

AUS DER KLINIK FÜR ORTHOPÄDIE UND UNFALLCHIRURGIE  
DIREKTION: PROF. DR. ANDREAS SEEKAMP, PROF. DR. BABAK MORADI

IM UNIVERSITÄTSKLINIKUM SCHLESWIG-HOLSTEIN, CAMPUS KIEL  
AN DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL

# Einfluss von Vitamin D3 auf humane Alveolarepithelzellen in Primärkultur

---

INAUGURALDISSERTATION  
ZUR  
ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE DER MEDIZIN  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL

**vorgelegt von:**  
**STEFANIE AVITAL KRANTZ**  
**AUS SANTA CRUZ, KALIFORNIEN**

**KIEL, 2023**

1. BerichterstatterIn: Prof. Dr. rer. nat. Sabine Fuchs, Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie

2. BerichterstatterIn: Prof. Dr. Jürgen Harder, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie

Tag der mündlichen Prüfung: 08.04.2025

zum Druck genehmigt: Kiel, den 13.01.2025

gez. Prof. Dr Sabine Fuchs (Vorsitzende der Prüfungskommission)

# Inhaltsverzeichnis

1	Glossar .....	III
2	Einleitung.....	1
2.1	Die menschliche Lunge.....	1
2.1.1	Die alveolokapilläre Membran .....	1
2.1.2	Epithelzellen der Lunge und ihre Funktion.....	1
2.1.3	Alveolarepithelzellen Typ 1 .....	2
2.1.4	Alveolarepithelzellen Typ 2 .....	3
2.1.5	Keulenzellen .....	4
2.1.6	Bürstenzellen und DCLK1 .....	4
2.1.7	Stammzellpopulationen im Alveolarepithel.....	5
2.1.8	Endothelzellen der Lunge und ihre Interaktion mit dem Alveolarepithel.....	6
2.2	Vitamin D3.....	6
2.3	In der Arbeit untersuchte Zielproteine.....	8
2.4	Transepithelialer elektrischer Widerstand.....	13
2.5	Klinischer Kontext: ARDS und SARS-CoV 2 .....	14
2.6	Vorarbeiten an H441 Zellen .....	15
2.7	Zielsetzung und Vorgehen .....	16
3	Material und Methoden .....	19
3.1	Chemikalien und Geräte.....	19
3.1.1	Reagenzien .....	19
3.1.2	Rezeptur von Kulturmedien und Puffern .....	20
3.1.3	Ansatz von Reagenzien für die Primärzellisolation und -Behandlung.....	22
3.1.4	Kits .....	22
3.1.5	Primärantikörper für Immunhistochemie .....	23
3.1.6	Sekundärantikörper für Immunhistochemie.....	23
3.1.7	PCR Primer.....	24
3.1.8	Verbrauchsmaterialien .....	24
3.1.9	Geräte .....	26
3.1.10	Software .....	27
3.2	Gewinnung der Primärzellen.....	27
3.2.1	Herkunft des Gewebes .....	27
3.2.2	Isolation der Alveolarepithelzellen.....	28

3.2.3	Isolation der Endothelzellen.....	28
3.3	Kultursystem und Behandlung mit Vitamin D3 .....	29
3.3.1	Transwell® System:.....	29
3.3.2	Kulturbedingungen und Behandlungsschema .....	29
3.4	Immunhistochemische Färbungen .....	30
3.5	Quantitative realtime PCR.....	31
3.6	Auszählung der proliferierenden Zellen .....	31
3.7	Kontrollversuche an Endothelzellen.....	32
3.7.1	Kulturbedingungen.....	32
3.7.2	Färbungen, PCR und Widerstandsmessungen von HPMEC Monokulturen .....	32
3.8	Statistik .....	33
4	Ergebnisse.....	34
4.1	Verhalten der Zellen im Kulturverlauf .....	34
4.2	Einfluss der Kokultivierung .....	38
4.3	Kontrollversuche an Endothelzellen.....	38
4.4	Einfluss von Vitamin D3 auf die Primärzellen.....	40
4.4.1	Effekte von Vitamin D3 auf Barriere und Transdifferenzierung.....	40
4.4.2	Induktion von DCLK1 durch Vitamin D3 .....	44
4.4.3	Zunahme der Proliferation unter Vitamin D3 .....	45
4.4.4	Charakterisierung der proliferierenden Zellen.....	47
4.4.5	Effekt von Vitamin D3 auf die Immunhomöostase .....	50
4.5	Einfluss von SARS-CoV 2 Proteasen auf HPMEC.....	51
5	Diskussion.....	52
5.1	Etablierung des Kultursystems .....	52
5.2	Effekte von Vitamin D3 auf die Barriere.....	54
5.3	Induktion der DCLK1.....	55
5.4	Förderung pulmonaler Progenitorzellen durch Vitamin D3.....	57
5.5	Einfluss von Vitamin D3 auf die Immunhomöostase der Lunge .....	59
5.6	Einfluss von Vitamin D3 auf das Endothel.....	61
6	Zusammenfassung.....	62
7	Literaturverzeichnis.....	65
8	Anhang.....	76
9	Publikationen.....	79
10	Danksagung .....	80



# 1 Glossar

**ACE** = angiotensin converting enzyme

**AMP** = antimikrobielle Peptide

**ARDS** = acute respiratory distress syndrome

**BASC** = bronchioalveolar stem cells

**BESC** = bronchioepithelial stem cells

**CAMP** = Gen von LL-37

**CC16** = CCSP = club cell secretory protein

**CD31** = cluster of differentiation 31

**CD44** = cluster of differentiation 44

**CD74** = cluster of differentiation 74

**CK14** = cytokeratine 14

**COVID 19** = coronavirus disease 2019

**DCLK1** = doublecortin-like kinase 1

**E-Cad** = epithelial cadherine

**HBD-1** = humanes  $\beta$  Defensin 1

**HBD-2** = humanes  $\beta$  Defensin 2

**hCAP18** = Alternativbezeichnung von LL-37

**HDAC11** = Histondeacetylase 11

**HOPX** = homeobox only protein X

**HPAEPiC** = human primary alveolar epithelial cells

**HPMEC** = human pulmonary microvascular endothelial cells

**IL- 6** = Interleukin 6

**IL-1 $\beta$**  = Interleukin 1 $\beta$

**Krt 14** = Keratin 14

**LC-MS** = liquid chromatography mass spectrometry

**LGR5** = leucin-rich-repeat-containing G protein coupled receptor 5

**LGR6** = leucin-rich-repeat-containing G protein coupled receptor 6

**LPS** = Lipopolysaccharide

**MIF** = Macrophage migration inhibitory factor

**MLCK** = myosin light chain kinase

**Mpro** = main protease

**MUC5B** = mucin 5B

**NF $\kappa$ B** = nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells

**OEC** = outgrowth endothelial cells

**qPCR** = quantitative real-time polymerase chain reaction

**RAAS** = Renin-Angiotensin-Aldosteron System

**RXR** = retinoid X receptor

**SARS-CoV 2** = severe acute respiratory distress syndrome coronavirus 2

**sftpc** = surfactant protein C (Gen)

**SP-A** = Surfactant Protein A

**SP-B** = Surfactantprotein B

**Cav-1** = Caveolin 1

**SP-C** = Surfactant Protein C (Protein)

**SP-D** = Surfactantprotein D

**TEER** = transepithelial electrical resistance

**TH1** = Typ 1 T-Helferzelle

**TH17** = Typ 17 T-Helferzelle

**TH2** = Typ 2 T-Helferzelle

**Treg** = regulatorische T-Helferzelle

**Trp 6** = transient receptor potential channel 6

**VD3** = Vitamin D3

**VDBP** = Vitamin D bindendes Protein

**VDR** = Vitamin D Rezeptor

**VDRE** = Vitamin D responsive Element

**VE-Cad** = vascular endothelial cadherine

**VEGFA** = vascular endothelial growth factor A

**ZO-1** = Zonula occludens 1

## **2 Einleitung**

### **2.1 Die menschliche Lunge**

#### **2.1.1 Die alveolokapilläre Membran**

Die menschliche Lunge besteht neben den Bronchien als luftleitenden Abschnitten aus den knapp vier Millionen Alveolen, in denen der Gasaustausch stattfindet und die als hauchdünne Bläschen die Lunge auskleiden. Die sogenannte alveolokapilläre Membran bildet hierbei die eigentliche Blut-Luft Schranke. Sie besteht aus den Typ 1- und Typ 2 Zellen des Alveolarepithels, dem Endothel der Lungenkapillaren und der dazwischenliegenden Basalmembran. Als einzige Grenze zwischen Blut und Außenwelt stellt sie auf einer Fläche von ca. 120 m<sup>2</sup> eine hochselektive Barriere dar (Lüllmann-Rauch, 2015), die Gasaustausch ermöglichen, gleichzeitig aber auch eine suffiziente Abgrenzung des Blutes gegenüber der Außenwelt schaffen muss. Die Barrierefunktion der alveolokapillären Membran beruht dabei zum einen auf der parazellulären Dichtigkeit, die für eine Kontrolle des Stofftransports unerlässlich ist, zum anderen auf der fein abgestimmten Immunreaktion der Alveolen. Diese muss den Organismus über die große Außenfläche schützen, darf dabei die feine Membran selbst jedoch nicht zerstören. Alveolar- und Endothelzellen dabei stehen in komplexer wechselseitiger Interaktion, um eine gezielte Immunreaktion zu vermitteln, hämodynamische Anpassungen wie die hypoxische Vasokonstriktion (Euler-Liljestrand-Mechanismus) vorzunehmen, aber auch über transzelluläre Transportprozesse den Flüssigkeitsfilm der Lunge zu regulieren, der für eine gleichmäßige Entfaltung der Alveolen von entscheidender Bedeutung ist (Hermanns et al., 2009b; Janga et al., 2018; Phelps, 2001; L. Wang et al., 2013; Yanagi et al., 2015). Über Atmung, immunologische Kontrolle der Gasaustauschfläche und die Regulation von Lungencompliance und Hämodynamik des kleinen Kreislaufs ist die nur 0,6 µm dünne alveolokapilläre Membran unmittelbar an vitale Parameter des Organismus geknüpft. Die komplexen Regulationsmechanismen sind erst ansatzweise verstanden, im Zuge der COVID-19 Pandemie aber erneut in den Fokus der Forschung gerückt, da ihr Verständnis neue Präventions- und Therapiemöglichkeiten eröffnen und im Einzelfall Leben retten kann.

