Diaz-Guzman E, Mannino DM (2014) Epidemiology and Prevalence of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Clinics in Chest Medicine* 35:7–16
75. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:9363–9367
76. Dolega ME, Abeille F, Picollet-D'ahan N, Gidrol X (2015) Controlled 3D culture in Matrigel microbeads to analyze clonal acinar development. *Biomaterials* 52:347–357
77. Dörr JR, Yu Y, Milanovic M, Beuster G, Zasada C, Däbritz JHM, Lisec J, Lenze D, Gerhardt A, Schleicher K, Kratzat S, Purfürst B, Walenta S, Mueller-Klieser W, Gräler M, Hummel M, Keller U, Buck AK, Dörken B, Willmitzer L, Reimann M, Kempa S, Lee S, Schmitt CA (2013) Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy. *Nature* 501:421–425
78. Dou X, Fu Q, Long Q, Liu S, Zou Y, Fu D, Xu Q, Jiang Z, Ren X, Zhang G, Wei X, Li Q, Campisi J, Zhao Y, Sun Y (2023) PDK4-dependent hypercatabolism and lactate production of senescent cells promotes cancer malignancy. *Nat Metab* 5:1887–1910
79. Duarte AC, Costa EC, Filipe HAL, Saraiva SM, Jacinto T, Miguel SP, Ribeiro MP, Coutinho P (2023) Animal-derived products in science and current alternatives. *Biomaterials Advances* 151:213428
80. Dulić V, Beney G-E, Frebourg G, Drullinger LF, Stein GH (2000) Uncoupling between Phenotypic Senescence and Cell Cycle Arrest in Aging p21-Deficient Fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology* 20:6741–6754
81. Dunican EM, Elicker BM, Henry T, Gierada DS, Schiebler ML, Anderson W, Barjaktarevic I, Barr RG, Bleecker ER, Boucher RC, Bowler R, Christenson SA, Comellas A, Cooper CB, Couper D, Criner GJ, Dransfield M, Doerschuk CM, Drummond MB, Hansel NN, Han MK, Hastie AT, Hoffman EA, Krishnan JA, Lazarus SC, Martinez FJ, McCulloch CE, O'Neal WK, Ortega VE, Paine R, Peters S, Schroeder JD, Woodruff PG, Fahy JV (2021) Mucus Plugs and Emphysema in the Pathophysiology of Airflow Obstruction and Hypoxemia in Smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 203:957–968

82. Dutta D, Heo I, Clevers H (2017) Disease Modeling in Stem Cell-Derived 3D Organoid Systems. *Trends in Molecular Medicine* 23:393–410
83. Eggert T, Wolter K, Ji J, Ma C, Yevsa T, Klotz S, Medina-Echeverez J, Longerich T, Forgues M, Reisinger F, Heikenwalder M, Wang XW, Zender L, Greten TF (2016) Distinct Functions of Senescence-Associated Immune Responses in Liver Tumor Surveillance and Tumor Progression. *Cancer Cell* 30:533–547
84. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75:817–825
85. Elias JA, Zheng T, Lee CG, Homer RJ, Chen Q, Ma B, Blackburn M, Zhu Z (2003) Transgenic Modeling of Interleukin-13 in the Lung. *Chest* 123:339S-345S
86. Faner R, Rojas M, MacNee W, Agustí A (2012) Abnormal Lung Aging in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 186:306–313
87. Fanucchi MV, Murphy ME, Buckpitt AR, Philpot RM, Plopper CG (1997) Pulmonary Cytochrome P450 Monooxygenase and Clara Cell Differentiation in Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17:302–314
88. Fejzo M, Rocha N, Cimino I, Lockhart SM, Petry CJ, Kay RG, Burling K, Barker P, George AL, Yasara N, Premawardhena A, Gong S, Cook E, Rimmington D, Rainbow K, Withers DJ, Cortessis V, Mullin PM, MacGibbon KW, Jin E, Kam A, Campbell A, Polasek O, Tzoneva G, Gribble FM, Yeo GSH, Lam BYH, Saudek V, Hughes IA, Ong KK, Perry JRB, Sutton Cole A, Baumgarten M, Welsh P, Sattar N, Smith GCS, Charnock-Jones DS, Coll AP, Meek CL, Mettananda S, Hayward C, Mancuso N, O’Rahilly S (2024) GDF15 linked to maternal risk of nausea and vomiting during pregnancy. *Nature* 625:760–767
89. Fontana L, Partridge L (2015) Promoting Health and Longevity through Diet: From Model Organisms to Humans. *Cell* 161:106–118
90. Franceschi C, Campisi J (2014) Chronic Inflammation (Inflammaging) and Its Potential Contribution to Age-Associated Diseases. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 69:S4–S9
91. Gagneux P, Moore JJ, Varki A (2005) The ethics of research on great apes. *Nature* 437:27–29

92. Geng F, Xu M, Zhao L, Zhang H, Li J, Jin F, Li Y, Li T, Yang X, Li S, Gao X, Cai W, Mao N, Sun Y, Liu H, Xu H, Wei Z, Yang F (2022) Quercetin Alleviates Pulmonary Fibrosis in Mice Exposed to Silica by Inhibiting Macrophage Senescence. *Front Pharmacol* 13:912029
93. Gilbert LA, Hemann MT (2010) DNA Damage-Mediated Induction of a Chemoresistant Niche. *Cell* 143:355–366
94. González-Gualda E, Baker AG, Fruk L, Muñoz-Espín D (2021) A guide to assessing cellular senescence *in vitro* and *in vivo*. *The FEBS Journal* 288:56–80
95. Gorgoulis V, Adams PD, Alimonti A, Bennett DC, Bischof O, Bishop C, Campisi J, Collado M, Evangelou K, Ferbeyre G, Gil J, Hara E, Krizhanovsky V, Jurk D, Maier AB, Narita M, Niedernhofer L, Passos JF, Robbins PD, Schmitt CA, Sedivy J, Vougas K, Von Zglinicki T, Zhou D, Serrano M, Demaria M (2019) Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell* 179:813–827
96. Gour N, Wills-Karp M (2015) IL-4 and IL-13 signaling in allergic airway disease. *Cytokine* 75:68–78
97. Grimshaw G, Stanton A (2006) Tobacco cessation interventions for young people. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. URL: <https://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD003289.pub4>
98. Grossi E, Marchese FP, González J, Goñi E, Fernández-Justel JM, Amadoz A, Herranz N, Puchades-Carrasco L, Montes M, Huarte M (2025) A lncRNA-mediated metabolic rewiring of cell senescence. *Cell Reports* 44:115747
99. Grubb BR, Boucher RC (1999) Pathophysiology of Gene-Targeted Mouse Models for Cystic Fibrosis. *Physiological Reviews* 79:S193–S214
100. Gurkar AU, Gerencser AA, Mora AL, Nelson AC, Zhang AR, Lagnado AB, Enniful A, Benz C, Furman D, Beaulieu D, Jurk D, Thompson EL, Wu F, Rodriguez F, Barthel G, Chen H, Phatnani H, Heckenbach I, Chuang JH, Horrell J, Petrescu J, Alder JK, Lee JH, Niedernhofer LJ, Kumar M, Königshoff M, Bueno M, Sokka M, Scheibye-Knudsen M, Neretti N, Eickelberg O, Adams PD, Hu Q, Zhu Q, Porritt RA, Dong R, Peters S, Victorelli S, Pengo T, Khaliullin T, Suryadevara V, Fu X, Bar-Joseph Z, Ji Z, Passos JF (2023) Spatial mapping of cellular senescence: emerging challenges and opportunities. *Nat Aging* 3:776–790
101. Hackam DG, Redelmeier DA (2006) Translation of Research Evidence From Animals to Humans. *JAMA* 296:1727

102. Haste L, Hulland K, Bolton S, Yesilkaya H, McKechnie K, Andrew PW (2014) Development and Characterization of a Long-Term Murine Model of *Streptococcus pneumoniae* Infection of the Lower Airways. *Infect Immun* 82:3289–3298
103. Hayflick L, Moorhead PS (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research* 25:585–621
104. He G, Siddik ZH, Huang Z, Wang R, Koomen J, Kobayashi R, Khokhar AR, Kuang J (2005) Induction of p21 by p53 following DNA damage inhibits both Cdk4 and Cdk2 activities. *Oncogene* 24:2929–2943
105. He S, Sharpless NE (2017) Senescence in Health and Disease. *Cell* 169:1000–1011
106. He Z, Peng H, Gao M, Liang G, Zeng M, Zhang X (2021) p300/Sp1-Mediated High Expression of p16 Promotes Endothelial Progenitor Cell Senescence Leading to the Occurrence of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Mediators of Inflammation* 2021:1–17
107. Hecker L (2018) Mechanisms and consequences of oxidative stress in lung disease: therapeutic implications for an aging populace. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 314:L642–L653
108. Herbig U, Jobling WA, Chen BPC, Chen DJ, Sedivy JM (2004) Telomere Shortening Triggers Senescence of Human Cells through a Pathway Involving ATM, p53, and p21CIP1, but Not p16INK4a. *Molecular Cell* 14:501–513
109. Hernandez-Segura A, De Jong TV, Melov S, Guryev V, Campisi J, Demaria M (2017) Unmasking Transcriptional Heterogeneity in Senescent Cells. *Current Biology* 27:2652-2660.e4
110. Herranz N, Gil J (2018) Mechanisms and functions of cellular senescence. *Journal of Clinical Investigation* 128:1238–1246
111. Hewitt RJ, Lloyd CM (2021) Regulation of immune responses by the airway epithelial cell landscape. *Nat Rev Immunol* 21:347–362
112. Hickson LJ, Langhi Prata LGP, Bobart SA, Evans TK, Giorgadze N, Hashmi SK, Herrmann SM, Jensen MD, Jia Q, Jordan KL, Kellogg TA, Khosla S, Koerber DM, Lagnado AB, Lawson DK, LeBrasseur NK, Lerman LO, McDonald KM, McKenzie TJ, Passos JF, Pignolo RJ, Pirtskhalava T, Saadiq IM, Schaefer KK, Textor SC, Victorelli SG, Volkman TL, Xue A, Wentworth MA, Wissler Gerdes EO, Zhu Y, Tchkonina T, Kirkland JL (2019) Senolytics decrease senescent cells

- in humans: Preliminary report from a clinical trial of Dasatinib plus Quercetin in individuals with diabetic kidney disease. *EBioMedicine* 47:446–456
113. Hild M, Jaffe AB (2016) Production of 3-D Airway Organoids From Primary Human Airway Basal Cells and Their Use in High-Throughput Screening. *CP Stem Cell Biology* 37:
 114. Hogan BLM, Barkauskas CE, Chapman HA, Epstein JA, Jain R, Hsia CCW, Niklason L, Calle E, Le A, Randell SH, Rock J, Snitow M, Krummel M, Stripp BR, Vu T, White ES, Whitsett JA, Morrissey EE (2014) Repair and Regeneration of the Respiratory System: Complexity, Plasticity, and Mechanisms of Lung Stem Cell Function. *Cell Stem Cell* 15:123–138
 115. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Paré PD (2004) The Nature of Small-Airway Obstruction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med* 350:2645–2653
 116. Hohenauer T, Moore AW (2012) The Prdm family: expanding roles in stem cells and development. *Development* 139:2267–2282
 117. Holtze S, Gorshkova E, Braude S, Cellerino A, Dammann P, Hildebrandt TB, Hoeflich A, Hoffmann S, Koch P, Terzibasi Tozzini E, Skulachev M, Skulachev VP, Sahn A (2021) Alternative Animal Models of Aging Research. *Front Mol Biosci* 8:660959
 118. Hromas R, Hufford M, Sutton J, Xu D, Li Y, Lu L (1997) PLAB, a novel placental bone morphogenetic protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1354:40–44
 119. Hsu C-H, Altschuler SJ, Wu LF (2019) Patterns of Early p21 Dynamics Determine Proliferation-Senescence Cell Fate after Chemotherapy. *Cell* 178:361-373.e12
 120. Iannello A, Thompson TW, Ardolino M, Lowe SW, Raulet DH (2013) p53-dependent chemokine production by senescent tumor cells supports NKG2D-dependent tumor elimination by natural killer cells. *Journal of Experimental Medicine* 210:2057–2069
 121. Igarashi K, Sakimoto I, Kataoka K, Ohta K, Miura M (2007) Radiation-induced senescence-like phenotype in proliferating and plateau-phase vascular endothelial cells. *Experimental Cell Research* 313:3326–3336
 122. Ingber DE (2020) Is it Time for Reviewer 3 to Request Human Organ Chip Experiments Instead of Animal Validation Studies? *Advanced Science* 7:2002030

123. Inman JL, Bissell MJ (2010) Apical polarity in three-dimensional culture systems: where to now? *J Biol* 9:2
124. Islam MT, Tuday E, Allen S, Kim J, Trott DW, Holland WL, Donato AJ, Lesniewski LA (2023) Senolytic drugs, dasatinib and quercetin, attenuate adipose tissue inflammation, and ameliorate metabolic function in old age. *Aging Cell* 22:e13767
125. Ito K, Barnes PJ (2009) COPD as a Disease of Accelerated Lung Aging. *Chest* 135:173–180
126. Ito R, Takahashi T, Ito M (2018) Humanized mouse models: Application to human diseases. *Journal Cellular Physiology* 233:3723–3728
127. Jackson ND, Everman JL, Chioccioli M, Feriani L, Goldfarbmuren KC, Sajuthi SP, Rios CL, Powell R, Armstrong M, Gomez J, Michel C, Eng C, Oh SS, Rodriguez-Santana J, Cicuta P, Reisdorph N, Burchard EG, Seibold MA (2020) Single-Cell and Population Transcriptomics Reveal Pan-epithelial Remodeling in Type 2-High Asthma. *Cell Reports* 32:107872
128. Justice JN, Nambiar AM, Tchkonja T, LeBrasseur NK, Pascual R, Hashmi SK, Prata L, Masternak MM, Kritchevsky SB, Musi N, Kirkland JL (2019) Senolytics in idiopathic pulmonary fibrosis: Results from a first-in-human, open-label, pilot study. *EBioMedicine* 40:554–563
129. Kang T-W, Yevsa T, Woller N, Hoenicke L, Wuestefeld T, Dauch D, Hohmeyer A, Gereke M, Rudalska R, Potapova A, Iken M, Vucur M, Weiss S, Heikenwalder M, Khan S, Gil J, Bruder D, Manns M, Schirmacher P, Tacke F, Ott M, Luedde T, Longerich T, Kubicka S, Zender L (2011) Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature* 479:547–551
130. Kapelyukh Y, Henderson CJ, Scheer N, Rode A, Wolf CR (2019) Defining the Contribution of CYP1A1 and CYP1A2 to Drug Metabolism Using Humanized CYP1A1/1A2 and *Cyp1a1/Cyp1a2* Knockout Mice. *Drug Metabolism and Disposition* 47:907–918
131. Kaplon J, Zheng L, Meissl K, Chaneton B, Selivanov VA, Mackay G, Van Der Burg SH, Verdegaal EME, Cascante M, Shlomi T, Gottlieb E, Peeper DS (2013) A key role for mitochondrial gatekeeper pyruvate dehydrogenase in oncogene-induced senescence. *Nature* 498:109–112
132. Kaur G, Sundar IK, Rahman I (2021) p16-3MR: A Novel Model to Study Cellular Senescence in Cigarette Smoke-Induced Lung Injuries. *IJMS* 22:4834

133. Kciuk M, Gielecińska A, Mujwar S, Kołat D, Kałuzińska-Kołat Ż, Celik I, Kontek R (2023) Doxorubicin—An Agent with Multiple Mechanisms of Anticancer Activity. *Cells* 12:659
134. Kim E-C, Kim J-R (2019) Senotherapeutics: emerging strategy for healthy aging and age-related disease. *BMB Rep* 52:47–55
135. Kim J, Koo B-K, Knoblich JA (2020) Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21:571–584
136. Kirkland JL, Tchkonja T (2017) Cellular Senescence: A Translational Perspective. *EBioMedicine* 21:21–28
137. Kleinman HK, Klebe RJ, Martin GR (1981) Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. *The Journal of cell biology* 88:473–485
138. Kleinman HK, Graf J, Iwamoto Y, Kitten GT, Ogle RC, Sasaki M, Yamada Y, Martin GR, Luckenbill-Edds L (1987) Role of Basement Membranes in Cell Differentiation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 513:134–145
139. Kobayashi Y, Tata A, Konkimalla A, Katsura H, Lee RF, Ou J, Banovich NE, Kropski JA, Tata PR (2020) Persistence of a regeneration-associated, transitional alveolar epithelial cell state in pulmonary fibrosis. *Nat Cell Biol* 22:934–946
140. Kohli J, Wang B, Brandenburg SM, Basisty N, Evangelou K, Varela-Eirin M, Campisi J, Schilling B, Gorgoulis V, Demaria M (2021) Algorithmic assessment of cellular senescence in experimental and clinical specimens. *Nat Protoc* 16:2471–2498
141. Koloko Ngassie ML, De Vries M, Borghuis T, Timens W, Sin DD, Nickle D, Joubert P, Horvatovich P, Marko-Varga G, Teske JJ, Vonk JM, Gosens R, Prakash YS, Burgess JK, Brandsma C-A (2023) Age-associated differences in the human lung extracellular matrix. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 324:L799–L814
142. Komarova EA, Krivokrysenko V, Wang K, Neznanov N, Chernov MV, Komarov PG, Brennan M, Golovkina TV, Rokhlin O, Kuprash DV, Nedospasov SA, Hazen SR, Feinstein E, Gudkov AV (2005) p53 is a suppressor of inflammatory response in mice. *FASEB j* 19:1030–1032
143. Koo H-K, Vasilescu DM, Booth S, Hsieh A, Katsamenis OL, Fishbane N, Elliott WM, Kirby M, Lackie P, Sinclair I, Warner JA, Cooper JD, Coxson HO, Paré PD, Hogg JC, Hackett T-L (2018) Small airways disease in mild and moderate chronic obstructive pulmonary disease: a cross-sectional study. *The Lancet Respiratory Medicine* 6:591–602

144. Kozlowski MT, Crook CJ, Ku HT (2021) Towards organoid culture without Matrigel. *Commun Biol* 4:1387
145. Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, Hearn S, Simon J, Miething C, Yee H, Zender L, Lowe SW (2008) Senescence of Activated Stellate Cells Limits Liver Fibrosis. *Cell* 134:657–667
146. Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LCW, Douma S, Van Doorn R, Desmet CJ, Aarden LA, Mooi WJ, Peeper DS (2008) Oncogene-Induced Senescence Relayed by an Interleukin-Dependent Inflammatory Network. *Cell* 133:1019–1031
147. Kulkarni AS, Gubbi S, Barzilai N (2020) Benefits of Metformin in Attenuating the Hallmarks of Aging. *Cell Metabolism* 32:15–30
148. Kumari R, Jat P (2021) Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. *Front Cell Dev Biol* 9:645593
149. Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD (2000) Senescence-associated β -galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *Journal of Cell Science* 113:3613–3622
150. Lagnado A, Leslie J, Ruchaud-Sparagano M, Victorelli S, Hirsova P, Ogrodnik M, Collins AL, Vizioli MG, Habiballa L, Saretzki G, Evans SA, Salmonowicz H, Hruby A, Geh D, Pavelko KD, Dolan D, Reeves HL, Grellscheid S, Wilson CH, Pandanaboyana S, Doolittle M, Von Zglinicki T, Oakley F, Gallage S, Wilson CL, Birch J, Carroll B, Chapman J, Heikenwalder M, Neretti N, Khosla S, Masuda CA, Tchkonja T, Kirkland JL, Jurk D, Mann DA, Passos JF (2021) Neutrophils induce paracrine telomere dysfunction and senescence in ROS-dependent manner. *The EMBO Journal* 40:e106048
151. Laoukili J, Perret E, Willems T, Minty A, Parthoens E, Houcine O, Coste A, Jorissen M, Marano F, Caput D, Tournier F (2001) IL-13 alters mucociliary differentiation and ciliary beating of human respiratory epithelial cells. *J Clin Invest* 108:1817–1824
152. Lawton LN, Bonaldo MDF, Jelenc PC, Qiu L, Baumes SA, Marcelino RA, De Jesus GM, Wellington S, Knowles JA, Warburton D, Brown S, Soares MB (1997) Identification of a novel member of the TGF-beta superfamily highly expressed in human placenta. *Gene* 203:17–26
153. Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, Kleijer WJ, DiMaio D, Hwang ES (2006) Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. *Aging Cell* 5:187–195

154. Lee S, Schmitt CA (2019) The dynamic nature of senescence in cancer. *Nat Cell Biol* 21:94–101
155. Lee W, Lee S, Yoon J-K, Lee D, Kim Y, Han YB, Kim R, Moon S, Park YJ, Park K, Cha B, Choi J, Kim J, Ha N, Kim K, Cho S, Cho N-H, Desai TJ, Chung J-H, Lee J-H, Kim J-I (2023) A single-cell atlas of in vitro multiculture systems uncovers the in vivo lineage trajectory and cell state in the human lung. *Exp Mol Med* 55:1831–1842
156. Lehmann M, Korfei M, Mutze K, Klee S, Skronska-Wasek W, Alsafadi HN, Ota C, Costa R, Schiller HB, Lindner M, Wagner DE, Günther A, Königshoff M (2017) Senolytic drugs target alveolar epithelial cell function and attenuate experimental lung fibrosis *ex vivo*. *Eur Respir J* 50:1602367
157. Limjunyawong N, Fallica J, Horton MR, Mitzner W (2015) Measurement of the Pressure-volume Curve in Mouse Lungs. *JoVE* 52376
158. Linders AN, Dias IB, López Fernández T, Tocchetti CG, Bomer N, Van Der Meer P (2024) A review of the pathophysiological mechanisms of doxorubicin-induced cardiotoxicity and aging. *npj Aging* 10:9
159. Ling YH, el-Naggar AK, Priebe W, Perez-Soler R (1996) Cell cycle-dependent cytotoxicity, G2/M phase arrest, and disruption of p34cdc2/cyclin B1 activity induced by doxorubicin in synchronized P388 cells. *Mol Pharmacol* 49:832–841
160. Liu C, Banister CE, Weige CC, Altomare D, Richardson JH, Contreras CM, Buckhaults PJ (2018) PRDM1 silences stem cell-related genes and inhibits proliferation of human colon tumor organoids. *Proc Natl Acad Sci USA* 115:
161. Liu D, Hornsby PJ (2007) Senescent Human Fibroblasts Increase the Early Growth of Xenograft Tumors via Matrix Metalloproteinase Secretion. *Cancer Research* 67:3117–3126
162. Lokke A, Lange P, Scharling H, Fabricius P, Vestbo J (2006) Developing COPD: a 25 year follow up study of the general population. *Thorax* 61:935–939
163. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G (2023) Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell* 186:243–278
164. Lu T, Cao Y, Zhao P, Shen S, Xi Y (2021) Organoid: a powerful tool to study lung regeneration and disease. *Cell Regen* 10:21

165. Lujambio A, Akkari L, Simon J, Grace D, Tschaharganeh DF, Bolden JE, Zhao Z, Thapar V, Joyce JA, Krizhanovsky V, Lowe SW (2013) Non-Cell-Autonomous Tumor Suppression by p53. *Cell* 153:449–460
166. Maciel-Barón LA, Morales-Rosales SL, Aquino-Cruz AA, Triana-Martínez F, Galván-Arzate S, Luna-López A, González-Puertos VY, López-Díazguerrero NE, Torres C, Königsberg M (2016) Senescence associated secretory phenotype profile from primary lung mice fibroblasts depends on the senescence induction stimuli. *AGE* 38:26
167. MacNee W, Wiggs B, Belzberg AS, Hogg JC (1989) The Effect of Cigarette Smoking on Neutrophil Kinetics in Human Lungs. *N Engl J Med* 321:924–928
168. Majewska J, Agrawal A, Mayo A, Roitman L, Chatterjee R, Sekeresova Kralova J, Landsberger T, Katzenelenbogen Y, Meir-Salame T, Hagai E, Sopher I, Perez-Correa J-F, Wagner W, Maimon A, Amit I, Alon U, Krizhanovsky V (2024) p16-dependent increase of PD-L1 stability regulates immunosurveillance of senescent cells. *Nat Cell Biol* 26:1336–1345
169. Malaquin N, Carrier-Leclerc A, Dessureault M, Rodier F (2015) DDR-mediated crosstalk between DNA-damaged cells and their microenvironment. *Front Genet* 6:
170. Martin-Montalvo A, Mercken EM, Mitchell SJ, Palacios HH, Mote PL, Scheibye-Knudsen M, Gomes AP, Ward TM, Minor RK, Blouin M-J, Schwab M, Pollak M, Zhang Y, Yu Y, Becker KG, Bohr VA, Ingram DK, Sinclair DA, Wolf NS, Spindler SR, Bernier M, De Cabo R (2013) Metformin improves healthspan and lifespan in mice. *Nat Commun* 4:2192
171. Meiners S, Eickelberg O, Königshoff M (2015) Hallmarks of the ageing lung. *Eur Respir J* 45:807–827
172. Mercer RR, Russell ML, Roggli VL, Crapo JD (1994) Cell number and distribution in human and rat airways. *Am J Respir Cell Mol Biol* 10:613–624
173. Milanovic M, Fan DNY, Belenki D, Däbritz JHM, Zhao Z, Yu Y, Dörr JR, Dimitrova L, Lenze D, Monteiro Barbosa IA, Mendoza-Parra MA, Kanashova T, Metzner M, Pardon K, Reimann M, Trumpp A, Dörken B, Zuber J, Gronemeyer H, Hummel M, Dittmar G, Lee S, Schmitt CA (2018) Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness. *Nature* 553:96–100
174. Miller AJ, Yu Q, Czerwinski M, Tsai Y-H, Conway RF, Wu A, Holloway EM, Walker T, Glass IA, Treutlein B, Camp JG, Spence JR (2020) In Vitro and In Vivo Development of the Human Airway at Single-Cell Resolution. *Developmental Cell* 53:117-128.e6

175. Mirabelli P, Coppola L, Salvatore M (2019) Cancer Cell Lines Are Useful Model Systems for Medical Research. *Cancers* 11:1098
176. Montoro DT, Haber AL, Biton M, Vinarsky V, Lin B, Birket SE, Yuan F, Chen S, Leung HM, Villoria J, Rogel N, Burgin G, Tsankov AM, Waghray A, Slyper M, Waldman J, Nguyen L, Dionne D, Rozenblatt-Rosen O, Tata PR, Mou H, Shivaraju M, Bihler H, Mense M, Tearney GJ, Rowe SM, Engelhardt JF, Regev A, Rajagopal J (2018) A revised airway epithelial hierarchy includes CFTR-expressing ionocytes. *Nature* 560:319–324
177. Muñoz-Espín D, Cañamero M, Maraver A, Gómez-López G, Contreras J, Murillo-Cuesta S, Rodríguez-Baeza A, Varela-Nieto I, Ruberte J, Collado M, Serrano M (2013) Programmed Cell Senescence during Mammalian Embryonic Development. *Cell* 155:1104–1118
178. Muñoz-Espín D, Serrano M (2014) Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15:482–496
179. Nabhan AN, Webster JD, Adams JJ, Blazer L, Everett C, Eidenschenk C, Arlantino A, Fleming I, Brightbill HD, Wolters PJ, Modrusan Z, Seshagiri S, Angers S, Sidhu SS, Newton K, Arron JR, Dixit VM (2023) Targeted alveolar regeneration with Frizzled-specific agonists. *Cell* 186:2995-3012.e15
180. Najafi M, Cheki M, Rezapoor S, Geraily G, Motevaseli E, Carnovale C, Clementi E, Shirazi A (2018) Metformin: Prevention of genomic instability and cancer: A review. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 827:1–8
181. Narita M, Nuñez S, Heard E, Narita M, Lin AW, Hearn SA, Spector DL, Hannon GJ, Lowe SW (2003) Rb-Mediated Heterochromatin Formation and Silencing of E2F Target Genes during Cellular Senescence. *Cell* 113:703–716
182. Navarro S, Driscoll B (2017) Regeneration of the Aging Lung: A Mini-Review. *Gerontology* 63:270–280
183. Nesbit M, Schaidler H, Miller TH, Herlyn M (2001) Low-Level Monocyte Chemoattractant Protein-1 Stimulation of Monocytes Leads to Tumor Formation in Nontumorigenic Melanoma Cells. *The Journal of Immunology* 166:6483–6490
184. Neurohr GE, Terry RL, Lengefeld J, Bonney M, Brittingham GP, Moretto F, Miettinen TP, Vaites LP, Soares LM, Paulo JA, Harper JW, Buratowski S, Manalis S, Van Werven FJ, Holt LJ, Amon A (2019) Excessive Cell Growth Causes Cytoplasm Dilution And Contributes to Senescence. *Cell* 176:1083-1097.e18