#### **2.1.2 Epithelzellen der Lunge und ihre Funktion**

Das Epithel der Lunge besteht aus dem Bronchial- und Alveolarepithel. Die konduktiven Luftwege, also die Bronchien und Bronchiolen, sind mit Flimmerepithel ausgekleidet, das aus zilienträgenden Zellen, muzinproduzierenden Becherzellen, und vereinzelt neuroendokrinen-, dendritischen- und chemosensorischen Bürstenzellen besteht. Basalzellen regenerieren das Bronchialepithel. In den distaleren Bronchiolen werden die Becherzellen zunehmend von Keulenzellen (ehemals Clarazellen) abgelöst, die an der Surfactantproduktion beteiligt sind und auch als Vorläuferzellen des Alveolarepithels fungieren können (Lüllmann-Rauch, 2015). Das Alveolarepithel schließlich besteht

aus den Typ 1 und Typ 2 Zellen und dient dem Gasaustausch. Die Typ 1 Zellen bilden die eigentliche Gasaustauschfläche und sind dafür hauchdünn abgeflacht und mit ihren weit ausgebreiteten Ausläufern eng miteinander verschränkt. Die Architektur der Lungenbläschen bestimmend, erstrecken sie sich teilweise über mehrere Alveolen (Yang et al., 2016). Sie liegen dem Endothel der Lungenkapillaren eng an, welche die Alveolen netzartig umgeben. In den Nischen zwischen den Typ 1 Zellen liegen die kuboidal geformten Typ 2 Zellen. Sie gelten als Vorläufer der Typ 1 Zellen und als 'Wächter der Alveole', da sie mit der Produktion des Surfactants und ihren immunologischen Eigenschaften das Mikromilieu der Alveole maßgeblich bestimmen (Mason, 2006).

Das Epithel der distalen Luftwege und Alveolen ist vermutlich komplexer organisiert als bisher angenommen. Während Typ 1 Zellen lange als terminal differenziert und postmitotisch galten, gibt es inzwischen zunehmende Evidenz für eine fakultative Plastizität zwischen Typ 1 und Typ 2 Zellen (Schilders et al., 2016) und auch die Typ 2 Zellen stellen ein in sich sehr heterogenes und noch unerforschtes Zellgemisch dar, dessen Hierarchie umstritten ist (Q. Chen et al., 2021). Verschiedene Progenitor- und Stammzellen für die alveoläre Regeneration werden derzeit diskutiert. Insbesondere seit Beginn der COVID-Pandemie wird versucht, irreversible Lungenschäden durch Stammzellediting und Tissue Engineering auszugleichen. Diesbezügliche Forschung beschränkt sich bisher auf in vitro Experimente und Tierversuche, verspricht aber, immenses Potenzial zu haben (Schilders et al., 2016). Bis dahin zielführend scheint die Stimulation von Regenerationsprozessen in vivo durch die Verabreichung präventiver und therapeutischer Substanzen zu sein, zu denen auch Vitamin D3 gehört. Ein tieferes Verständnis der verschiedenen Zellpopulationen, ihrer Funktion und Regulationsmechanismen ist dafür erforderlich.

### 2.1.3 Alveolarepithelzellen Typ 1

Alveolarepithelzellen Typ 1 sind für den Gasaustausch der Lunge zuständig. Nur etwa 8 % der distalen Lungenzellen stellend, bedecken sie etwa 95 % der alveolären Oberfläche (Mason, 2006; Yang et al., 2016). Dafür sind sie hauchdünn ausgebreitet und entsprechend vulnerabel gegenüber endo- und exogenen Noxen - und auch einer überschießenden körpereigenen Immunreaktion. Ein Großteil der Atemwegsphysiologie dient dem Schutz der für Atmung und Überleben unersetzbaren Typ 1 Zellen. Ihre kontinuierlich ausgebildeten Tight Junctions gewährleisten parazelluläre Dichtigkeit und sind damit Korrelat der Lungenbarriere (Yanagi et al., 2015). Typ 1 Zellen regulieren u.a. über die Ausschüttung von *vascular endothelial growth factor A* (VEGFA) die Ausbildung und Funktion des Kapillarendothels und sind vermutlich Vermittler der hypoxischen Vasokonstriktion (Yang et al., 2016). Sie besitzen zudem Kanäle und Pumpen, um Flüssigkeit aus dem Alveolarraum zu resorbieren. Da sie kaum Mitochondrien haben, wird vermutet, dass sie die Energie dazu aus anaerober Glykolyse beziehen (Mason, 2006). In der Embryonalentwicklung entwickeln sie sich direkt aus einer

bipotenten alveolären Progenitorzelle, während sie in der gesunden adulten Lungenhomöostase aus einem Pool sich langsam teilender Typ 2 Zellen gespeist werden. Bei Verletzung werden vermutlich sowohl Typ 2 Zellen für den Ersatz rekrutiert, als auch embryonale Muster reaktiviert, um weitere pulmonale Stammzellen für die Regeneration heranzuziehen (Barkauskas et al., 2013; Desai et al., 2014; Schilders et al., 2016; Treutlein et al., 2014). Typ 1 Zellen gelten als terminal differenziert, eine fakultative Dedifferenzierung und Wiedererlangung von Proliferationsfähigkeit wird jedoch diskutiert (Yang et al., 2016). Als Marker für das Vorliegen von Typ 1 Zellen werden neben anderen HOPX, Aquaporin 5 und Caveolin-1 verwendet, welches Zeichen transzytotischer Transportprozesse ist (Fuchs et al., 2003; Ota et al., 2018; Treutlein et al., 2014; Yang et al., 2016).

#### **2.1.4 Alveolarepithelzellen Typ 2**

Obwohl Typ 2 Zellen nur 5 % der alveolären Fläche bedecken, machen sie mit 15 % einen größeren Anteil der Zellkomposition der distalen Lunge aus als die Typ 1 Zellen (Mason, 2006). Sie produzieren den Surfactant, der durch Reduktion der Oberflächenspannung die Compliance der Lunge erhöht und eine gleichmäßige Entfaltung der Alveolen sichert (Lüllmann-Rauch, 2015). Gleichzeitig wird dadurch verhindert, dass durch die Oberflächenspannung Flüssigkeit aus den Kapillaren angezogen wird. Durch den Transport von Natrium und Wasser nach basolateral regulieren Typ 2 Zellen den Flüssigkeitsfilm der Alveolen, erhalten so den kurzen Diffusionsweg der Gasaustauschfläche und wirken einer Bildung von Ödemen entgegen (Mason, 2006). Die Schädigung von Typ 2 Zellen hat fatale Folgen. Durch den fehlenden Surfactant kollabieren einzelne Alveolen, die sich in ihre Nachbaralveolen entleeren und so Emphyseme entstehen lassen, was die Gasaustauschfläche erheblich reduziert. Ohne Surfactant und Flüssigkeitsresorption der Typ 2 Zellen können Lungenödeme ungehindert entstehen und den Gasaustausch sensibel beeinträchtigen. Neben der Produktion des Surfactants, der auch immunmodulatorische Wirkung hat (Spengler et al., 2018), sind auch die Typ 2 Zellen selbst in die Immunhomöostase der distalen Lunge involviert. Sie sezernieren ein Zytokinprofil, das unter normalen Bedingungen Antigen-toleranz fördert, bei stärkeren Stimuli jedoch eine Immunantwort induziert (Mason, 2006). Typ 2 Zellen haben zudem die Fähigkeit, sich selbst zu erneuern und können zu Typ 1 Zellen transdifferenzieren. Somit fungieren sie als alveoläre Progenitorzellen. Man vermutet, dass eine Subpopulation reifer Typ 2 Zellen für den Typ 1 Nachschub im Gesunden verantwortlich ist, deren Turnover in der adulten Lungenhomöostase sehr langsam ist. Bei Verletzung kann ihre Proliferation und Ausdifferenzierung rapide beschleunigt werden, um eine schnelle Epithelreparatur zu gewährleisten (Barkauskas et al., 2013; Q. Chen et al., 2021; Mandell et al., 2014). Mit diesen Eigenschaften, die das distale Lungenepithel zentral regulieren, werden Typ 2 Zellen nicht umsonst als 'Wächter der Alveole' bezeichnet (Mason, 2006). Es gibt Hinweise, dass SARS-Cov-2 gerade die Typ 2 Zellen befällt und über die Dysregulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (RAAS) zu einer toxischen Schädigung der

Alveolarepithelzellen führt (Santaolalla et al., 2020). Erhalt und Regeneration von Typ 2 Zellen werden seit langem fokussiert erforscht und haben im Zuge der COVID-19 Pandemie neu an Bedeutung gewonnen.