185. Neves J, Demaria M, Campisi J, Jasper H (2015) Of Flies, Mice, and Men: Evolutionarily Conserved Tissue Damage Responses and Aging. *Developmental Cell* 32:9–18
186. Ogradnik M (2021) Cellular aging beyond cellular senescence: Markers of senescence prior to cell cycle arrest in vitro and in vivo. *Aging Cell* 20:e13338
187. Okuda R, Aoshiba K, Matsushima H, Ogura T, Okudela K, Ohashi K (2019) Cellular senescence and senescence-associated secretory phenotype: comparison of idiopathic pulmonary fibrosis, connective tissue disease-associated interstitial lung disease, and chronic obstructive pulmonary disease. *J Thorac Dis* 11:857–864
188. Orkin RW, Gehron P, McGoodwin EB, Martin GR, Valentine T, Swarm R (1977) A murine tumor producing a matrix of basement membrane. *The Journal of experimental medicine* 145:204–220
189. Ovadya Y, Krizhanovsky V (2014) Senescent cells: SASPected drivers of age-related pathologies. *Biogerontology* 15:627–642
190. Ovadya Y, Landsberger T, Leins H, Vadai E, Gal H, Biran A, Yosef R, Sagiv A, Agrawal A, Shapira A, Windheim J, Tsoory M, Schirmbeck R, Amit I, Geiger H, Krizhanovsky V (2018) Impaired immune surveillance accelerates accumulation of senescent cells and aging. *Nat Commun* 9:5435
191. Ovadya Y, Krizhanovsky V (2018) Strategies targeting cellular senescence. *Journal of Clinical Investigation* 128:1247–1254
192. Parasrampur DA, Benet LZ, Sharma A (2018) Why Drugs Fail in Late Stages of Development: Case Study Analyses from the Last Decade and Recommendations. *AAPS J* 20:46
193. Parent RA (2015) *Comparative biology of the normal lung*. 2nd edition edition. Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier, Amsterdam Boston
194. Parikh P, Wicher S, Khandalavala K, Pabelick CM, Britt RD, Prakash YS (2019) Cellular senescence in the lung across the age spectrum. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 316:L826–L842
195. Park E-J, Kwon H-K, Choi Y-M, Shin H-J, Choi S (2012) Doxorubicin Induces Cytotoxicity through Upregulation of pERK–Dependent ATF3. *PLoS ONE* 7:e44990
196. Paschalaki KE, Starke RD, Hu Y, Mercado N, Margariti A, Gorgoulis VG, Randi AM, Barnes PJ (2013) Dysfunction of Endothelial Progenitor Cells from Smokers and Chronic Obstructive

Pulmonary Disease Patients Due to Increased DNA Damage and Senescence. *Stem Cells* 31:2813–2826

197. Pauwels RA, Buist AS, Calverley PMA, Jenkins CR, Hurd SS (2001) Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop Summary. *Am J Respir Crit Care Med* 163:1256–1276
198. Perel P, Roberts I, Sena E, Wheble P, Briscoe C, Sandercock P, Macleod M, Mignini LE, Jayaram P, Khan KS (2007) Comparison of treatment effects between animal experiments and clinical trials: systematic review. *BMJ* 334:197
199. Plasschaert LW, Žilionis R, Choo-Wing R, Savova V, Knehr J, Roma G, Klein AM, Jaffe AB (2018) A single-cell atlas of the airway epithelium reveals the CFTR-rich pulmonary ionocyte. *Nature* 560:377–381
200. Pogorevc D, Müller R (2022) Biotechnological production optimization of argyrins – a potent immunomodulatory natural product class. *Microbial Biotechnology* 15:353–369
201. Potter AJ, Gollahon KA, Palanca BJA, Harbert MJ, Choi YM, Moskovitz AH, Potter JD, Rabinovitch PS (2002) Flow cytometric analysis of the cell cycle phase specificity of DNA damage induced by radiation, hydrogen peroxide and doxorubicin. *Carcinogenesis* 23:389–401
202. Pound P, Ritskes-Hoitinga M (2018) Is it possible to overcome issues of external validity in preclinical animal research? Why most animal models are bound to fail. *J Transl Med* 16:304
203. Puchelle E, Zahm J-M, Tournier J-M, Coraux C (2006) Airway Epithelial Repair, Regeneration, and Remodeling after Injury in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proceedings of the American Thoracic Society* 3:726–733
204. Qaid EYA, Long I (2025) Asthma unravelled: a comprehensive review of epidemiology, phenotypes, pathophysiology, and emerging therapies. *Egypt J Bronchol* 19:82
205. Rahman I, Adcock IM (2006) Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *Eur Respir J* 28:219–242
206. Rawlins EL, Okubo T, Xue Y, Brass DM, Auten RL, Hasegawa H, Wang F, Hogan BLM (2009) The Role of Scgbl1a1+ Clara Cells in the Long-Term Maintenance and Repair of Lung Airway, but Not Alveolar, Epithelium. *Cell Stem Cell* 4:525–534

207. Rayon T, Stamatakis D, Perez-Carrasco R, Garcia-Perez L, Barrington C, Melchionda M, Exelby K, Lazaro J, Tybulewicz VLJ, Fisher EMC, Briscoe J (2020) Species-specific pace of development is associated with differences in protein stability. *Science* 369:eaba7667
208. Reimann M, Lee S, Schmitt CA (2024) Cellular senescence: Neither irreversible nor reversible. *Journal of Experimental Medicine* 221:e20232136
209. Rennard SI, Drummond MB (2015) Early chronic obstructive pulmonary disease: definition, assessment, and prevention. *The Lancet* 385:1778–1788
210. Renner H, Grabos M, Becker KJ, Kagermeier TE, Wu J, Otto M, Peischard S, Zeuschner D, TsyTsyura Y, Disse P, Klingauf J, Leidel SA, Seebohm G, Schöler HR, Bruder JM (2020) A fully automated high-throughput workflow for 3D-based chemical screening in human midbrain organoids. *eLife* 9:e52904
211. Risch T, Kolling D, Mostert D, Seedorf T, Heimann D, Kohnhäuser D, Deschner F, Fries F, Solga D, Hilgers J-S, Dastbaz J, Mancini S, Hirsch AKH, Brönstrup M, Kirschning A, Sieber SA, Herrmann J, Müller R (2024) YgiV promoter mutations cause resistance to cystobactamids and reduced virulence factor expression in *Escherichia coli*. *npj Antimicrob Resist* 2:33
212. RKI (2017) 12-month prevalence of asthma among adults in Germany.
213. Robbins PD, Jurk D, Khosla S, Kirkland JL, LeBrasseur NK, Miller JD, Passos JF, Pignolo RJ, Tchkonja T, Niedernhofer LJ (2021) Senolytic Drugs: Reducing Senescent Cell Viability to Extend Health Span. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 61:779–803
214. Rock JR, Onaitis MW, Rawlins EL, Lu Y, Clark CP, Xue Y, Randell SH, Hogan BLM (2009) Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:12771–12775
215. Rodier F, Coppé J-P, Patil CK, Hoeijmakers WAM, Muñoz DP, Raza SR, Freund A, Campeau E, Davalos AR, Campisi J (2009) Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* 11:973–979
216. Rokicki W, Rokicki M, Wojtacha J, Dželjijli A (2016) The role and importance of club cells (Clara cells) in the pathogenesis of some respiratory diseases. *kitp* 1:26–30
217. Rossi G, Manfrin A, Lutolf MP (2018) Progress and potential in organoid research. *Nat Rev Genet* 19:671–687

218. Rossiello F, Jurk D, Passos JF, d'Adda Di Fagagna F (2022) Telomere dysfunction in ageing and age-related diseases. *Nat Cell Biol* 24:135–147
219. Ruiz García S, Deprez M, Lebrigand K, Cavard A, Paquet A, Arguel M-J, Magnone V, Truchi M, Caballero I, Leroy S, Marquette C-H, Marcet B, Barbry P, Zaragosi L-E (2019) Novel dynamics of human mucociliary differentiation revealed by single-cell RNA sequencing of nasal epithelial cultures. *Development* 146:dev177428
220. Ruysseveldt E, Martens K, Steelant B (2021) Airway Basal Cells, Protectors of Epithelial Walls in Health and Respiratory Diseases. *Front Allergy* 2:787128
221. Sagiv A, Bar-Shai A, Levi N, Hatzav M, Zada L, Ovadya Y, Roitman L, Manella G, Regev O, Majewska J, Vadai E, Eilam R, Feigelson SW, Tsoory M, Tauc M, Alon R, Krizhanovsky V (2018) p53 in Bronchial Club Cells Facilitates Chronic Lung Inflammation by Promoting Senescence. *Cell Reports* 22:3468–3479
222. Sarkar D, Lebedeva IV, Emdad L, Kang D, Baldwin AS, Fisher PB (2004) Human Polynucleotide Phosphorylase (hPNPaseold-35): a potential link between aging and inflammation. *Cancer Research* 64:7473–7478
223. Schafer MJ, White TA, Iijima K, Haak AJ, Ligresti G, Atkinson EJ, Oberg AL, Birch J, Salmonowicz H, Zhu Y, Mazula DL, Brooks RW, Fuhrmann-Stroissnigg H, Pirtskhalava T, Prakash YS, Tchkonja T, Robbins PD, Aubry MC, Passos JF, Kirkland JL, Tschumperlin DJ, Kita H, LeBrasseur NK (2017) Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. *Nat Commun* 8:14532
224. Schafer MJ, White TA, Iijima K, Haak AJ, Ligresti G, Atkinson EJ, Oberg AL, Birch J, Salmonowicz H, Zhu Y, Mazula DL, Brooks RW, Fuhrmann-Stroissnigg H, Pirtskhalava T, Prakash YS, Tchkonja T, Robbins PD, Aubry MC, Passos JF, Kirkland JL, Tschumperlin DJ, Kita H, LeBrasseur NK (2017) Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. *Nat Commun* 8:14532
225. Schaidt H, Oka M, Bogenrieder T, Nesbit M, Satyamoorthy K, Berking C, Matsushima K, Herlyn M (2003) Differential response of primary and metastatic melanomas to neutrophils attracted by IL-8. *Intl Journal of Cancer* 103:335–343
226. Schmitt CA, Tchkonja T, Niedernhofer LJ, Robbins PD, Kirkland JL, Lee S (2023) COVID-19 and cellular senescence. *Nat Rev Immunol* 23:251–263

227. Schutgens F, Clevers H (2020) Human Organoids: Tools for Understanding Biology and Treating Diseases. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 15:211–234
228. Scott G, Asrat S, Allinne J, Keat Lim W, Nagashima K, Birchard D, Srivatsan S, Ajithdoss DK, Oyejide A, Ben L-H, Walls J, Le Floc’h A, Yancopoulos GD, Murphy AJ, Sleeman MA, Orengo JM (2023) IL-4 and IL-13, not eosinophils, drive type 2 airway inflammation, remodeling and lung function decline. *Cytokine* 162:156091
229. Seeley RR, Stephens TD, Tate P (1995) *Anatomy & physiology*. 3rd ed edition. Mosby, St. Louis
230. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW (1997) Oncogenic ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88:593–602
231. Sethi S, Murphy TF (2008) Infection in the Pathogenesis and Course of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med* 359:2355–2365
232. Sherr CJ, Roberts JM (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & Development* 13:1501–1512
233. Singh VK, Seed TM (2021) How necessary are animal models for modern drug discovery? *Expert Opinion on Drug Discovery* 16:1391–1397
234. Song H, Yao E, Lin C, Gacayan R, Chen M-H, Chuang P-T (2012) Functional characterization of pulmonary neuroendocrine cells in lung development, injury, and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:17531–17536
235. Sprott RF, Ritzmann F, Langer F, Yao Y, Herr C, Kohl Y, Tschernig T, Bals R, Beisswenger C (2020) Flagellin shifts 3D bronchospheres towards mucus hyperproduction. *Respir Res* 21:222
236. Storer M, Mas A, Robert-Moreno A, Pecoraro M, Ortells MC, Di Giacomo V, Yosef R, Pilpel N, Krizhanovsky V, Sharpe J, Keyes WM (2013) Senescence Is a Developmental Mechanism that Contributes to Embryonic Growth and Patterning. *Cell* 155:1119–1130
237. Stroulios G, Brown T, Kondro D, Dei A, Eaves A, Louis S, Hou J, Chang W, Simmini S (2022) Generation of apical-out airway organoids from human primary airway epithelial cells. *European Respiratory Society* URL: <https://publications.ersnet.org/lookup/doi/10.1183/23120541.LSC-2022.116>
238. Strunz M, Simon LM, Ansari M, Kathiriya JJ, Angelidis I, Mayr CH, Tsidiridis G, Lange M, Mattner LF, Yee M, Ogar P, Sengupta A, Kukhtevich I, Schneider R, Zhao Z, Voss C, Stoeger T,