Es wird zunehmend evident, dass Typ 2 Zellen eine in sich heterogene Population abbilden, die aus verschiedenen Subpopulationen besteht (Liu et al., 2015), deren genaue Eigenschaften, definierende Marker und Hierarchie nach wie vor Diskussionsgegenstand sind. Als Typ 2 - spezifisch gilt an ehesten die Produktion des Surfactantproteins C (SP-C) (Treutlein et al., 2014), das auch in der vorliegenden Arbeit als Typ 2 Marker herangezogen wird. Die Oberflächenproteine CD74 und CD44 werden ebenfalls als Typ 2 Marker gehandelt, bilden wahrscheinlich aber nur Subpopulationen der Typ 2 Zellen ab (Q. Chen et al., 2021; Marsh et al., 2009).

#### **2.1.5 Keulenzellen**

Keulenzellen (ehemals Clarazellen) sind zylindrische Zellen der distalen Atemwege, die sich ins Lumen vorwölben, was ihnen ihre namensgebende Form verleiht (Lüllmann-Rauch, 2015). Sie haben Progenitorfunktion und können ebenfalls zu Typ 1 und Typ 2 Zellen, aber auch zu Bronchialepithel differenzieren (Middelhoff et al., 2017; Yuan et al., 2019). Die Surfactantproteine SP-A, SP-B und SP-D, nicht jedoch SP-C, werden neben den Typ 2 Zellen zusätzlich von Keulenzellen produziert (Lüllmann-Rauch, 2015). Wechselseitige Interaktion mit LGR5 und LGR6 positiven Stammzellen und die Sekretion von Liganden des Wnt-Signalweges legen außerdem eine stammzellmodulierende Funktion der Keulenzellen nahe (Barker et al., 2013; Lee et al., 2017). Zudem sind Keulenzellen in die Metabolisierung von Xenobiotika involviert und reduzieren oxidativen Stress (Treutlein et al., 2014). Durch ihre Beteiligung an Regenerationsprozessen und ihren Einfluss auf das Mikromilieu sind Keulenzellen somit essentieller Bestandteil der alveolären Homöostase. Als Marker für Keulenzellen wird häufig das Club Cell secretory protein CCSP (auch Scgb1a1, CC10 oder CC16 genannt) verwendet (Treutlein et al., 2014).

#### **2.1.6 Bürstenzellen und DCLK1**

Bürstenzellen sind kleine ovale Zellen mit einem apikalem Schopf aus kurzen, steifen Mikrovilli, der ihnen ihren Namen gibt (Kasper et al., 1994a). Sie kommen auf fast allen Epithelien einzeln verteilt vor, so auch im Alveolar- und Bronchialepithel (Sbarbati et al., 2005a). Sie fungieren als Chemosensoren und weisen große Ähnlichkeit mit Geschmacksrezeptorzellen auf. Ihre chemosensorischen Signale werden neuronal weitergeleitet und vermitteln in der Lunge die protektive Apnoe bei der Detektion von Bitterstoffen, sowie Bronchodilatation und eine Beschleunigung des Zilienschlags. In den letzten Jahren sind zahlreiche weitere Funktionen der Bürstenzellen bekannt geworden, u.a. eine Schlüsselfunktion in Typ II Immunreaktionen und eine Regulation des Zytokinmilieus, über die sie Regenerationsprozesse induzieren können (O'Leary et al.,

2019). Charakteristisch für Bürstenzellen ist die Expression von DCLK1, Cytokeratin 18 und Villin (Kasper et al., 1994; Middelhoff et al., 2017; Sbarbati et al., 2005). Für Bürstenzellen der Lunge typisch sind außerdem ihre Bedeckung durch Ausläufer der Typ 1 Zellen, eine interdigitierende Verschränkung mit Typ 2 Zellen, die Ausbildung kontinuierlicher Schlussleistenkomplexe zu ihren Nachbarzellen und der bereits erwähnte apikale Schopf aus Mikrovilli (Hijiya et al., 1977a).

Double-cortin-like Kinase 1 (DCLK1) exprimierende Bürstenzellen scheinen außerdem stammzellmodulierende Eigenschaften zu haben, vermutlich indem sie das Mikromilieu der Stammzellnischen beeinflussen (Middelhoff et al., 2017). Eine fakultative Dedifferenzierung zu LGR5 positiven Stammzellen wird ebenfalls diskutiert (O’Leary et al., 2019). Weiterhin hängt ein Knockout der DCLK1, neben defekter Epithelregeneration, eng mit dem Zusammenbruch epithelialer Barrieren zusammen (May et al., 2014; O’Leary et al., 2019; Yi et al., 2018). Eine Modifikation oder Reorganisation von Tight Junctions durch die DCLK1 und nicht zuletzt eine Regulation des kapillären Widerstands (Sbarbati et al., 2005a) scheint ein weiterer Mechanismus der Bürstenzellen zu sein, mit dem sie eine Schlüsselfunktion in der epithelialen Homöostase der Lunge einnehmen.

### 2.1.7 Stammzellpopulationen im Alveolarepithel

Im distalen Lungenepithel gibt es zahlreiche Zelltypen, denen Stammzellcharakter nachgesagt wird. Lange Zeit galten Typ 2 Zellen als einziger Nachschub für Typ 1 Zellen. Diese Annahme weicht inzwischen jedoch zunehmender Evidenz, dass das distale Lungenepithel sich aus verschiedenen Stamm- und Progenitorzellen speisen kann. Ihre Hierarchie ist mitunter komplex und ihre Aktivierungsmodalitäten werden erst sukzessive aufgedeckt. Eine hohe Plastizität der bisher definierten Zelltypen wird mehr und mehr deutlich und bietet zusätzlich Diskussions- aber auch therapeutisches Potenzial (Schilders et al., 2016). Als Zellentitäten, die das Alveolarepithel regenerieren können, kommen in Frage:

- 1) bipotente Progenitorzellen, die sowohl Typ 1 als auch Typ 2 Marker exprimieren und direkt zu beiden Zelltypen differenzieren können. Diese sind vermutlich vor allem in der Embryonalphase aktiv, können bei Verletzung aber reaktiviert werden. (*exprimieren HOPX und Sftpc*)
- 2) Typ 2 Zellen, die sich sowohl selbst erneuern, als auch zu Typ 1 Zellen differenzieren können. Dabei entsteht teilweise ein Typ 1 Progenitortyp, der noch Sftpc exprimiert. Sie sorgen in der gesunden adulten Lungenhomöostase für den Zellschub. (*exprimieren Sftpc*)
- 3) Bronchioalveoläre Stammzellen (BASC), die Typ 2 Zellen und Zilienzellen hervorbringen können. (*exprimieren Scgb1a1 und Sftpc*)
- 4) Typ 1 Zellen, die entgegen bisheriger Annahmen vermutlich proliferieren und zu Typ 2 Zellen differenzieren können. (*exprimieren HOPX*)

- 5) Keulenzellen, die sich selbst erneuern und Alveolarepithel- und Bronchialepithel hervorbringen können. (*exprimieren Scgb1a1*)

Keulenzellen regenerieren sich selbst und aus

- 6) alveolären Progenitorzellen, die ebenfalls zu Typ 2 Zellen und Keulenzellen differenzieren können. (*exprimieren weder Scgb1a1 noch Sftpc, sondern Integrin  $\alpha 6$  und Integrin  $\beta 4$* )
- 7) Basalzellen, die alle Zellen des Bronchialepithels hervorbringen können: Keulenzellen Zilienzellen, Neuroendokrine Zellen und Becherzellen (*exprimieren Krt5 und Trp63*)

### 2.1.8 Endothelzellen der Lunge und ihre Interaktion mit dem Alveolarepithel

Alveolarepithel und -Endothel stehen in enger wechselseitiger Beziehung und regulieren sich gegenseitig (L. Wang et al., 2013). Die Ausbildung des Endothels etwa wird unter anderem durch Typ 1 Zellen reguliert, indem diese VEGFA ausschütten (Yang et al., 2016). Die Entzündungsantwort der alveolokapillären Membran hingegen scheint hauptsächlich über die Endothelzellen vermittelt zu sein, während Alveolarepithelzellen alleine kaum auf Entzündungsstimuli reagieren. Erst eine Exposition des Endothels zu Noxen bewirkt eine relevante Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, die ihrerseits eine Immunreaktion des Alveolarepithels hervorrufen und seine Barriere schwächen (Hermanns et al., 2009b; Janga et al., 2018). Die Dichtigkeit der alveolokapillären Barriere wiederum setzt sich aus den transzellulären Transportprozessen und der parazellulären Permeabilität zusammen. Letztere wird maßgeblich durch die Tight Junctions des Alveolarepithels bestimmt. Das Endothel scheint dabei indirekt die Dichtigkeit der Alveolarepithelzellen zu beeinflussen, jedoch nicht selbst an der Barrierebildung beteiligt zu sein (Hermanns et al., 2009a; Janga et al., 2018; Neuhaus et al., 2012; Yanagi et al., 2015). Die Lunge ist mit Endothel vom kontinuierlichen Typ ausgestattet (Lüllmann-Rauch, 2015), das als eines der dichtesten im gesamten Körper gilt (Aman et al., 2016). Seine Tight Junctions sind jedoch weniger organisiert ausgebildet als die der Typ 1 Zellen und formen keinen durchgängigen Schlussleistenkomplex (Schnittler, 1998; Vestweber, 2000).