- Neumann JHL, Hilgendorff A, Behr J, O'Reilly M, Lehmann M, Burgstaller G, Königshoff M, Chapman HA, Theis FJ, Schiller HB (2020) Alveolar regeneration through a Krt8⁺ transitional stem cell state that persists in human lung fibrosis. *Nat Commun* 11:3559
239. Subedi S, Guntipally M, Suwal N, Thapa R, Bashyal S, Panth N, Gupta G, MacLoughlin R, Oliver B, Dua K, Paudel KR (2025) Cellular senescence in chronic obstructive pulmonary disease: Molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Ageing Research Reviews* 110:102813
240. Sun Y, Coppé J-P, Lam EW-F (2018) Cellular Senescence: The Sought or the Unwanted? *Trends in Molecular Medicine* 24:871–885
241. Sundar IK, Rashid K, Gerloff J, Li D, Rahman I (2018) Genetic Ablation of p16^{INK4a} Does Not Protect against Cellular Senescence in Mouse Models of Chronic Obstructive Pulmonary Disease/Emphysema. *Am J Respir Cell Mol Biol* 59:189–199
242. Tan Q, Choi KM, Sicard D, Tschumperlin DJ (2017) Human airway organoid engineering as a step toward lung regeneration and disease modeling. *Biomaterials* 113:118–132
243. Tan SYS, Krasnow MA (2016) Developmental origin of lung macrophage diversity. *Development dev.*129122
244. Tchkonina T, Zhu Y, Van Deursen J, Campisi J, Kirkland JL (2013) Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *J Clin Invest* 123:966–972
245. Thiede S, Wosniok PR, Herkommer D, Debnar T, Tian M, Wang T, Schrempp M, Menche D (2017) Total Synthesis of Leupyrrins A and B, Highly Potent Antifungal Agents from the Myxobacterium *Sorangium cellulosum*. *Chemistry A European J* 23:3300–3320
246. Tominaga K (2015) The emerging role of senescent cells in tissue homeostasis and pathophysiology. *Pathobiology of Aging & Age-related Diseases* 5:27743
247. Travaglini KJ, Nabhan AN, Penland L, Sinha R, Gillich A, Sit RV, Chang S, Conley SD, Mori Y, Seita J, Berry GJ, Shrager JB, Metzger RJ, Kuo CS, Neff N, Weissman IL, Quake SR, Krasnow MA (2020) A molecular cell atlas of the human lung from single-cell RNA sequencing. *Nature* 587:619–625
248. Tsuji T, Aoshiha K, Nagai A (2006) Alveolar Cell Senescence in Patients with Pulmonary Emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 174:886–893
249. Tudor RM, Petrache I (2012) Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest* 122:2749–2755

250. Tudor RM, Kern JA, Miller YE (2012) Senescence in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proc Am Thorac Soc* 9:62–63
251. Van Der Vaart J, Clevers H (2021) Airway organoids as models of human disease. *J Intern Med* 289:604–613
252. Van Norman GA (2016) Drugs, Devices, and the FDA: Part 1: An Overview of Approval Processes for Drugs. *JACC: Basic to Translational Science* 1:170–179
253. Van Norman GA (2019) Limitations of Animal Studies for Predicting Toxicity in Clinical Trials. *JACC: Basic to Translational Science* 4:845–854
254. Van Norman GA (2019) Phase II Trials in Drug Development and Adaptive Trial Design. *JACC: Basic to Translational Science* 4:428–437
255. Vasiliou V, Pappa A, Petersen DR (2000) Role of aldehyde dehydrogenases in endogenous and xenobiotic metabolism. *Chemico-Biological Interactions* 129:1–19
256. Vazquez-Armendariz AI, Herold S (2021) From Clones to Buds and Branches: The Use of Lung Organoids to Model Branching Morphogenesis Ex Vivo. *Front Cell Dev Biol* 9:631579
257. Viegi G, Maio S, Pistelli F, Baldacci S, Carrozzi L (2006) Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease: Health effects of air pollution. *Respirology* 11:523–532
258. Vock C, Yildirim A, Fehrenbach H, Wegmann M (2011) Investigations on the IL-13 signalling along the airway tree-implications on mucus production in allergic asthma? *Pneumologie* 65:s-0031-1296154
259. Vos T, Lim SS, Abbafati C, Abbas KM, Abbasi M, Abbasifard M, Abbasi-Kangevari M, Abbastabar H, Abd-Allah F, Abdelalim A, Abdollahi M, Abdollahpour I, Abolhassani H, Aboyans V, Abrams EM, Abreu LG, Abrigo MRM, Abu-Raddad LJ, Abushouk AI, Acebedo A, Ackerman IN, Adabi M, Adamu AA, Adebayo OM, Adekanmbi V, Adelson JD, Adetokunboh OO, Adham D, Afshari M, Afshin A, Agardh EE, Agarwal G, Agesa KM, Aghaali M, Aghamir SMK, Agrawal A, Ahmad T, Ahmadi A, Ahmadi M, Ahmadieh H, Ahmadpour E, Akalu TY, Akinyemi RO, Akinyemiju T, Akombi B, Al-Aly Z, Alam K, Alam N, Alam S, Alam T, Alanzi TM, Albertson SB, Alcalde-Rabanal JE, Alema NM, Ali M, Ali S, Alicandro G, Alijanzadeh M, Alinia C, Alipour V, Aljunid SM, Alla F, Allebeck P, Almasi-Hashiani A, Alonso J, Al-Raddadi RM, Altirkawi KA, Alvis-Guzman N, Alvis-Zakzuk NJ, Amini S, Amini-Rarani M, Aminorroaya A, Amiri F, Amit AML, Amugsi DA, Amul GGH, Anderlini D, Andrei CL, Andrei T, Anjomshoa M, Ansari F, Ansari I, Ansari-Moghaddam A, Antonio CAT, Antony CM, Antriyandarti E, Anvari D, Anwer

R, Arabloo J, Arab-Zozani M, Aravkin AY, Ariani F, Ärnlov J, Aryal KK, Arzani A, Asadi-Aliabadi M, Asadi-Pooya AA, Asghari B, Ashbaugh C, Atnafu DD, Atre SR, Ausloos F, Ausloos M, Ayala Quintanilla BP, Ayano G, Ayanore MA, Aynalem YA, Azari S, Azarian G, Azene ZN, Babae E, Badawi A, Bagherzadeh M, Bakhshaei MH, Bakhtiari A, Balakrishnan S, Balalla S, Balassyano S, Banach M, Banik PC, Bannick MS, Bante AB, Baraki AG, Barboza MA, Barker-Collo SL, Barthelemy CM, Barua L, Barzegar A, Basu S, Baune BT, Bayati M, Bazmandegan G, Bedi N, Beghi E, Béjot Y, Bello AK, Bender RG, Bennett DA, Bennitt FB, Bensenor IM, Benziger CP, Berhe K, Bernabe E, Bertolacci GJ, Bhageerathy R, Bhala N, Bhandari D, Bhardwaj P, Bhattacharyya K, Bhutta ZA, Bibi S, Biehl MH, Bikbov B, Bin Sayeed MS, Biondi A, Birihane BM, Bisanzio D, Bisignano C, Biswas RK, Bohlouli S, Bohluli M, Bolla SRR, Boloor A, Boon-Dooley AS, Borges G, Borzi AM, Bourne R, Brady OJ, Brauer M, Brayne C, Breitborde NJK, Brenner H, Briant PS, Briggs AM, Briko NI, Britton GB, Bryazka D, Buchbinder R, Bumgarner BR, Busse R, Butt ZA, Caetano Dos Santos FL, Cámara LLA, Campos-Nonato IR, Car J, Cárdenas R, Carreras G, Carrero JJ, Carvalho F, Castaldelli-Maia JM, Castañeda-Orjuela CA, Castelpietra G, Castle CD, Castro F, Catalá-López F, Causey K, Cederroth CR, Cercey KM, Cerin E, Chandan JS, Chang AR, Charlson FJ, Chattu VK, Chaturvedi S, Chimed-Ochir O, Chin KL, Cho DY, Christensen H, Chu D-T, Chung MT, Cicuttini FM, Ciobanu LG, Cirillo M, Collins EL, Compton K, Conti S, Cortesi PA, Costa VM, Cousin E, Cowden RG, Cowie BC, Cromwell EA, Cross DH, Crowe CS, Cruz JA, Cunningham M, Dahlawi SMA, Damiani G, Dandona L, Dandona R, Darwesh AM, Daryani A, Das JK, Das Gupta R, Das Neves J, Dávila-Cervantes CA, Davletov K, De Leo D, Dean FE, DeCleene NK, Deen A, Degenhardt L, Dellavalle RP, Demeke FM, Demsie DG, Denova-Gutiérrez E, Dereje ND, Dervenis N, Desai R, Desalew A, Dessie GA, Dharmaratne SD, Dhungana GP, Dianatinasab M, Diaz D, Dibaji Forooshani ZS, Dingels ZV, Dirac MA, Djalalinia S, Do HT, Dokova K, Dorostkar F, Doshi CP, Doshmangir L, Douiri A, Doxey MC, Driscoll TR, Dunachie SJ, Duncan BB, Duraes AR, Eagan AW, Ebrahimi Kalan M, Edvardsson D, Ehrlich JR, El Nahas N, El Sayed I, El Tantawi M, Elbarazi I, Elgendy IY, Elhabashy HR, El-Jaafary SI, Elyazar IR, Emamian MH, Emmons-Bell S, Erskine HE, Eshrati B, Eskandari S, Esmailnejad S, Esmailzadeh F, Esteghamati A, Estep K, Etemadi A, Etilisso AE, Farahmand M, Faraj A, Fareed M, Faridnia R, Farinha CSES, Farioli A, Faro A, Faruque M, Farzadfar F, Fattahi N, Fazlzadeh M, Feigin VL, Feldman R, Fereshtehnejad S-M, Fernandes E, Ferrari AJ, Ferreira ML, Filip I, Fischer F, Fisher JL, Fitzgerald R, Flohr C, Flor LS, Foigt NA, Folleyan MO, Force LM, Fornari C, Foroutan M, Fox JT, Freitas M, Fu W, Fukumoto T, Furtado JM, Gad MM, Gakidou E, Galles NC, Gallus S, Gamkrelidze A, Garcia-Basteiro AL, Gardner WM, Geberemariam BS, Gebrehiwot AM, Gebremedhin KB, Gebreslassie AAAA, Gershberg Hayoon A, Gething PW, Ghadimi M, Ghadiri K, Ghafourifard M, Ghajar A, Ghamari F, Ghashghaee A, Ghiasvand H, Ghith N, Gholamian A, Gilani SA, Gill PS, Gitimoghaddam M, Giussani G, Goli S, Gomez RS, Gopalani SV, Gorini G, Gorman TM, Gottlich HC, Goudarzi H, Goulart AC, Goulart

BNG, Grada A, Grivna M, Grosso G, Gubari MIM, Gugnani HC, Guimaraes ALS, Guimarães RA, Guled RA, Guo G, Guo Y, Gupta R, Haagsma JA, Haddock B, Hafezi-Nejad N, Hafiz A, Hagins H, Haile LM, Hall BJ, Halvaei I, Hamadeh RR, Hamagharib Abdullah K, Hamilton EB, Han C, Han H, Hankey GJ, Haro JM, Harvey JD, Hasaballah AI, Hasanzadeh A, Hashemian M, Hassanipour S, Hassankhani H, Havmoeller RJ, Hay RJ, Hay SI, Hayat K, Heidari B, Heidari G, Heidari-Soureshjani R, Hendrie D, Henrikson HJ, Henry NJ, Herteliu C, Heydarpour F, Hird TR, Hoek HW, Hole MK, Holla R, Hoogar P, Hosgood HD, Hosseinzadeh M, Hostiuc M, Hostiuc S, Househ M, Hoy DG, Hsairi M, Hsieh VC, Hu G, Huda TM, Hugo FN, Huynh CK, Hwang B-F, Iannucci VC, Ibitoye SE, Ikuta KS, Ilesanmi OS, Ilic IM, Ilic MD, Inbaraj LR, Ippolito H, Irvani SSN, Islam MM, Islam M, Islam SMS, Islami F, Iso H, Ivers RQ, Iwu CCD, Iyamu IO, Jaafari J, Jacobsen KH, Jadidi-Niaragh F, Jafari H, Jafarinia M, Jahagirdar D, Jahani MA, Jahanmehr N, Jakovljevic M, Jalali A, Jalilian F, James SL, Janjani H, Janodia MD, Jayatilleke AU, Jeemon P, Jenabi E, Jha RP, Jha V, Ji JS, Jia P, John O, John-Akinola YO, Johnson CO, Johnson SC, Jonas JB, Joo T, Joshi A, Jozwiak JJ, Jürisson M, Kabir A, Kabir Z, Kalani H, Kalani R, Kalankesh LR, Kalhor R, Kamiab Z, Kanchan T, Karami Matin B, Karch A, Karim MA, Karimi SE, Kassa GM, Kassebaum NJ, Katikireddi SV, Kawakami N, Kayode GA, Keddie SH, Keller C, Kereselidze M, Khafaie MA, Khalid N, Khan M, Khatab K, Khater MM, Khatib MN, Khayamzadeh M, Khodayari MT, Khundkar R, Kianipour N, Kieling C, Kim D, Kim Y-E, Kim YJ, Kimokoti RW, Kisa A, Kisa S, Kissimova-Skarbek K, Kivimäki M, Kneib CJ, Knudsen AKS, Kocarnik JM, Kolola T, Kopec JA, Kosen S, Koul PA, Koyanagi A, Kravchenko MA, Krishan K, Krohn KJ, Kuate Defo B, Kucuk Bicer B, Kumar GA, Kumar M, Kumar P, Kumar V, Kumaresh G, Kurmi OP, Kusuma D, Kyu HH, La Vecchia C, Lacey B, Lal DK, Lalloo R, Lam JO, Lami FH, Landires I, Lang JJ, Lansingh VC, Larson SL, Larsson AO, Lasrado S, Lassi ZS, Lau KM-M, Lavados PM, Lazarus JV, Ledesma JR, Lee PH, Lee SWH, LeGrand KE, Leigh J, Leonardi M, Lescinsky H, Leung J, Levi M, Lewington S, Li S, Lim L-L, Lin C, Lin R-T, Linehan C, Linn S, Liu H-C, Liu S, Liu Z, Looker KJ, Lopez AD, Lopukhov PD, Lorkowski S, Lotufo PA, Lucas TCD, Lugo A, Lunevicius R, Lyons RA, Ma J, MacLachlan JH, Maddison ER, Maddison R, Madotto F, Mahasha PW, Mai HT, Majeed A, Maled V, Maleki S, Malekzadeh R, Malta DC, Mamun AA, Manafi A, Manafi N, Manguerra H, Mansouri B, Mansournia MA, Mantilla Herrera AM, Maravilla JC, Marks A, Martins-Melo FR, Martopullo I, Masoumi SZ, Massano J, Massenburg BB, Mathur MR, Maulik PK, McAlinden C, McGrath JJ, McKee M, Mehndiratta MM, Mehri F, Mehta KM, Meitei WB, Memiah PTN, Mendoza W, Menezes RG, Mengesha EW, Mengesha MB, Mereke A, Meretoja A, Meretoja TJ, Mestrovic T, Miazgowski B, Miazgowski T, Michalek IM, Mihretie KM, Miller TR, Mills EJ, Mirica A, Mirrakhimov EM, Mirzaei H, Mirzaei M, Mirzaei-Alavijeh M, Misganaw AT, Mithra P, Moazen B, Moghadaszadeh M, Mohamadi E, Mohammad DK, Mohammad Y, Mohammad Gholi Mezerji N, Mohammadian-Hafshejani A, Mohammadifard N, Mohammadpourhodki R, Mohammed S, Mokdad AH, Molokhia M, Momen NC, Monasta L,

Mondello S, Mooney MD, Moosazadeh M, Moradi G, Moradi M, Moradi-Lakeh M, Moradzadeh R, Moraga P, Morales L, Morawska L, Moreno Velásquez I, Morgado-da-Costa J, Morrison SD, Mosser JF, Mouodi S, Mousavi SM, Mousavi Khaneghah A, Mueller UO, Munro SB, Muriithi MK, Musa KI, Muthupandian S, Naderi M, Nagarajan AJ, Nagel G, Naghshtabrizi B, Nair S, Nandi AK, Nangia V, Nansseu JR, Nayak VC, Nazari J, Negoï I, Negoï RI, Netsere HBN, Ngunjiri JW, Nguyen CT, Nguyen J, Nguyen M, Nguyen M, Nichols E, Nigatu D, Nigatu YT, Nikbakhsh R, Nixon MR, Nnaji CA, Nomura S, Norrving B, Noubiap JJ, Nowak C, Nunez-Samudio V, Oțoiu A, Oancea B, Odell CM, Ogbo FA, Oh I-H, Okunga EW, Oladnabi M, Olagunju AT, Olusanya BO, Olusanya JO, Oluwasanu MM, Omar Bali A, Omer MO, Ong KL, Onwujekwe OE, Orji AU, Orpana HM, Ortiz A, Ostroff SM, Otstavnov N, Otstavnov SS, Øverland S, Owolabi MO, P A M, Padubidri JR, Pakhare AP, Palladino R, Pana A, Panda-Jonas S, Pandey A, Park E-K, Parmar PGK, Pasupula DK, Patel SK, Paternina-Caicedo AJ, Pathak A, Pathak M, Patten SB, Patton GC, Paudel D, Pazoki Toroudi H, Peden AE, Pennini A, Pepito VCF, Peprah EK, Pereira A, Pereira DM, Perico N, Pham HQ, Phillips MR, Pigott DM, Pilgrim T, Pilz TM, Pirsahab M, Plana-Ripoll O, Plass D, Pokhrel KN, Polibin RV, Polinder S, Polkinghorne KR, Postma MJ, Pourjafar H, Pourmalek F, Pourmirza Kalhori R, Pourshams A, Poznańska A, Prada SI, Prakash V, Pribadi DRA, Pupillo E, Quazi Syed Z, Rabiee M, Rabiee N, Radfar A, Rafiee A, Rafiei A, Raggi A, Rahimi-Movaghar A, Rahman MA, Rajabpour-Sanati A, Rajati F, Ramezanzadeh K, Ranabhat CL, Rao PC, Rao SJ, Rasella D, Rastogi P, Rathi P, Rawaf DL, Rawaf S, Rawal L, Razo C, Redford SB, Reiner RC, Reinig N, Reitsma MB, Remuzzi G, Renjith V, Renzaho AMN, Resnikoff S, Rezaei N, Rezai MS, Rezapour A, Rhinehart P-A, Riahi SM, Ribeiro ALP, Ribeiro DC, Ribeiro D, Rickard J, Roberts NLS, Roberts S, Robinson SR, Roeber L, Rolfe S, Ronfani L, Roshandel G, Roth GA, Rubagotti E, Rumisha SF, Sabour S, Sachdev PS, Saddik B, Sadeghi E, Sadeghi M, Saeidi S, Safi S, Safiri S, Sagar R, Sahebkar A, Sahraian MA, Sajadi SM, Salahshoor MR, Salamati P, Salehi Zahabi S, Salem H, Salem MRR, Salimzadeh H, Salomon JA, Salz I, Samad Z, Samy AM, Sanabria J, Santomauro DF, Santos IS, Santos JV, Santric-Milicevic MM, Saraswathy SYI, Sarmiento-Suárez R, Sarrafzadegan N, Sartorius B, Sarveazad A, Sathian B, Sathish T, Sattin D, Sbarra AN, Schaeffer LE, Schiavolin S, Schmidt MI, Schutte AE, Schwebel DC, Schwendicke F, Senbeta AM, Senthilkumaran S, Sepanlou SG, Shackelford KA, Shadid J, Shahabi S, Shaheen AA, Shaikh MA, Shalash AS, Shams-Beyranvand M, Shamsizadeh M, Shannawaz M, Sharafi K, Sharara F, Sheena BS, Sheikhtaheri A, Shetty RS, Shibuya K, Shiferaw WS, Shigematsu M, Shin JI, Shiri R, Shirkoohi R, Shrimel MG, Shuval K, Siabani S, Sigfusdottir ID, Sigurvinsdottir R, Silva JP, Simpson KE, Singh A, Singh JA, Skiadaresi E, Skou ST, Skryabin VY, Sobngwi E, Sokhan A, Soltani S, Sorensen RJD, Soriano JB, Sorrie MB, Soyiri IN, Sreeramareddy CT, Stanaway JD, Stark BA, Ștefan SC, Stein C, Steiner C, Steiner TJ, Stokes MA, Stovner LJ, Stubbs JL, Sudaryanto A, Sufiyan MB, Sulo G, Sultan I, Sykes BL, Sylte DO, Szócska M, Tabarés-Seisdedos R, Tabb KM, Tadakamadla SK, Taherkhani A, Tajdini M, Takahashi K, Taveira N,

- Teagle WL, Teame H, Tehrani-Banihashemi A, Teklehaimanot BF, Terrason S, Tessema ZT, Thankappan KR, Thomson AM, Tohidinik HR, Tonelli M, Topor-Madry R, Torre AE, Touvier M, Tovani-Palone MRR, Tran BX, Travillian R, Troeger CE, Truelsen TC, Tsai AC, Tsatsakis A, Tudor Car L, Tyrovolas S, Uddin R, Ullah S, Undurraga EA, Unnikrishnan B, Vacante M, Vakilian A, Valdez PR, Varughese S, Vasankari TJ, Vasseghian Y, Venketasubramanian N, Violante FS, Vlassov V, Vollset SE, Vongpradith A, Vukovic A, Vukovic R, Waheed Y, Walters MK, Wang J, Wang Y, Wang Y-P, Ward JL, Watson A, Wei J, Weintraub RG, Weiss DJ, Weiss J, Westerman R, Whisnant JL, Whiteford HA, Wiangkham T, Wiens KE, Wijeratne T, Wilner LB, Wilson S, Wojtyniak B, Wolfe CDA, Wool EE, Wu A-M, Wulf Hanson S, Wunrow HY, Xu G, Xu R, Yadgir S, Yahyazadeh Jabbari SH, Yamagishi K, Yaminfirooz M, Yano Y, Yaya S, Yazdi-Feyzabadi V, Yearwood JA, Yeheyis TY, Yeshitila YG, Yip P, Yonemoto N, Yoon S-J, Yoosefi Lebni J, Younis MZ, Younker TP, Yousefi Z, Yousefifard M, Yousefinezhadi T, Yousuf AY, Yu C, Yusefzadeh H, Zahirian Moghadam T, Zaki L, Zaman SB, Zamani M, Zamanian M, Zandian H, Zangeneh A, Zastrozhin MS, Zewdie KA, Zhang Y, Zhang Z-J, Zhao JT, Zhao Y, Zheng P, Zhou M, Ziapour A, Zimsen SRM, Naghavi M, Murray CJL (2020) Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet* 396:1204–1222
260. Wajapeyee N, Serra RW, Zhu X, Mahalingam M, Green MR (2008) Oncogenic BRAF Induces Senescence and Apoptosis through Pathways Mediated by the Secreted Protein IGFBP7. *Cell* 132:363–374
261. Wan Y, Fu J (2024) GDF15 as a key disease target and biomarker: linking chronic lung diseases and ageing. *Mol Cell Biochem* 479:453–466
262. Wang B, Kohli J, Demaria M (2020) Senescent Cells in Cancer Therapy: Friends or Foes? *Trends in Cancer* 6:838–857
263. Wang E (1995) Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved. *Cancer Res* 55:2284–2292
264. Wang J, Sun Q, Morita Y, Jiang H, Groß A, Lechel A, Hildner K, Guachalla LM, Gompf A, Hartmann D, Schambach A, Wuestefeld T, Dauch D, Schrezenmeier H, Hofmann W-K, Nakauchi H, Ju Z, Kestler HA, Zender L, Rudolph KL (2012) A Differentiation Checkpoint Limits Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal in Response to DNA Damage. *Cell* 148:1001–1014
265. Wang L, Netto KG, Zhou L, Liu X, Wang M, Zhang G, Foster PS, Li F, Yang M (2021) Single-cell transcriptomic analysis reveals the immune landscape of lung in steroid-resistant asthma exacerbation. *Proc Natl Acad Sci USA* 118:e2005590118

266. Wang Y, Jeon H (2022) 3D cell cultures toward quantitative high-throughput drug screening. *Trends in Pharmacological Sciences* 43:569–581
267. Watson JK, Rulands S, Wilkinson AC, Wuidart A, Ousset M, Van Keymeulen A, Göttgens B, Blanpain C, Simons BD, Rawlins EL (2015) Clonal Dynamics Reveal Two Distinct Populations of Basal Cells in Slow-Turnover Airway Epithelium. *Cell Reports* 12:90–101
268. Wieland M, Holm M, Rundlet EJ, Morici M, Koller TO, Maviza TP, Pogorevc D, Osterman IA, Müller R, Blanchard SC, Wilson DN (2022) The cyclic octapeptide antibiotic argyrisin B inhibits translation by trapping EF-G on the ribosome during translocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 119:e2114214119
269. Wijesekara P, Yadav P, Perkins LA, Stolz DB, Franks JM, Watkins SC, Reinoso Jacome E, Brody SL, Horani A, Xu J, Barati Farimani A, Ren X (2022) Engineering rotating apical-out airway organoid for assessing respiratory cilia motility. *iScience* 25:104730
270. Wijk SC, Prabhala P, Michalíková B, Sommarin M, Doyle A, Lang S, Kanzenbach K, Tufvesson E, Lindstedt S, Leigh ND, Karlsson G, Bjermer L, Westergren-Thorsson G, Magnusson M (2021) Human Primary Airway Basal Cells Display a Continuum of Molecular Phases from Health to Disease in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 65:103–113
271. Wiley CD, Campisi J (2016) From Ancient Pathways to Aging Cells—Connecting Metabolism and Cellular Senescence. *Cell Metabolism* 23:1013–1021
272. Williams CC, Singleton BA, Llopis SD, Skripnikova EV (2013) Metformin Induces a Senescence-associated Gene Signature in Breast Cancer Cells. *hpu* 24:93–103
273. Williams K, Roman J (2016) Studying human respiratory disease in animals – role of induced and naturally occurring models. *The Journal of Pathology* 238:220–232
274. Woldhuis RR, De Vries M, Timens W, Van Den Berge M, Demaria M, Oliver BGG, Heijink IH, Brandsma C-A (2020) Link between increased cellular senescence and extracellular matrix changes in COPD. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 319:L48–L60
275. Woldhuis RR, Heijink IH, Van Den Berge M, Timens W, Oliver BGG, De Vries M, Brandsma C-A (2021) COPD-derived fibroblasts secrete higher levels of senescence-associated secretory phenotype proteins. *Thorax* 76:508–511

276. Wosniok PR, Knopf C, Dreisigacker S, Orozco-Rodriguez JM, Hinkelmann B, Mueller PP, Brönstrup M, Menche D (2020) SAR Studies of the Leupyrrins: Design and Total Synthesis of Highly Potent Simplified Leupylogs. *Chemistry A European J* 26:15074–15078
277. Wu Q, Jiang D, Matsuda JL, Ternyak K, Zhang B, Chu HW (2016) Cigarette Smoke Induces Human Airway Epithelial Senescence via Growth Differentiation Factor 15 Production. *Am J Respir Cell Mol Biol* 55:429–438
278. Xu M, Pirtskhalava T, Farr JN, Weigand BM, Palmer AK, Weivoda MM, Inman CL, Ogradnik MB, Hachfeld CM, Fraser DG, Onken JL, Johnson KO, Verzosa GC, Langhi LGP, Weigl M, Giorgadze N, LeBrasseur NK, Miller JD, Jurk D, Singh RJ, Allison DB, Ejima K, Hubbard GB, Ikeno Y, Cubro H, Garovic VD, Hou X, Weroha SJ, Robbins PD, Niedernhofer LJ, Khosla S, Tchkonja T, Kirkland JL (2018) Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat Med* 24:1246–1256
279. Yi G, He Z, Zhou X, Xian L, Yuan T, Jia X, Hong J, He L, Liu J (2013) Low concentration of metformin induces a p53-dependent senescence in hepatoma cells via activation of the AMPK pathway. *International Journal of Oncology* 43:1503–1510
280. Yosef R, Pilpel N, Tokarsky-Amiel R, Biran A, Ovadya Y, Cohen S, Vadai E, Dassa L, Shahar E, Condiotti R, Ben-Porath I, Krizhanovsky V (2016) Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nat Commun* 7:11190
281. Yoshida T, Mett I, Bhunia AK, Bowman J, Perez M, Zhang L, Gandjeva A, Zhen L, Chukwueke U, Mao T, Richter A, Brown E, Ashush H, Notkin N, Gelfand A, Thimmulappa RK, Rangasamy T, Sussan T, Cosgrove G, Mouded M, Shapiro SD, Petrache I, Biswal S, Feinstein E, Tudor RM (2010) Rtp801, a suppressor of mTOR signaling, is an essential mediator of cigarette smoke–induced pulmonary injury and emphysema. *Nat Med* 16:767–773
282. Young ARJ, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JFJ, Tavaré S, Arakawa S, Shimizu S, Watt FM, Narita M (2009) Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev* 23:798–803
283. Yun MH, Davaapil H, Brockes JP (2015) Recurrent turnover of senescent cells during regeneration of a complex structure. *eLife* 4:e05505
284. Zhou H-X, Ou X-M, Tang Y-J, Wang L, Feng Y-L (2015) Advanced Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Innovative and Integrated Management Approaches. *Chinese Medical Journal* 128:2952–2959