## 2.2 Vitamin D3

Vitamin D3 spielt neben der Regulation des Calcium-Phosphat Haushalts im Rahmen des Knochenstoffwechsels auch für zahlreiche weitere Prozesse eine Rolle, deren Relevanz und Komplexität erst sukzessive aufgedeckt werden. So ist Vitamin D3 nicht nur am Erhalt der psychischen Gesundheit, sondern auch an der Regulation von angeborenem und adaptivem Immunsystem beteiligt, wo es durch spezifische Förderung und Unterdrückung von Signalwegen eine glättende Wirkung zu haben scheint (Chirumbolo et al., 2017a). Verschiedene Regulationsmechanismen konnten hier bereits entschlüsselt werden, allerdings scheint der regulatorische Effekt von Vitamin D3 äußerst präzise und gleichermaßen komplex zu sein und

zahlreiche Signalwege und negative Rückkopplungsebenen einzuschließen. Die Literatur liefert Hinweise darauf, dass der Effekt dabei vor allem toleranzfördernd und antiinflammatorisch ist. Bisher bekannte immunmodulatorische Mechanismen sind u.a.: 1.) eine antioxidative Wirkung gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies (ROS); 2.) eine Modulation der T-Zellen mit Hemmung von zytotoxischen T-Zellen und TH17 Zellen, einer Unterdrückung inadäquater TH1 und TH2 Antworten, und einer Förderung von regulatorischen T-Zellen (Treg), die eine Immunantwort unterdrücken und Toleranz fördern; 3.) eine Hemmung von Neutrophilen und Eosinophilen; 4.) eine Hemmung der Antigenpräsentation dendritischer Zellen und Induktion toleranter dendritischer Zellen und 5.) eine Regulation von Zytokinen der angeborenen und erworbenen Immunabwehr (Chirumbolo et al., 2017b; Lykkedegn et al., 2015; Wei et al., 2015). Vitamin D3 scheint damit die schnelle, energiecostende Antwort des angeborenen Immunsystems zu hemmen, eine schonende Antwort des erworbenen Immunsystems hingegen zu fördern. Dies könnte unter anderem einer Rationierung der Energiereserven dienen, was die hohe Konservierung Vitamin D3 abhängiger Mechanismen in der Evolution begründen würde (Chirumbolo et al., 2017b) .

In der Lunge ist Vitamin D essentiell für die fetale Lungenreife und Surfactantsynthese. Ein Mangel wurde in zahlreichen klinischen Studien als entscheidender Risikofaktor für das Atemnotsyndrom bei Frühgeborenen und *acute respiratory distress syndrome* (ARDS) bei Erwachsenen identifiziert (Dancer et al., 2015; Gatera et al., 2018). Beiden Krankheitsbildern ist eine Disruption der alveolären Barriere und eine überschießende Entzündungsantwort gemein. Die Maturation von Typ 2 Alveolarepithelzellen (Mandell et al., 2014), die Förderung ihrer Proliferation und die Regulation ihrer Proteinexpression (X. Chen et al., 2015), sowie eine direkte Stärkung der epithelialen Lungenbarriere (H. Chen et al., 2018; Shi et al., 2016) sind bisher als wichtige Bausteine entdeckt worden, mittels derer Vitamin D Entzündung und Epithelschaden in der Lunge zu begrenzen vermag. Über Beeinflussung der Typ 2 Zellen wird vermutlich auch deren immunologische Funktion moduliert (Dancer et al., 2015; Gatera et al., 2018). Neben der Produktion des Surfactants, der selbst antiinflammatorische Wirkung hat, sezernieren diese ein Zytokinprofil, dass im Gesunden aus antiinflammatorischen Molekülen besteht und für Toleranz gegenüber der unvermeidlichen Antigenexposition der Atemluft sorgt (Mason, 2006; Spengler et al., 2018), bei Infektion sich jedoch hin zu proinflammatorischen Mediatoren ändert und so eine Immunantwort verstärkt (Mason, 2006). Die genauen Wirkmechanismen von Vitamin D in der Lunge sind bei weitem noch nicht verstanden und scheinen weitreichender und essentieller zu sein, als bisher angenommen. Gerade im Rahmen der COVID 19 Pandemie wird ihre Entschlüsselung forciert verfolgt, in der Hoffnung, zu neuen Präventions- und Therapieansätzen beizutragen.



Als Calcitriol bzw. Cholecalciferol kann Vitamin D mit der Nahrung aufgenommen, oder durch UV-Strahlung in der Haut aus Cholesterinderivaten generiert werden. In der Leber wird Calcitriol durch die 25-Hydroxylase zu Calcidiol hydroxyliert, welches die hauptsächlich im Blut zirkulierende Form darstellt und Referenzwert der Serumspiegel ist. Bei Bedarf wird durch die 1 $\alpha$ -Hydroxylase 1,25-Dihydroxycholecalciferol (auch Calcitriol oder Vitamin D3) hergestellt, die aktive Form von Vitamin D. In der Niere wird die 1 $\alpha$ -Hydroxylase im Zuge des Calciumstoffwechsels durch Parathormon aktiviert, aber auch im Epithel der Lunge (Hansdottir et al., 2008) und in Immunzellen liegt sie vor und kann bei Stimulation durch Toll-like-Rezeptor-Signalwege und Zytokine Vitamin D in seine aktive Form umwandeln (Chirumbolo et al., 2017; Ebadi et al., 2020; Wei et al., 2015). Als lipophiles Vitamin wird aktives Vitamin D3 dann intrazellulär vom Vitamin D bindenden Protein (VDBP) gebunden, welches die Diffusion in Zielzellen kontrolliert. In der Zelle bindet Vitamin D3 dann an den nukleären Vitamin D Rezeptor (VDR), der mit dem Retinoid X Rezeptor (RXR) heterodimerisiert und als Transkriptionsfaktor an Vitamin D responsive Elemente (VDRE) in der Promoterregion verschiedenster Gene andockt und sie so induziert (Lykkedegn, 2015). Noch ist nicht abschließend geklärt, welche Gewebe den VDR exprimieren. In der Lunge scheint er in Bronchial-, nicht aber in Alveolarepithel vorhanden zu sein. Eine Wirkung von Vitamin D3 auch auf die alveolären Zellen ist aber sehr wahrscheinlich (Chen et al., 2018). Die Höhe optimaler Serumspiegel von Vitamin D ist nach wie vor Diskussionsgegenstand. Aktuelle Meinungen empfehlen Spiegel von 100-150 nM und gehen ab unter 75 nM von einem Defizit aus (Ebadi et al., 2020). Bezugswert dabei ist jedoch, im Gegensatz zum in der vorliegenden Arbeit verwendeten Calcitriol, zirkulierendes Calcidiol, da nur dieses mit konventionellen Blutentnahmen messbar ist.

## **2.3 In der Arbeit untersuchte Zielproteine**

In der vorliegenden Arbeit werden zahlreiche Marker- und Zielmoleküle verwendet, deren Auftreten mit dem Vorliegen bestimmter Zellen assoziiert ist oder denen zentrale Funktionen in der Lungenhomöostase zukommen. Ihre für die Lunge bekannten Hauptfunktionen sollen hier ausführlich vorgestellt werden und sind im Anhang nochmals in kurzer Übersicht dargestellt (siehe Tabelle 11).

### **ZO-1**

Das ZO-1 Strukturprotein ist Teil der Verankerung von Tight Junctions (Zonula Occludens) und steht mit den Aktinfilamenten des Zytoskeletts in Kontakt. Eine Translokation des Proteins vom Zytoplasma an die Innenseite der Plasmamembran gewährleistet dabei die dynamische und situationskonformen Ausbildung der Tight Junctions (Schneeberger et al., 2004; Vestweber, 2000).

## **E-Cad**

E-Cad (Epitheliales Cadherin) ist als Transmembranprotein Teil epithelialer Adhärenskontakte. Sein Auftreten zeigt Zell-Zell Adhäsion und epithelialen Charakter an (Lüllmann-Rauch, 2015).