285. Zhu Y, Tchkonina T, Pirtskhalava T, Gower AC, Ding H, Giorgadze N, Palmer AK, Ikeno Y, Hubbard GB, Lenburg M, O'Hara SP, LaRusso NF, Miller JD, Roos CM, Verzosa GC, LeBrasseur NK, Wren JD, Farr JN, Khosla S, Stout MB, McGowan SJ, Fuhrmann-Stroissnigg H, Gurkar AU, Zhao J, Colangelo D, Dorronsoro A, Ling YY, Barghouthy AS, Navarro DC, Sano T, Robbins PD, Niedernhofer LJ, Kirkland JL (2015) The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell* 14:644–658
286. Zhu Y, Doornebal EJ, Pirtskhalava T, Giorgadze N, Wentworth M, Fuhrmann-Stroissnigg H, Niedernhofer LJ, Robbins PD, Tchkonina T, Kirkland JL (2017) New agents that target senescent cells: the flavone, fisetin, and the BCL-XL inhibitors, A1331852 and A1155463. *Aging* 9:955–963
287. Preclinical Development: The Safety Hurdle Prior to Human Trials. *American Pharmaceutical Review*

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Schematische Darstellung der verschiedenen Bereiche im Lungensystem.

Abb. 2 Zelluläre Seneszenz kann durch mehrere Ursachen entstehen.

Abb. 3 Seneszenztest mit nicht-differenzierten Basalzellen.

Abb. 4 Repräsentative Histologie eingebetteter Organoide nach Stimulation (HE-Färbung).

Abb. 5 Dox induziert einen Seneszenz-ähnlichen Phänotyp in 3D-Bronchialorganoiden.

Abb. 6 Die Integrität der Organoide wurde durch die Stimulation mit Dox, Dox + Quer und Dox + Das nicht verändert.

Abb. 7 Quer und Das wirken der Dox-induzierten Seneszenz entgegen.

Abb. 8 Expression von IL-8, TIMP-1, GDF-15, MIP-2, IL-13 nach Stimulation.

Abb. 9 Western-Blot nach Stimulation mit Dox, Das und Quer.

Abb. 10 TIMP-2 assoziierte mit p21-positiven Kernen.

Abb. 11 Met hemmt die Seneszenz in Organoiden nicht.

Abb. 12 Quer verringert die SA- β -Gal-Aktivität nach initialer Behandlung mit Dox.

Abb. 13 Die Einzelzellanalyse zeigt unterschiedliche Epithelzellpopulationen.

Abb. 14 Quer verringert die Anzahl der Zellen, die Seneszenzmarker exprimieren.

Abb. 15 Dox induziert die Expression von Entgiftungsfaktoren in Becherzellen.

Abb. 16 Regulon-Analyse der Einzelzelldaten.

Abb. 17 Integrität, Anzahl und Durchmesser der Apikal-Out-Organoide nach Stimulation mit IL-13.

Abb. 18 Fluoreszenzfärbung für MUC5B nach Stimulation mit IL-13.

Abb. 19 IL-13-stimulierte Apikal-Out-Organoide zeigten eine erhöhte Expression von *MUC5AC* sowie eine verringerte Expression von *FOXJ1*.

Abb. 20 Nach Stimulation mit IL-13 zeigten die Apikal-Out-Organoide eine herunterregulierte Bewegung sowie eine geringere Anzahl an Zilien.

Abb. 21 Stimulation mit IL-13 führte zum Verlust der Zilien.

Abb. 22 Die Apikal-Out-Organoide zeigten nach Stimulation mit IL-13 eine reduzierte Zilienbewegung sowie eine erhöhte sekretorische Zelldifferenzierung.

Abb. 23 Die Basalzellen differenzieren über einen Zeitraum von 8 Tagen zu zilientragenden Organoiden, ohne Becherzellen auszubilden.

Abb. 24 Basalzellen differenzieren über deuteromale Zellen zu Zilienzellen.

Abb. 25 Die Behandlung mit NTHi während der Differenzierungsphase führte zu einer verstärkten Expression von Entzündungsmediatoren in Basalzellen.

Abb. 26 Die Apikal-Out-Organoiden wurden für 48 Stunden mit der HIPS-Substanz 86 und inaktivierten Bakterien stimuliert.

Abb. 27 Die Apikal-Out-Organoiden wurden für 48 Stunden mit den HIPS-Substanzen 42 und 43 sowie inaktivierten Bakterien stimuliert.

Abb. 28 Schema der 3D-Lungenorganoid-Plattform zur präklinischen Prüfung von Wirkstoffen.

Abb. S1 Monokel-Analyse der Einzelzelldaten.

Abb. S2 Exprimierte Basalzellmarker in behandelten und unbehandelten Organoiden.

Abb. S3 Exprimierte sekretorische Zellmarker in behandelten und unbehandelten Organoiden.

Abb. S4 Exprimierte Becherzell-, Zilienzell- und Seneszenz-Markern in behandelten und unbehandelten Organoiden.

Abb. S5 Die Einzelzelldaten (E1) wurden mit einem unabhängigen Datensatz kombiniert, der unbehandelte Organoiden von 5 Spendern (E2) enthielt.

Abb. S6 Expression verschiedener Marker in 5 verschiedenen Spendern.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte mit Herstellerangabe

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangabe

Tabelle 3: Verwendete humane RT-qPCR-Primer

Tabelle 4: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper für den Western Blot

Tabelle 5: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper in der Immunhistochemie

Tabelle 6: Verwendete Medien und Lösungen

Tabelle 7: Zusammensetzung PneumaCult-Medium (10 ml)

Tabelle 8: Stimulation zur RNS-Isolation/Einbettung

Tabelle 9: Stimulation für die Einzelzellsequenzierung

Tabelle 10: Komponenten des cDNS-Puffer pro Probe

Tabelle 11: Programm der cDNS-Synthese

Tabelle 12: Einfacher Reaktionsansatz des Master-Mix für RT-qPCR pro Probe

Tabelle 13: Durchgeführtes RT-qPCR-Programm

Tabelle 14: Standard-Cocktail zur Luminex Messung

Tabelle 15: Unterschiedliche Stimuli der Organoide für die Einzelzellsequenzierung

Tabelle 16: Zellzahl und Viabilität der Zellen nach Vereinzeln der Organoide

Tabelle 17: Zellzahl und Viabilität der Zellen nach Zugabe der Sample Tags

Tabelle 18: Benötigte Menge an markierten Zellen sowie Puffer

Tabelle 19: Inkubation des Random Primermix mit den Beads

Tabelle 20: Inkubation des Extensionsenzymmix mit den Beads

Tabelle 21: Sample Tag PCR1

Tabelle 22: RPE-PCR

Tabelle 23: WTA-Index-PCR

Tabelle 24: Sample Tag PCR2

Tabelle 25: Finale Sample Tag-Index-PCR

Tabelle 26: Zellzahl pro Probe im 10X Single Cell Experiment (IL-13)

Tabelle 27: Menge (μl) pro Probe in Spur 1

Tabelle 28: Menge (μl) pro Probe in Spur 2

Tabelle 29: Verwendete Cell Recovery und geladene Zellzahl zum 10X Single Cell Experiment

Tabelle 30: Zellzahl pro Spur, die auf den Chip geladen wird

Tabelle 31: GEM-RT Inkubation (IL-13)

Tabelle 32: cDNS-Amplifikation mittels PCR (IL-13)

Tabelle 33: Fragmentierung der cDNS, Endreparatur und A-Tailing (IL-13)

Tabelle 34: Ligation der Sequenzieradapter (IL-13)

Tabelle 35: Index-PCR (IL-13)

Tabelle 36: Zellzahl pro Probe im 10X Single Cell Experiment (NTHi)

Tabelle 37: Zellzahl nach Poolen der Gruppen

Tabelle 38: GEM-RT Inkubation (NTHi)

Tabelle 39: cDNS-Amplifikation mittels PCR (NTHi)

Tabelle 40: Fragmentierung der cDNS, Endreparatur und A-Tailing (NTHi)

Tabelle 41: Ligation der Sequenzieradapter (NTHi)

Tabelle 42: Index-PCR (NTHi)

Tabelle S1: Getestete HIPS-Substanzen

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
AEC1	Alveoläre Typ-I-Zellen
AEC2	Alveoläre Typ-II-Zellen
AK	Antikörper
ALDH	Aldehyddehydrogenasen
ALDH1A3	Aldehyddehydrogenase-1-Familie, Mitglied A3
ALOX15	Arachidonate 15-Lipoxygenase
ASAP	Acute stress-associated phenotype
ASC	Adulte Gewebestammzellen
BATF	Basic Leucine Zipper ATF-Like Transcription Factor
BCA	Bicinchoninsäure
BPIFB1	BPI Fold Containing Family B Member 1
BSA	Rinderserumalbumin
CDKI	Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor
CDKN1A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A
CDKN2A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
cDNS/cDNA	komplementäre DNS/DNA
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
COPD	Chronisch obstruktive Atemwegserkrankung
CXCL	C-X-C motif chemokine ligand
CYP1A1/2	Cytochrom P450, Familie 1, Unterfamilie A, Polypeptid 1/2
C9ORF24	Chromosome 9 open reading frame 24
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
Das	Dasatinib
DAW1	Dynein Assembly Factor with WD Repeats 1
DDR	DNA-Schadensantwort
DM	Differenzierungsmedium
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dox	Doxorubicin
DQ	Kombination aus Dasatinib und Quercetin
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor

EHS	Engelberth-Holm-Swarm
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EZM	Extrazelluläre Matrix
E2F7	E2F Transcription Factor 7
FA	Formic Acid (Ameisensäure)
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting – Durchflusszytometrie
FCGBP	Fc-Gamma-Binding-Protein
FCS	Fetales Kälberserum
FOXJ1	Forkhead box protein J1
GDF-15	Wachstums-/Differenzierungsfaktors 15
GEM	Gel Bead-in-Emulsions
GO	Gene Ontology
GOLD	Global Obstructive Lung Disease
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIPS	Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland
HMGB1	High-Mobility Group Box 1
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IAA	Iodessigsäure
IGF	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor
IHC	Immunhistochemie
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IL-13	Interleukin-13
KDEL2	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) containing 2
KRT5	Keratin 5
LDH	Laktatdehydrogenase
MDB	Membran Desalting Buffer
Met	Metformin
MIP-2	Macrophage inflammatory protein-2
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNS	Messenger-RNS
mTOR	mammalian target of rapamycin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
MUC5AC	Muzin 5AC

MUC5B	Muzin 5B
NC	Negativkontrolle
NTHi	Non-typeable <i>Haemophilus influenzae</i>
PAO1	Pseudomonas aeruginosa PAO1
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
(RT-q)PCR	(real-time quantitative) Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	platelet-derived growth factor
PNEC	Pulmonale neuroendokrine Zellen
PRDM1	PR-Domänen-Zinkfingerprotein 1
(h)PSC	(Humane) Pluripotente Stammzellen
Quer	Quercetin
ROCK-Inhibitor	Rho-Kinase-Inhibitoren
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPE	random priming and extension
RSPH1	Radial Spoke Head Component 1
RT	Raumtemperatur
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2
SASP	Seneszenten assoziierten sekretorischen Phänotyp
SA-β-Gal	Seneszenz-assoziierte β-Galactosidase
SCGB1A1	Secretoglobin Family 1A Member 1
scRNA-Seq	Single Cell Sequencing (Einzelzellsequenzierung)
SD	Standardabweichung
SDS	sodium dodecylsulfate
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
shRNS	Short hairpin RNS
Sncs	Seneszente Zellen
SNN	Shared Nearest Neighbours
SPDEF	SAM pointed domain containing ETS transcription factor
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered saline with Tween20
TFA	Trifluoacetat
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
TIMP-1/2	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1/2
TNS	Trypsin Neutralisation Solution
TP63	Tumorprotein 63

UMAP	Uniform Manifold Approximation and Projection
UMI	Unique Molecular Identifier
WDR19	WD Repeat Domain 19
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WST	water-soluble tetrazolium salt
WTA	Whole Transcriptome Analysis
2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional

Veröffentlichungen

- **Brand, M., Ritzmann, F., Kattler, K. et al. Biochemical and transcriptomic evaluation of a 3D lung organoid platform for pre-clinical testing of active substances targeting senescence.** *Respir Res* 25, 3 (2024). doi: 10.1186/s12931-023-02636-7
- Yiwen Yao, Felix Ritzmann, Sarah Miethe, Kathrin Kattler-Lackes, Betül Colakoglu, Christian Herr, Andreas Kamyschnikow, **Michelle Brand**, Holger Garn, Daniela Yildiz, Frank Langer, Robert Bals & Christoph Beisswenger **Co-culture of human AT2 cells with fibroblasts reveals a MUC5B phenotype: insights from an organoid model.** *Mol Med* 30, 227 (2024). doi: 10.1186/s10020-024-00990-w
- Ritzmann F, **Brand M**, Bals R, Wegmann M, Beisswenger C. **Role of Epigenetics in Chronic Lung Disease.** *Cells*. 2025 Feb 10;14(4):251. doi: 10.3390/cells14040251
- **Brand M**, Kempen P, Risch T et al. **IL-13 drives a mucin phenotype: insights from a human apical out airway organoid model.** *European Respiratory Journal* 2024 64(suppl 68): PA2670; doi: 10.1183/13993003.congress-2024.PA2670
- In Vorbereitung: Mariana S. Guedes, **Michelle Brand**, Felix Ritzmann, Timo Risch, Patrick Kempen, Andreas Kamyschnikow, Christian Herr, Frank Langer, Robert Bals, Christoph Beisswenger, Daniela Yildiz. **HTS-LENTI: A lentiviral reporter platform for live imaging-based drug screening in apical-out airway organoids.**
- In Vorbereitung: Felix Ritzmann, **Michelle Brand**, Gilles Gasparoni, Xuan, Jörn Walter, Frank Langer, Christian Herr, Yiwen Yao, Daniela Yildiz, Robert Bals, Christoph Beisswenger. **Epigenetic imprinting of airway basal cells by smoking and COPD.**

Konferenzbeiträge

- Poster EUSAAT Linz 2022
- Poster Herbsttagung Marburg 2022
- Vortrag Herbsttagung Marburg 2022
- Poster LSC Estoril 2023
- Poster ISAM Saarbrücken 2023
- Poster LSC Estoril 2024
- Vortrag Forschungspreis „Alternative für Tierversuche“
- Poster ESC Wien 2024
- Poster 3R Symposium Saarbrücken 2024
- Poster Herbsttagung (DZL) Freiburg 2024
- Poster Lung Science Meeting (DZL) Hannover 2025

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Christoph Beißwenger danken. Für seine fachliche Begleitung, die konstruktive Kritik und das Vertrauen, das er mir während der gesamten Promotionszeit entgegengebracht hat. Ohne seine Unterstützung wäre diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Ein weiterer Dank geht an Prof. Dr. Robert Bals, der mir die Möglichkeit zur Doktorarbeit gegeben hat und mich jederzeit unterstützt hat.