## **SP-C**

Das Surfactantprotein SP-C (Gen: Sftpc) ist eines von vier Surfactantproteinen und gilt als universellster Typ 2 Marker (Treutlein et al., 2014). Der Surfactantfilm besteht neben Lipiden (80%) aus den Surfactantproteinen SP-A, SP-B, SP-C und SP-D (20%). Während SP-A, SP-B und SP-D auch von Keulenzellen synthetisiert werden, wird SP-C ausschließlich durch Typ 2 Zellen gebildet, sodass sein Vorliegen mit der Anwesenheit und Syntheseleistung von Typ 2 Zellen korreliert. Bei der Transdifferenzierung zu Typ 1 Zellen nimmt ihre Surfactantproduktion ab, sodass eine Abnahme des Surfactantproteins SP-C im Kulturverlauf auf einen erfolgreichen Transdifferenzierungsprozess hinweisen kann (Fuchs et al., 2003; Hermanns et al., 2009). Durch verschiedene Bedingungen kann die Surfactantproduktion der Typ 2 Zellen kompromittiert werden, z.B. im Rahmen einer Sepsis oder bakterieller Einflüsse, was mit einem Rückgang der mRNA Expression von SP-C einhergeht (Janga et al., 2018). Umgekehrt kann eine Zunahme von SP-C auf eine gesteigerte Surfactantproduktion und damit einen protektiven Effekt für das Alveolarepithel hinweisen. Unabhängig von der mRNA Ebene unterliegt der Surfactant jedoch auch auf Proteinebene einer Rezirkulation durch Typ 2 Zellen, die in ihren typischen Lamellenkörperchen im Zytoplasma den Surfactant speichern und freilassen können (Hermanns et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit wird SP-C in Färbungen und PCR als Typ 2 Marker verwendet und zur Beurteilung der epithelialen Schutzreaktion herangezogen.

## **SP-A**

Das Surfactantprotein SP-A wird von Typ 2- und Keulenzellen synthetisiert und ist Teil des angeborenen Immunsystems. Durch Agglutination kann es Antigene bei niedriger Exposition dem mukoziliären Reinigungsapparat zuführen und so vor dem Immunsystem abschirmen. Bei hoher Exposition oder Erregerbefall wirkt SP-A hingegen proinflammatorisch als Opsonin für Makrophagen und kann Entzündungsmediatoren, Chemotaxis und die Expression von Oberflächenproteinen aktivieren (Phelps, 2001). Als Zeichen einer Entzündungsantwort wird es beispielsweise nach LPS-Exposition von Alveolarepithel sezerniert (Janga et al., 2018). Zudem ist SP-A über negative Rückkopplung an der Regulation der Surfactantrezirkulation beteiligt (Lykkedegn et al., 2015). Hohe SP-A Spiegel können also sowohl eine verminderte Surfactantsekretion als auch eine inflammatorische Reaktion anzeigen.

## **CD74**

CD74 ist ein Oberflächenrezeptor auf Typ 2 Zellen, der den *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) erkennt, was die Interaktion mit CD44 erfordert. MIF, ein proinflammatorisches Zytokin, kann

über CD74 die Proliferation und Regeneration von Typ 2 Zellen anregen. Bronchialepithelzellen exprimieren kein CD74 und mit Transdifferenzierung zu Typ 1 Zellen geht CD74 auch als Oberflächenmarker der Typ 2 Zellen verloren (Marsh et al., 2009). Somit stellt CD74 einen Marker proliferationsfähiger Typ 2 Zellen dar.

#### **CD44**

CD44 ist ein Matrixrezeptor auf Typ 2 Zellen, dessen Auftreten mit dem Transdifferenzierungsprozess ebenfalls abnimmt (Hermanns et al., 2009). Es wurde eine konzentrierte Expression von CD44 auf einer hochproliferativen Subpopulation der Typ 2 Zellen beschrieben, die für Regeneration im Gesunden zuständig ist (Q. Chen et al., 2021).

#### **Cav-1**

Cav-1 (Caveolin 1) ist ein Membranprotein, das Caveolae stabilisiert - kleine Membraneinstülpungen, die für endozytische Transportprozesse gebildet und nach intrazellulär abgeschnürt werden. Cav-1 ist neben Typ 1 Alveolarepithelzellen auch auf Endothelzellen und Fibroblasten zu finden, nimmt aber in alveolären Primärzellepithelien zuverlässig mit dem Transdifferenzierungsprozess von Typ 2- zu Typ 1 Zellen zu und korreliert so mit dem Vorliegen von Typ 1 Zellen (Fuchs et al., 2003; Hermanns et al., 2009).

#### **HOPX**

HOPX (Homeobox only Protein X) ist ein für die Orientierung und Entitätsbestimmung von Gewebe wichtiger Transkriptionsfaktor, der in bronchialen Progenitorzellen und Typ 1 Zellen exprimiert, in Typ 2 Zellen jedoch abgeschaltet wird (Treutlein et al., 2014). Mit steigendem Typ 1 Anteil lässt sich ein höherer HOPX Spiegel detektieren, weswegen eine die Transdifferenzierung unterstützende Funktion diskutiert wird. Gleichzeitig ist HOPX als Tumorsuppressor bekannt und scheint die Proliferation von Epithelzellen zu hemmen (Ota et al., 2018). In der Literatur ist HOPX inzwischen als Typ 1 Marker geläufig (Treutlein et al., 2014), zeigt allerdings dynamische Expressionsmuster, die nicht direkt auf die Menge der Typ 1 Zellen schließen lassen.

#### **LGR5**

LGR5 (Leucin-rich-repeat-containing G Protein coupled Receptor 5) ist ein Stammzellmarker in verschiedensten Epithelien. Bei der LGR Familie handelt es sich um Rezeptoren, die vom Wnt-Signalweg aktiviert werden und diesen gleichzeitig verstärken. Der Wnt Signalweg ist zentral in regenerative Prozesse von Epithelien involviert (Barker et al., 2013). In der murinen Lunge etwa wurden LGR5 positive mesenchymale Stammzellen beschrieben, die über den Wnt Signalweg Keulenzellen aktivieren, welche daraufhin zu Typ 1 - und Typ 2 Zellen differenzieren (J. H. Lee et al., 2017). Im murinen Darm können LGR5+ Stammzellen durch Vitamin D3 induziert werden (Peregrina

et al., 2015), sodass LGR5 als Indikator Vitamin D abhängiger Regeneration und Stammzellaktivität für die vorliegende Arbeit interessant war.

### **Villin**

Die Expression von Villin gilt neben der DCLK1 ebenfalls als typisch für die oben beschriebenen Bürstenzellen (Kasper et al., 1994).

### **CC16**

CC16 (auch CC10, Scgb1a1, CCSP, *clara cell secretory protein* oder Uteroglobulin) ist ein Sekretionsprodukt von pulmonalen Keulenzellen, das in den Surfactant abgegeben wird, aber auch in den Kreislauf diffundiert. Es wird in der Literatur meist als Scgb1a1 erwähnt und als Keulenzellmarker verwendet. CC16 hat systemische und pulmonale antiinflammatorische Effekte. In CC16-Knockoutmäusen etwa wurde eine schnellere Lungenalterung durch Inflammaging berichtet, was eine immunsuppressive Wirkung von CC16 auch in der Lunge nahelegt (Laucho-Contreras et al., 2018).

### **DCLK1**

Die DCLK1 (*Double-Cortin-Like Kinase 1*) ist eine Mikrotubulus-assoziierte Kinase, die über die Regulation der Mikrotubuluspolymerisation in Migration und Motilität der Zellen, aber auch ihre Entartung involviert ist. Eine zentrale Beteiligung der DCLK1 an pro-survival und self-renewal Signalwegen, aber auch an der Barrierebildung von Epithelien wird zunehmend evident, die genauen Mechanismen sind jedoch noch nicht abschließend verstanden (Gerbe et al., 2011; Lu, Maruyama, Sugimura, & Hata, 2021; May et al., 2014; O’Leary et al., 2019). Ob DCLK1 exprimierende Zellen selbst Stammzellcharakter aufweisen, oder über die Schaffung eines Mikromilieus Stammzellnischen regulieren, ist derzeit Diskussionsgegenstand. In beiden Fällen kommt der DCLK1 aber erhebliche Bedeutung in der Regeneration und dem Entartungspotenzial von Epithelien zu. In der Lunge wird DCLK1 von Bürstenzellen exprimiert (O’Leary et al., 2019).

### **LL-37**

LL-37 gehört als bisher einziges im Menschen beschriebenes Cathelicidin zur Gruppe der antimikrobiellen Peptide (AMP) (Hiemstra, 2007), einer Familie von kationischen Oligo- und Polypeptiden, die als Teil des angeborenen Immunsystems auf Schleimhäuten vorkommen und dem Schutz der Mukosa dienen. Ihnen werden direkte antimikrobielle Effekte, u.a. durch Porenbildung in der bakteriellen Membran, zugeschrieben. Zusätzlich gewinnt aber eine komplexe immunmodulatorische Funktion der AMP in der derzeitigen Forschung an Bedeutung. LL-37 scheint auf vielfältige und erst in Ansätzen verstandene Weise das angeborene und adaptive Immunsystem zu modulieren (Fahy et al., 2005; Hiemstra, 2007; Pahar et al., 2020; da Silva et al., 2017). Für die

vorliegende Arbeit wird LL-37 vor allem dadurch interessant, dass es in der Promoterregion ein Vitamin D responsives Element (VDRE) besitzt, also der direkten Expressionskontrolle von Vitamin D3 unterliegt. Gleichzeitig scheint LL-37 in der Haut eine wesentliche Rolle für die Barrierefunktion der Keratinozyten zu spielen (Peric et al., 2008). Als von Vitamin D3 reguliertes Molekül, das für die Immunantwort und Barriere von Epithelien eine Rolle spielt, sollte sein Expressionsverhalten auch im Alveolarepithel untersucht werden. Zur Gruppe der AMP gehören neben LL-37 und weiteren Enzymen auch die  $\beta$  Defensine HBD-1 und HBD-2 (Hiemstra, 2007).

### **HBD-1**

Das humane  $\beta$  Defensin 1 (HBD-1) gehört zu einer weiteren Untergruppe der antimikrobiellen Peptide, den  $\beta$  Defensinen, welche durch ihren amphiphilen Charakter mikrobielle Erregerzellen zerstören können. Auch die  $\beta$  Defensine haben neben ihrer direkten antimikrobiellen Wirkung vielfältige weitere Funktionen und können kontextabhängig pro- oder antiinflammatorische Mechanismen induzieren. Zudem scheinen sie eine Rolle in Wundheilung und Reepithelialisierung zu spielen (Aarbiou et al., 2002).  $\beta$  Defensine werden ebenfalls von Vitamin D3 induziert, unterliegen aber einer komplexeren Expressionskontrolle, u.a. durch den proinflammatorischen Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B (Schögler et al., 2016). HBD-1 selbst wird konstitutiv von Epithelzellen exprimiert und ist Bestandteil des normalen Schleimhautschutzes durch das angeborene Immunsystem.

### **HBD-2**

HBD-2, ebenfalls ein  $\beta$ -Defensin, wird von Epithelzellen und Neutrophilen, jedoch nur bei proinflammatorischen Stimuli und nach Kontakt mit Mikroorganismen, exprimiert. Es stimuliert das angeborene Immunsystem und kann die Antwort des erworbenen Immunsystems modulieren (Aarbiou et al., 2002; Hiemstra, 2007).

### **MUC5B**

MUC5B ist ein Glycoprotein, das von den Becher- und Keulenzellen des Bronchialepithels in den Mukusfilm der konduktiven Atemwege abgegeben wird. Die Mukusbarriere dient im Rahmen der mukoziliären Clearance der physiologischen Reinigung der Lunge von Partikeln in der Atemluft, kann sie bei pathologischer Überproduktion jedoch auch in der Lunge gefangen halten, was eine Immunreaktion hervorruft. MUC5B scheint dieses Gleichgewicht zu regulieren und ist hierüber in die Immunhomöostase der Lunge involviert (Roy et al., 2014). Überdies zeigt MUC5B kanzerogene Eigenschaften in den Regulationsmechanismen verschiedener epithelialer Krebsarten (Lahdaoui et al., 2017) und ist ein Marker broncho-epithelialer Stammzellen (BESC) (Yuan et al., 2019), als der MUC5B in der vorliegenden Arbeit auch verwendet wird.

### **β-Tubulin**

β Tubuline sind zusammen mit den α Tubulinen Grundbaustein der Mikrotubuli des Zytoskeletts. Eine vermehrte Bildung von β Tubulin findet sich in den Zilienzellen des Bronchialepithels, da Mikrotubuli hier die Kinetik des Zilienschlags vermitteln (Lüllmann-Rauch, 2015). β Tubulin positive Zellen entwickeln sich aus Broncho-alveolären Stammzellen (BASC), sodass β Tubulin als Indikator bronchialen Ursprungs dienen kann (Q. Liu et al., 2019).

### **CK14**

CK14 (Zytokeratin 14, auch Keratin 14 oder Krt14) ist Bestandteil des Zytoskeletts von Basalzellen der Atemwege, denen Regenerationspotenzial zugeschrieben wird (Ficial et al., 2014; Kumar et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit wird es als Indikator für deren Vorliegen verwendet.

### **VE-Cad**

VE-Cad (Vascular Epithelial Cadherine) ist eine für Endothelzellen spezifische Form der Cadherine, den Transmembranproteinen von Adhärenskontakten (Schnittler, 1998). In der vorliegenden Arbeit wird VE-Cad verwendet, um endothelialen Charakter zu bestätigen.

### **CD31**

CD31 ist ebenfalls ein endothelspezifisches Membranprotein und wird als dieses zum Beweis endothelialen Charakters herangezogen (Vestweber, 2000).

## **2.4 Transepithelialer elektrischer Widerstand**

Der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) wird häufig als Indikator für die Dichtigkeit epithelialer Barrieren herangezogen. Die Messung geschieht durch das Anlegen eines Wechselstroms (z.B. 10 µA) über das Epithel. Der Spannungsabfall über dem Epithel wird gemessen, daraus sein elektrischer Widerstand berechnet und wird auf die Fläche des Epithels normiert ( $\Omega \times \text{cm}^2$ ). Molekulares Korrelat des Stromflusses sind Ionen oder geladene Proteine, die über die Epithelschicht transportiert werden, entweder trans- oder parazellulär. Der Anteil der transzellulären Transportprozesse ist im Verhältnis jedoch so gering und der Widerstand der Zellmembranen selbst so hoch, dass der Hauptstrom durch parazellulären Ionenfluss entsteht. Der gemessene Widerstand spiegelt somit die parazelluläre Durchlässigkeit des Epithels wider, welche direkt durch die Anzahl und Organisation der Tight Junctions reguliert wird (Claude, 1978; Schneeberger et al., 2004). Adhärenskontakte und Hemidesmosomen sorgen zwar für mechanische Verankerung, nicht jedoch für elektrische Isolation und Kontrolle des parazellulären Ionenflusses. Daher stellt der TEER ein quantitatives Maß für die Ausbildung von Tight Junctions und damit die Barrierefunktion von Epithelien, so auch der alveolokapillären Membran dar. Für die Messung ist die Integrität des Zelllayers eine entscheidende Voraussetzung, da durch Lücken im Epithel unkontrollierte Ionenflüsse

entstehen und falsch niedrige Widerstände suggerieren. Ebenso ist der Spannungsabfall am Elektroden-Medium Übergang und an der Untergrundmembran der Zellen durch Leerwertsubtraktion abzuziehen.

## **2.5 Klinischer Kontext: ARDS und SARS-CoV 2**

Die Integrität aus Alveolarepithel und Endothel mit einer dichten parazellulären Barriere muss für die Selektivität der alveolokapillären Membran und die von ihr abhängige Lungenfunktion gewährleistet sein. Gerade in der Pathophysiologie des ARDS ist die Barrieredisruption als ein entscheidender Eskalationsfaktor bekannt. Verschiedenste inflammatorische oder traumatische Stimuli führen zu einer Permeabilitätserrhöhung der alveolokapillären Membran und es kommt zum Eindringen von Ödemflüssigkeit. Typ 2 Zellen resorbieren die Flüssigkeit durch apikale Natriumkanäle und basolaterale Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasen (Mason, 2006). Damit ein Konzentrationsgradient aufgebaut und Wasser über solvent drag folgen kann, muss die alveoläre Barriere jedoch intakt sein. Die Disruption der alveolären Barriere potenziert sich dadurch ab einer gewissen Ausprägung selbst und es kommt zum Zusammenbruch der Flüssigkeitshomöostase und zum Eindringen von Immunzellen in den Alveolarraum. Diese zerstören den Surfactant, was durch die nun erhöhte Oberflächenspannung weitere Flüssigkeit anzieht, zu Emphysem- und Atelektasenbildung sowie einer weiteren Eskalation der Immunreaktion führt, der die sensiblen Typ 1 Zellen, die für den Erhalt der Barriere zuständig sind, nicht standhalten können. Mit der Zerstörung der Typ 1 Zellen und massiver Ödembildung endet dieser *circulus vitiosus* in einer lebensbedrohlichen Beeinträchtigung des Gasaustausches (Gatera et al., 2018; Spengler et al., 2018).

Auch in der Pathophysiologie von COVID-19 spielt die alveolokapilläre Membran eine zentrale Rolle. Die Letalität einer Infektion mit SARS-CoV-2 hängt eng mit einer durch ARDS zusammenbrechenden Lungenfunktion zusammen, und das histologische Bild des Post-COVID-Syndroms ist die Fibrosierung der Lunge, die auf entkoppelten Regenerationsmechanismen des Alveolarepithels beruht (Quesada-Gomez et al., 2020; Yanagi et al., 2015). Ein Pathogenitätsmechanismus von SARS-CoV 2 besteht darin, dass seine Hauptprotease M<sub>pro</sub> nicht nur die viruseigenen Proteine prozessiert, sondern auch Wirtsproteine angreift und so ihre Funktion kompromittiert (Kierner et al., 2004; Koudelka et al., 2021). Weiterhin ist bekannt, dass SARS-CoV 2 über das Angiotensin-converting-enzyme (ACE) in die Wirtszellen eindringt, welches auf Alveolarepithel und Endothel vorkommt und dessen downstream Signalwege durch ausreichend hohe Vitamin D Spiegel in eine antiinflammatorische Richtung beeinflusst werden können (Rhodes et al., 2021).

Bisher ist keine spezifische pharmakologische Therapie für ARDS bekannt und die Medizin greift auf supportive intensivmedizinische Maßnahmen zurück (Yanagi et al., 2015). Vitamin D hat jedoch in

zahlreichen klinischen und experimentellen Studien einen protektiven Effekt gegenüber ARDS gezeigt (Dancer et al., 2015; Gatera et al., 2018). Erkrankungsrisiko, Verlauf und Prognose von ARDS - und auch COVID-19 (Ebadi et al., 2020; Hernández et al., 2021; Ilie et al., 2020; Santaolalla et al., 2020) - korrelieren mit Serumspiegeln von Vitamin D, allerdings sind die genauen Wirkmechanismen erst ansatzweise verstanden. Sie sind vermutlich multifaktoriell und beruhen unter anderem auf einer Stärkung der Barriere (H. Chen et al., 2018; Shi et al., 2016) und der Modulation von Surfactantproduktion (Lykkedegn et al., 2015a) und Immunantwort (Chirumbolo et al., 2017a), sowie einer fördernden Wirkung auf die Typ 2 Zellen (Mandell et al., 2014). Gerade im Kontext von COVID-19 kann ein tieferes Verständnis der von Vitamin D beeinflussten Zielmoleküle und Parameter in der Lungenhomöostase maßgeblich zu neuen Präventions- und Therapieansätzen beitragen.