Meinen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe danke ich für den inspirierenden Austausch, die Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit. Ihr habt nicht nur zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, sondern auch den Alltag mit Humor und Freude bereichert. Ein besonderer Dank geht hierbei an Dr. Felix Ritzmann, ohne dessen Hilfe die Ausführung und Auswertung der Einzelzellaten nicht möglich gewesen wäre (Überstand weg?). Auch möchte ich mich bei meiner Kollegin und Freundin Isabell bedanken, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie. Ihr wart stets meine stärkste Stütze, habt mir Rückhalt gegeben und mich immer wieder daran erinnert, worauf es wirklich ankommt. Ohne euch würde ich heute nicht da stehen, wo ich jetzt bin.

Auch meine Freunde möchte ich nicht unerwähnt lassen: Danke für die Ablenkung, Motivation, aufbauende Worte und dafür, dass ihr mir immer ein Gefühl von Leichtigkeit geschenkt habt, wenn es nötig war.

Meinem Partner Sven danke ich von Herzen für die unermüdliche Geduld, das Verständnis in stressigen Phasen und die Unterstützung. Und nicht zuletzt möchte ich meinem Hund Josie danken, die mit ihrer bedingungslosen Freude, Geduld und unzähligen Spaziergängen für die nötige Balance gesorgt hat. Was würde ich nur ohne euch beide machen?

Allen, die mich auf diesem Weg begleitet haben, vielen lieben Dank!

Lebenslauf

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

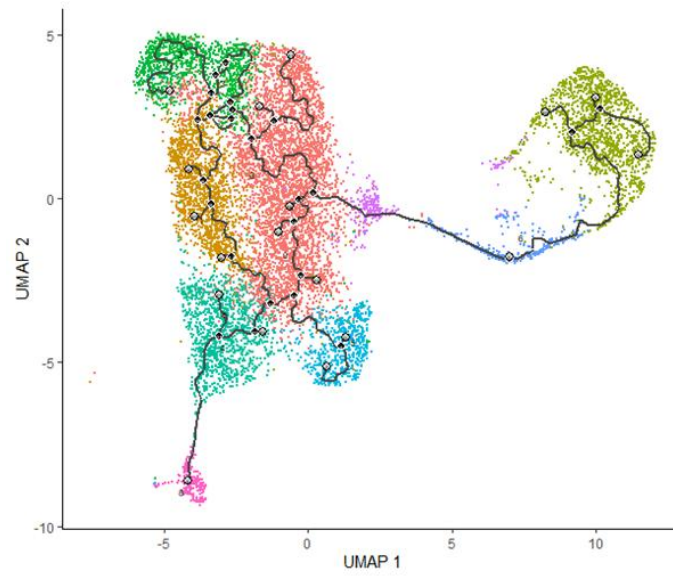


Abb. S1 Monokel-Analyse der Einzelzelldaten. Transitional basale und sekretorische Zellen bewegen sich in der Monokel-Trajektorie in Richtung seneszenter Zellen.

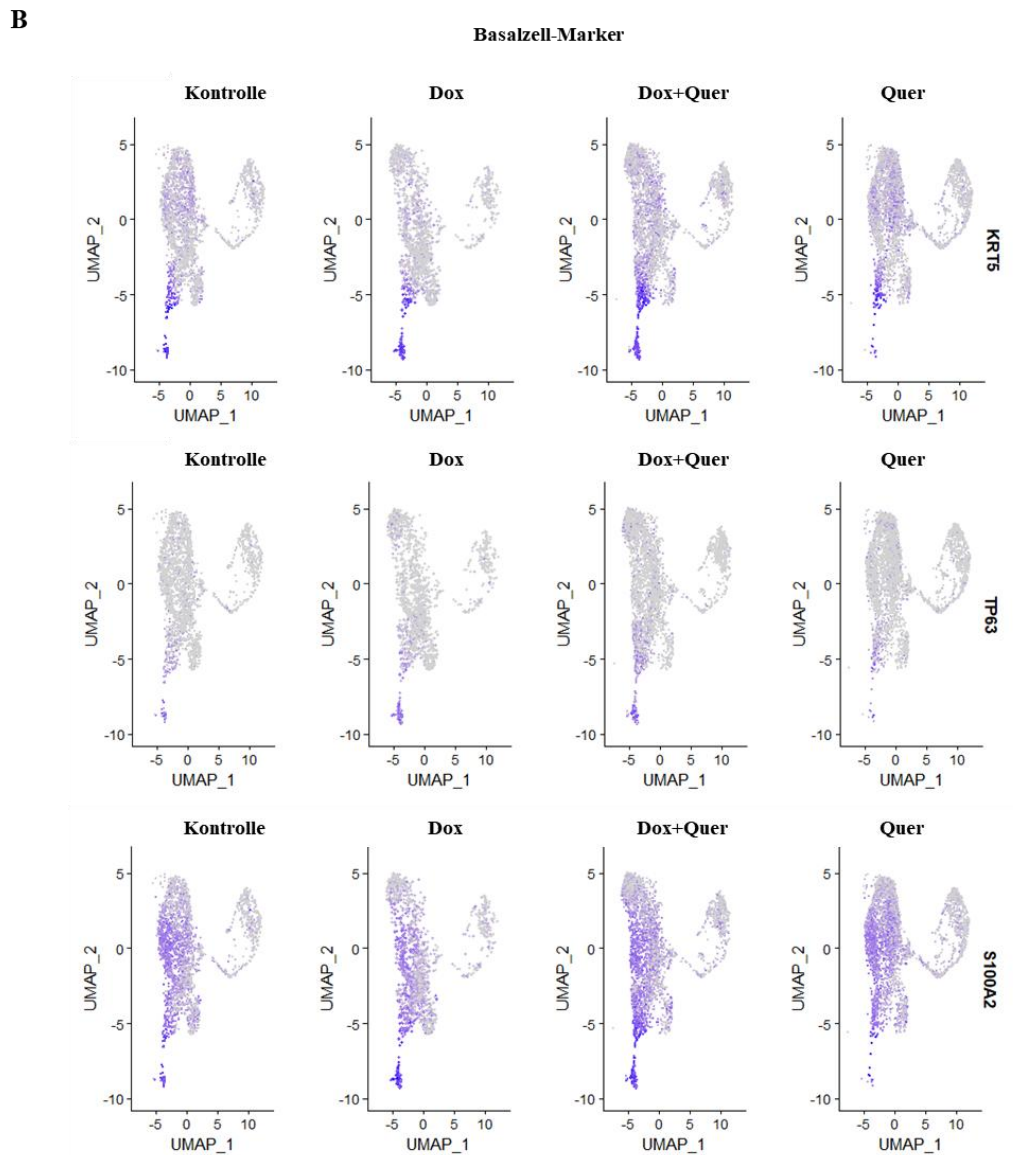
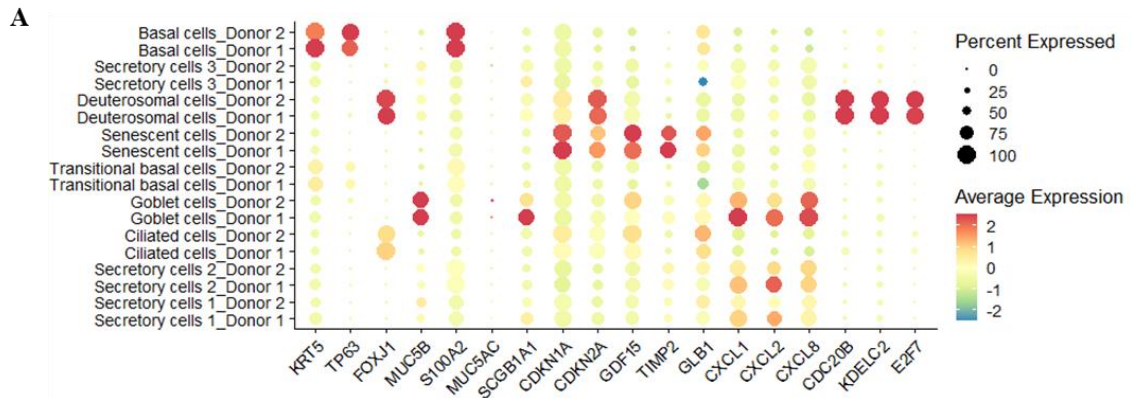


Abb. S2 Exprimierte Basalzellmarker in behandelten und unbehandelten Organoiden. Organoide wurden 48 Stunden lang mit Dox oder Kontrollmedium vorbehandelt. Die mit Kontrollmedium vorinkubierten Organoide wurden mit Kontrollmedium oder Quer behandelt, die mit Dox vorinkubierten Organoide wurden weitere 48 Stunden mit Dox oder der Kombination aus Quer und Dox behandelt. (A) Dotplot, der die Expression von Epithelzelltyp-Markern zeigt. (B) UMAP-Visualisierung von Basalzellmarkern.

Sekretorische Zellmarker

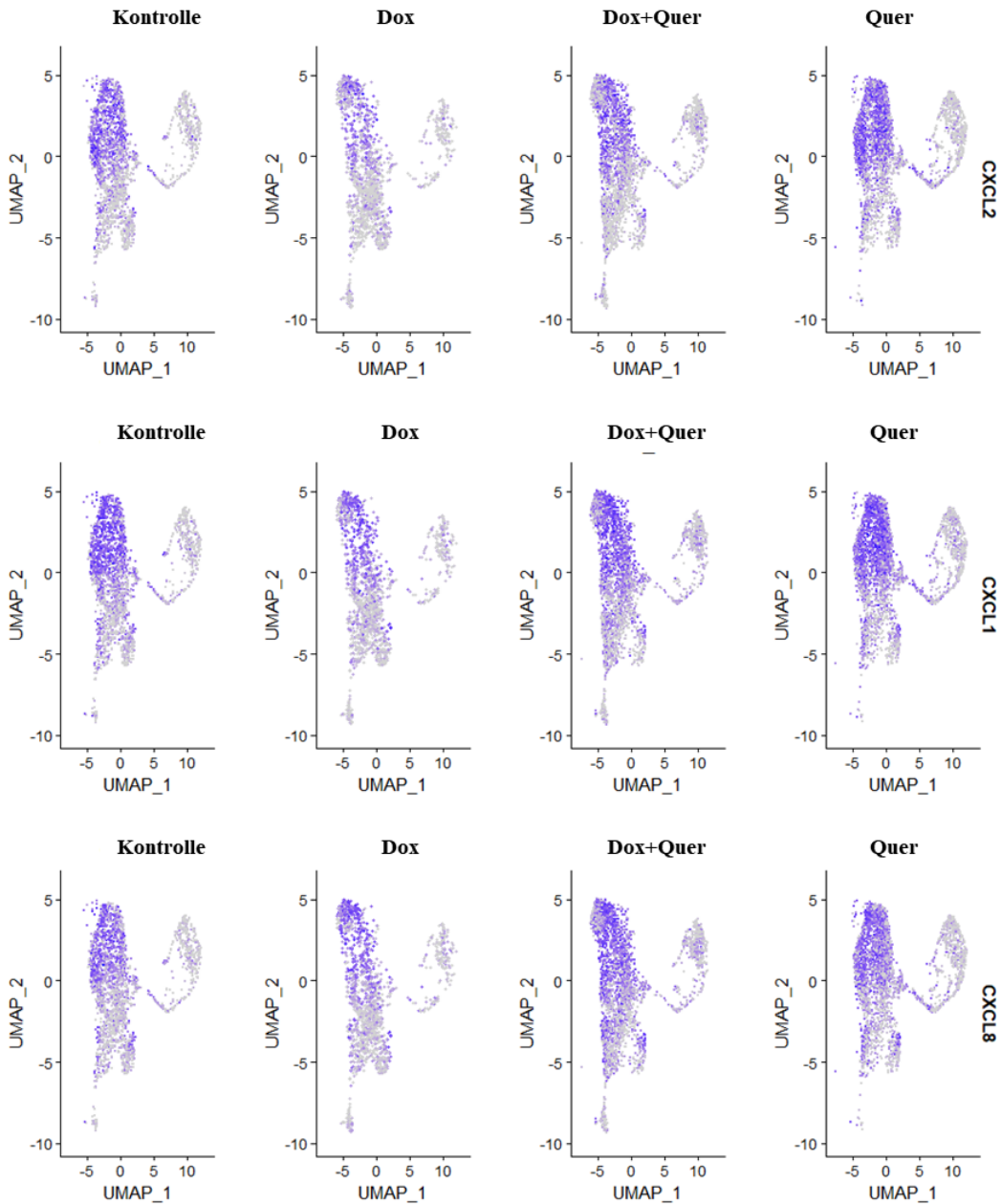


Abb. S3 Exprimierte sekretorische Zellmarker in behandelten und unbehandelten Organoiden. Organoide wurden 48 Stunden lang mit Dox oder Kontrollmedium vorbehandelt. Die mit Kontrollmedium vorinkubierten Organoide wurden mit Kontrollmedium oder Quer behandelt, die mit Dox vorinkubierten Organoide wurden weitere 48 Stunden mit Dox oder der Kombination aus Quer und Dox behandelt. UMAP-Visualisierung von Zellmarkern für sekretorische Zellen.

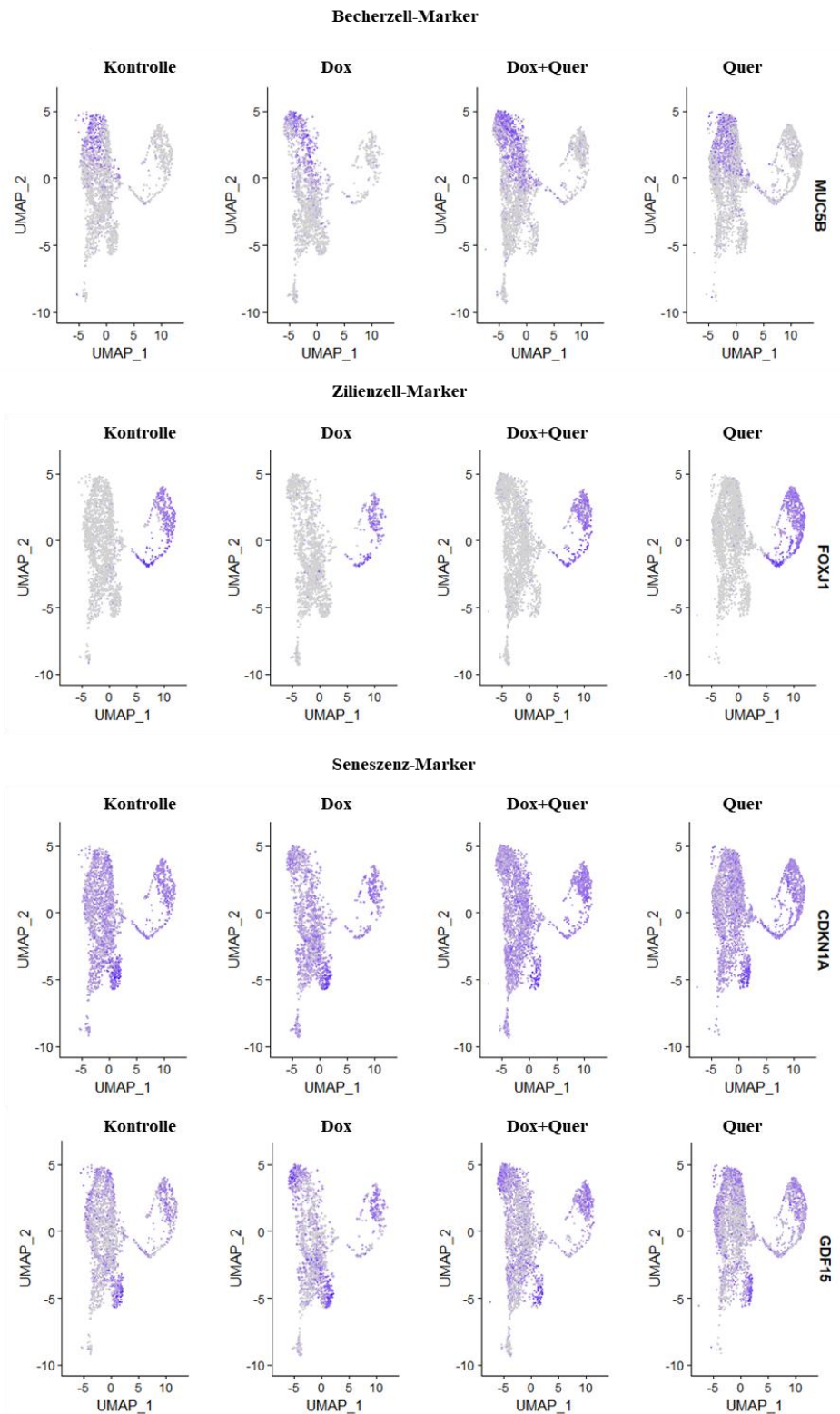


Abb. S4 Exprimierte Becherzell-, Zilienzell- und Seneszenz-Markern in behandelten und unbehandelten Organoiden. Organoide wurden 48 Stunden lang mit Dox oder Kontrollmedium vorbehandelt. Die mit Kontrollmedium vorinkubierten Organoide wurden mit Kontrollmedium oder Quer behandelt, die mit Dox vorinkubierten Organoide wurden weitere 48 Stunden mit Dox oder der Kombination aus Quer und Dox behandelt. UMAP-Visualisierung von Zellmarkern für Becher-, Zilien und seneszente Zellen.

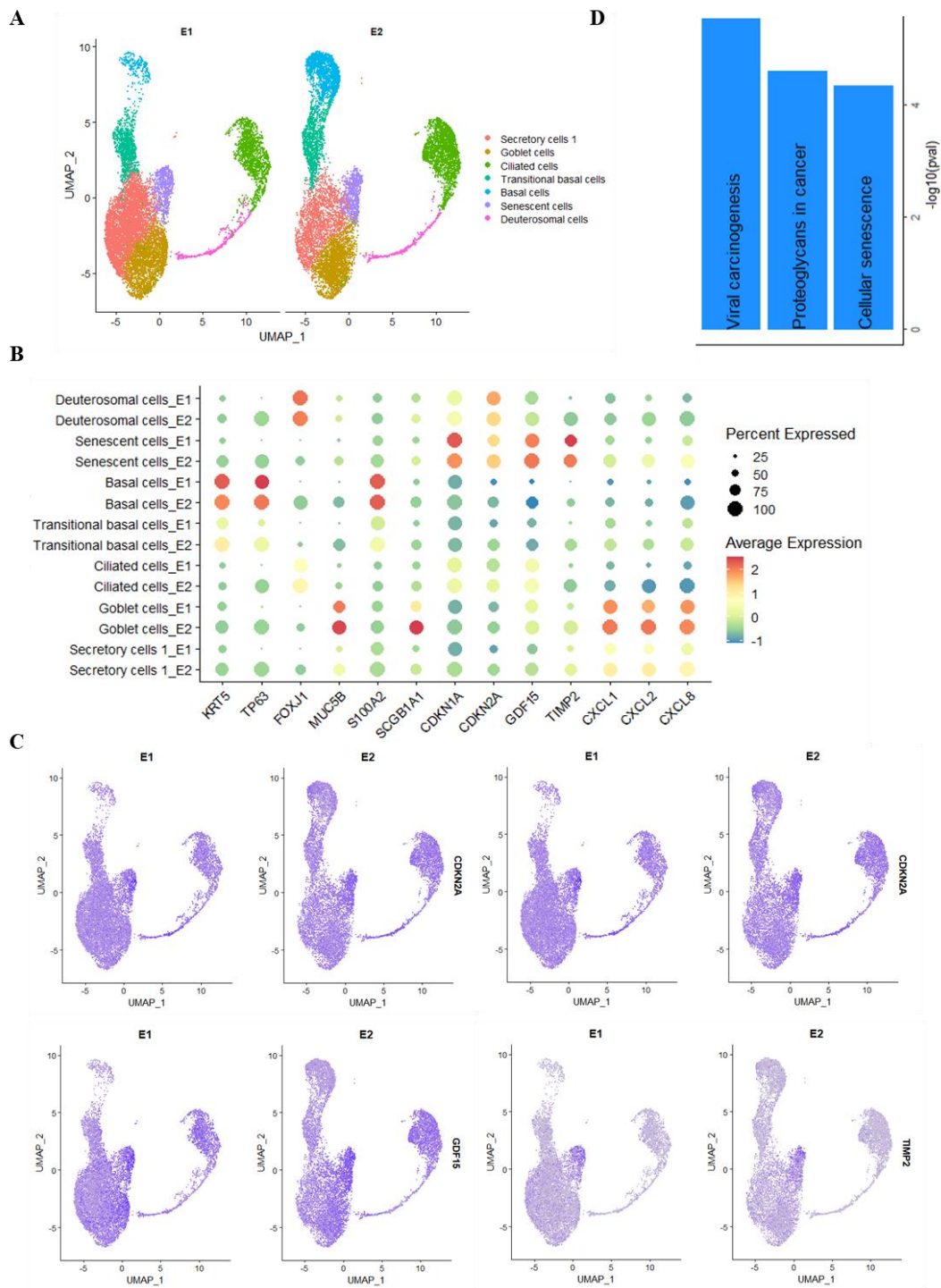


Abb. S5 Die Einzelzelldaten (E1) wurden mit einem unabhängigen Datensatz kombiniert, der unbehandelte Organoide von 5 Spendern (E2) enthält. (A) UMAP-Visualisierung der wichtigsten Epithelzelltypen kombinierter Datensätze. (B) Dotplot, der die Expression von Epithelzelltyp-Markern zeigt. (C) UMAP-Visualisierung von Seneszenzmarkern. (D) Balkendiagramm der Hallmark-Genset-Anreicherungsanalyse (KEGG_2019_Human, zweiseitige Wilcoxon-Rangsumme) für Pfade, die in seneszenten Zellen angereichert sind.

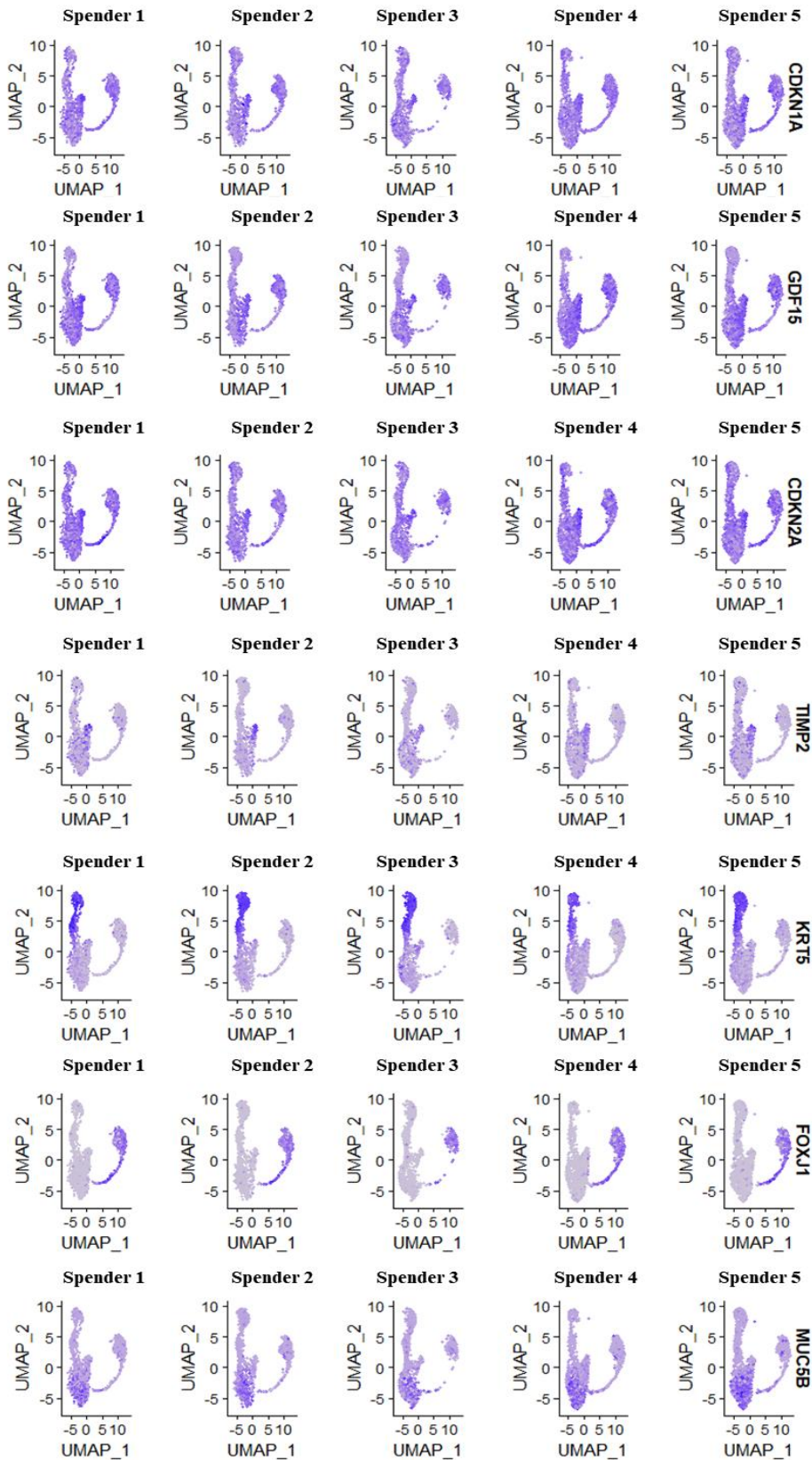


Abb. S6 Expression verschiedener Marker in 5 verschiedenen Spendern. Die Einzelzelldaten wurden mit einem unabhängigen Datensatz kombiniert, der unbehandelte Organoide von 5 Spendern enthielt. UMAP-Visualisierung von Zellmarkern für die 5 Spender.

Tag der Promotion: 01.06.2026

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig

Berichterstatter: Prof. Dr. Christoph Beisswenger

Prof. Dr. Daniela Yildiz