## **2.6 Vorarbeiten an H441 Zellen**

Vor Beginn der Arbeiten mit den alveolären Primärzellen wurden Experimente mit der humanen Zelllinie H441 durchgeführt. Hier konnte ein barrierestärkender Effekt von Vitamin D<sub>3</sub> gegenüber LPS- und IL-6 Exposition gezeigt werden, mit der ein ARDS Szenario simuliert wurde (siehe Abb.18 im Anhang). Eine Behandlung der Zellen mit Vitamin D<sub>3</sub> führte dabei u.a. zu höherer parazellulärer Dichtigkeit des Epithels, einer Dämpfung der proinflammatorischen SP-A Sekretion, sowie zur Induktion des schleimhautschützenden antimikrobiellen Peptids LL-37 (Xiong et al., 2023). Bis dahin noch nicht beschrieben worden war die Induktion der DCLK1 durch Vitamin D<sub>3</sub>, einer Kinase in Bürstenzellen von Darm und Lunge, die über die Regulation der Mikrotubuluspolymerisation in Zellmotilität und Epithelregeneration eingreift, aber auch in proliferative Signalwege involviert ist und als Tumormarker diskutiert wird (Middelhoff et al., 2017; O’Leary et al., 2019). Es wurde vermutet, dass der klinisch protektive Effekt von Vitamin D<sub>3</sub> nicht nur auf Immunmodulation und einer Stärkung der Barriere, sondern auch auf einer Änderung der zellulären Zusammensetzung beruht, bei der die DCLK1 möglicherweise eine Rolle spielt.

Die Verwendung der Karzinomzelllinie H441 wirft allerdings die Frage der Repräsentativität auf, da sie als Abkömmling eines bronchialen Adenokarzinoms Eigenschaften von Keulenzellen und Typ 2 Alveolarepithelzellen zeigt (Hermanns et al., 2015) und damit den realen Epithelaufbau nur eingeschränkt widerspiegelt. Außerdem könnten in den Karzinomzellen entscheidende Zielparameter wie Überlebensfähigkeit, Zellzyklus, Differenzierung, Immunantwort und Adhäsion verzerrt sein.

Etablierte Kultursysteme hingegen zeigen, dass auch humane alveoläre Primärzellen als Modell der alveolokapillären Membran genutzt werden können (Fuchs et al., 2003; Maria Iris Hermanns et al., 2009a). Als Typ 2 Zellen ausgesät, folgen sie einem Transdifferenzierungsprozess, bei dem ein Teil



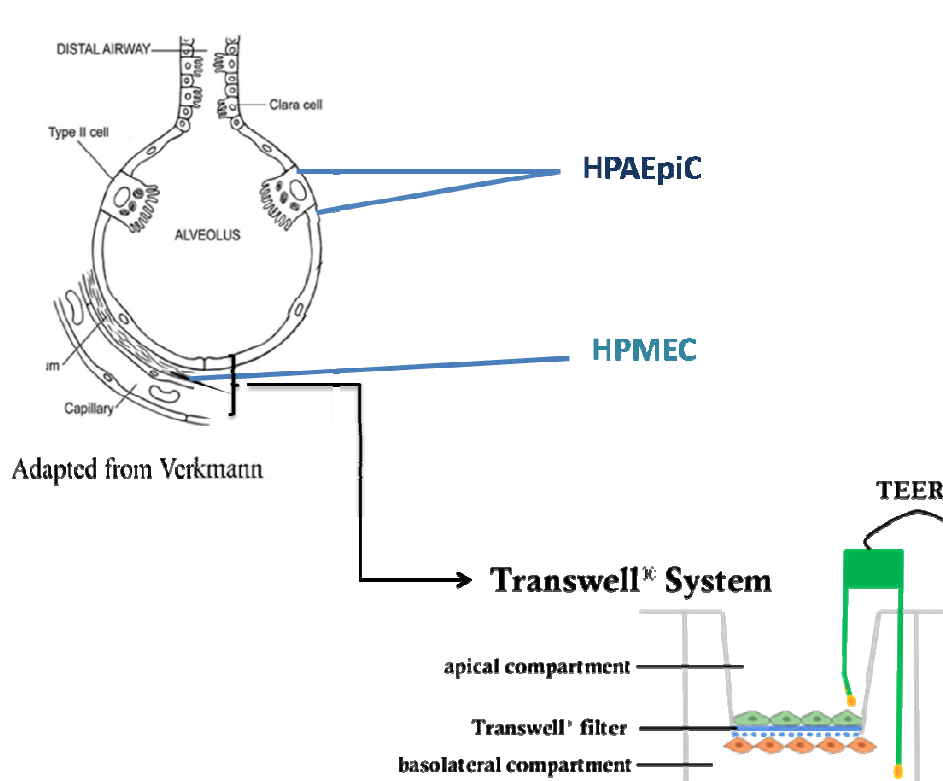
der Typ 2 Zellen zu Typ 1 Zellen abflacht und dabei seine Fähigkeit, Surfactant zu produzieren verliert und weite, mit den Nachbarzellen eng verzahnte Ausläufer bildet, deren Tight Junctions eine epitheliale Barriere aufbauen können. So entsteht eine heterogene Epithelkomposition aus Typ 1 und Typ 2 Zellen, mit der das Alveolarepithel repräsentativ abgebildet werden kann (Bhattacharya & Matthay, 2013; Fuchs et al., 2003; Maria Iris Hermanns et al., 2009a; Schneeberger & Lynch, 2004). Eine Kokultivierung mit Endothelzellen auf Transwellfiltern führt zur Ausbildung einer parazellulär dichten Barriere, in der die Endothel- und Alveolarepithelzellen über parakrine Signalwege miteinander kommunizieren können (Janga et al., 2018). Somit kann die alveolokapilläre Membran auch mit Primärzellen in vitro simuliert werden und ein repräsentativeres Modell der in vivo Verhältnisse liefern.

## 2.7 Zielsetzung und Vorgehen

In der vorliegenden Arbeit sollte der Effekt von Vitamin D3 auf humane alveoläre Primärzellen in Monokulturen und Kokulturen mit Endothel auf Transwellfiltern untersucht werden. Zielgrößen waren dabei drei sich gegenseitig beeinflussende Aspekte der alveolären Barriere: die parazelluläre Dichtigkeit des Epithels, seine Immunreaktion und die zelluläre Zusammensetzung. Hierbei sollte überprüft werden, ob die Effekte von Vitamin D3 auf die H441 Zellen, insbesondere die Induktion der DCLK1, auch in Primärzellen reproduzierbar sind und ob eine Behandlung mit Vitamin D3 weitere Effekte aufzeigt, die in der Zelllinie H441 bisher nicht abgebildet wurden. Methoden waren dabei die Messung des TEER, die Untersuchung der Genexpression verschiedener Marker mittels real-time PCR, sowie die morphologische Beurteilung mittels immunhistochemischer Färbungen.

Die für die Arbeit kultivierten humanen pulmonale Primärzellen stellten im Kontext der dann grassierenden COVID-19 Pandemie außerdem eine wertvolle aber rare Quelle für schnellen und sicheren Erkenntnisgewinn dar. Eine in vitro Exposition der in der vorliegenden Arbeit isolierten primären Endothelzellen mit Proteasen von SARS-CoV 2 wurde vorgenommen, um mittels LC-MS konkrete Zielproteine von SARS-CoV 2 zu identifizieren.

Für die Transwellkulturen wurden Alveolarepithelzellen (*Human Primary Alveolar Epithelial Cells* = HPAEpiC) und microvaskuläre Endothelzellen (*Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells* = HPMEC) aus humanem Lungengewebe isoliert und auf der apikalen bzw. basolateralen Seite einer semipermeablen Membran auf Transwell-Filtereinsätzen in Mono- und Kokultur für 7 Tage kultiviert, um die Alveolarmembran in vitro zu simulieren (siehe Abb. 1).



**Abb. 1: Aufbau einer Alveole und Übersetzung auf das Transwell-System**

Von Tag 3 bis Tag 7 erfolgte wie bei den H441 Zellen eine Behandlung mit 10 nM Vitamin D3 von beiden Seiten der Membran. Beginnend an Tag 3 wurde täglich die Barriere über den transepithelialen elektrischen Widerstand (TEER) gemessen. An Tag 3 wurde bereits ein Teil der Kulturen durch Fixierung oder Lyse beendet, um die Parameter im Kulturverlauf beurteilen zu können. An Tag 7 wurde dann jeweils die Kontroll- und die mit Vitamin D3 versetzte Kultur ebenfalls durch Fixierung oder Lyse beendet. Aus dem Lysat wurde mRNA isoliert, um mittels quantitativer realtime PCR Veränderungen in der Genexpression verschiedener Marker zu untersuchen. Die fixierten Zelllayer wurden immunhistochemisch gefärbt, um einen morphologischen Eindruck zu erlangen und konkrete Fragestellungen qualitativ zu beantworten.

Über die Erhebung des TEER, die Messung der Genexpression von Zellkontakten, Zielmolekülen und zellspezifischen Markern, sowie mittels qualitativer Färbungen sollte der Einfluss von Vitamin D3 auf die Barriere, Immunreaktion und Zellkomposition humaner Alveolarepithelzellen in Primärkultur untersucht werden (siehe Abb. 2).

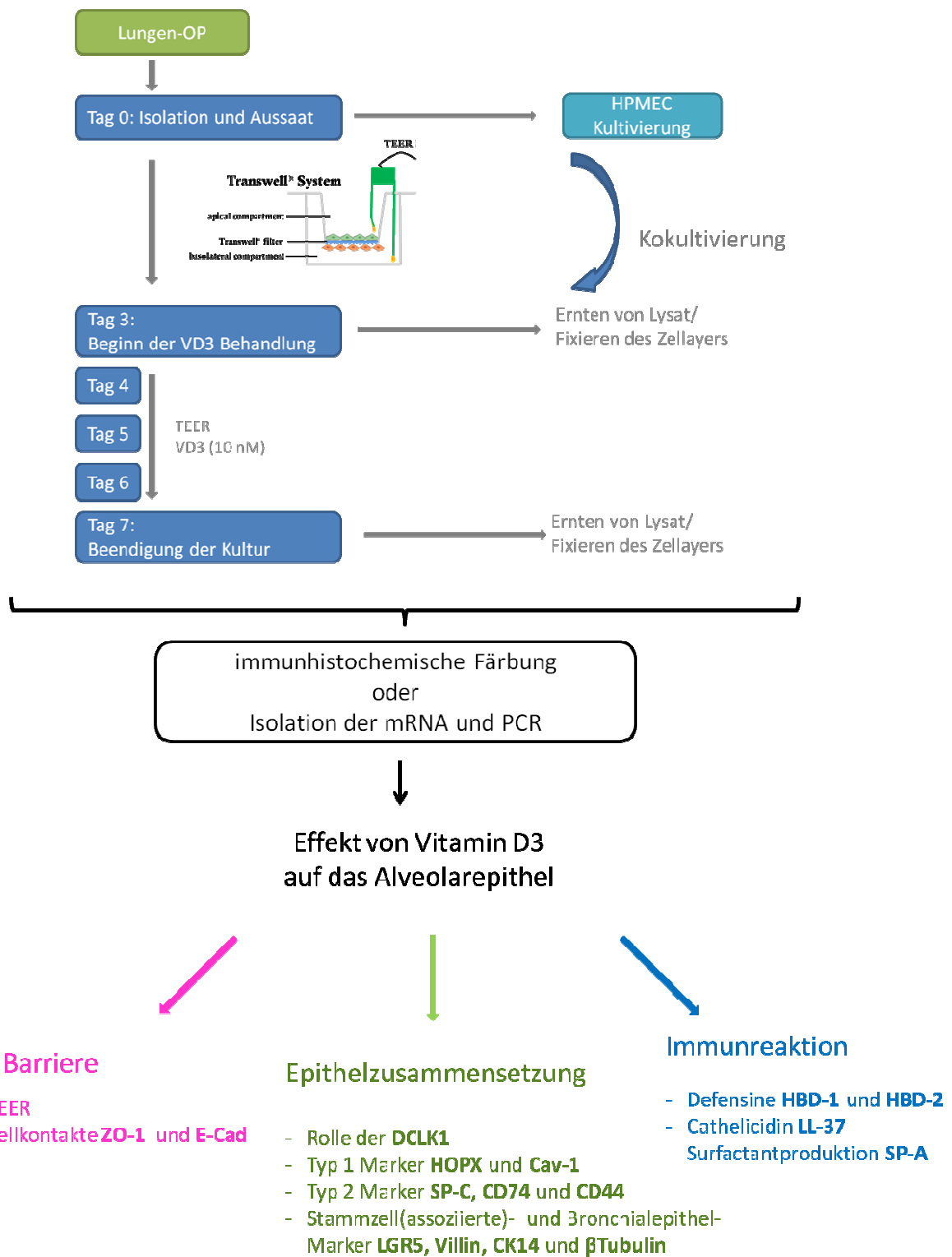


Abb. 2: Schema von Arbeitsablauf und Zielsetzung der Experimente

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Chemikalien und Geräte

##### 3.1.1 Reagenzien

**Tabelle 1: Reagenzien für die Kultivierung und Verarbeitung der Primärzellen**

Reagenz	Hersteller
1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D <sub>3</sub> , D1530	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ampuwa® Wasser	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Millipore, Kankakee, USA
Ciprofloxacin (Ciprobay)	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Desoxyribonuklease 1 (DNase) aus Rinderpankreas, D5025	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Di-natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dispase 1, D4818	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM/F12)	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Dynabeads® CD31 Endothelial Cell	Invitrogen, Carlsbad, USA
EGM™-2 Endothelial SingleQuots™ Kit	Lonza, Walkersville, USA
Elastase aus Schweinepankreas, lyophilisiert, LS002292	Worthington-Biochem, USA
Endothelial growth medium-2 (EGM2)	Lonza Walkersville, USA
Ethanol 99%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälberserum (FBS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Fibronektin (human plasma fibronectin)	Millipore, Kankakee, USA
Fluoromount Aqueous Mounting Medium	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fluoromount-G Mounting Medium	Invitrogen, Carlsbad, USA
Fungizone	Biozol, Eching, Deutschland
Glucose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
HEPES	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hoechst Kernfärbung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kalziumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Kollagen Typ 1 (Collagen type I, rat tail)	Corning, Bedford, USA
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Medium 199 GlutaMAX™	Gibco, Carlsbad, USA
Natriumchlorid (NaCl)	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Nuclease-freies Wasser	Ambion, Carlsbad, USA
Paraformaldehyd Lösung (PFA) in PBS 4%	Affymetrix, Cleveland, USA
Penicillin (100 U/mL) + Streptomycin (100 µg/mL) (Pen/Strep)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Percoll®	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Phosphate buffered saline (PBS) (10x)	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Small Airway Cell Basal Medium (SABM)	Lonza, Walkersville, USA
Small Airway Epithelial Cell Growth Medium (SAGM) SingleQuots™ Supplements and Growth Factors	Lonza, Walkersville, USA
SYBR® Select Master Mix	Applied biosystems, Austin, USA
Triton® X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Trypan Blau 0,4 %, T8154	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin aus Rinderpankreas, T8003 (Primärzellisolation)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin/EDTA (10x) (Zellpassagierung)	Biochrom, Berlin, Deutschland

### 3.1.2 Rezeptur von Kulturmedien und Puffern

**Tabelle 2: Zusätze und Rezeptur verwendeter Medien**

Medium/Reagenz	Bestandteile / zugefügte Supplemente
1x PBS zum Waschen der Zellen	900 mL Ampuwa® Wasser + 10 mL PBS (10x)
BSSB Puffer (Balanced Salt Solution B) für Primärzellisolation	900 mL autoklaviertes Wasser + 137 mM NaCl + 5 mM KCl + 0,7 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 10 mM HEPES + 5,5 mM Glucose

	<ul style="list-style-type: none"> <li>+ 1,8 mM CaCl<sub>2</sub></li> <li>+ 0,7 mM MgSO<sub>4</sub></li> </ul> <p>Titration mit 1 M NaOH auf pH 7,4 dann Auffüllung mit autoklaviertem Wasser auf 1 L</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>+ 5 mL Pen/Strep</li> </ul> <p>Sterilfiltration mit 0,2 µm Sterilfilter Lagerung bei 4 °C</p>
DMEM/F12 Medium	<p>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM/F12) 500 mL</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>+ 50 mL FBS</li> <li>+ 5 mL Pen/Strep</li> <li>+ 5 mL Fungizone</li> </ul>
EGM2 Medium	<p>Endothelial basal medium-2 (EBM-2) 500 mL</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>+ Supplemente: EGM™-2 Endothelial SingleQuots™ Kit</li> <li>+ 25 mL FBS</li> <li>+ 5 mL Pen/Strep</li> </ul>
Gewebepuffer für Lungengewebe	<p>Medium 199 GlutaMAX™ 500 mL</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>+ 75 mL FBS</li> <li>+ 5 mL Fungizone</li> <li>+ 5 mL Ciprobay</li> <li>+ 5 mL Pen/Strep</li> </ul>
Percoll-Lösung, hohe und niedrige Dichte	<p>leichte Lösung: 4 mL PBS (10x) + 10,88 mL Percoll® + 25,12 mL steriles Wasser</p> <p>schwere Lösung: 4 mL PBS (10x) + 25,96 mL Percoll® + 10,04 mL steriles Wasser</p>
SAGM Medium	<p>Small airway cell basal medium (SABM) 500 mL</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>+ Supplemente: SAGM SingleQuots™ Supplements and Growth Factors</li> <li>+ 5 mL FBS</li> <li>+ 5 mL Pen/Strep</li> </ul>

### 3.1.3 Ansatz von Reagenzien für die Primärzellisolation und -Behandlung

**Tabelle 3: Dosierung und Handhabung von Enzymen und Wirkstoffen**

Reagenz / Enzym	Aufbereitung / Lagerung / Aktivität
Dispase	Dispase 1 (D4818), 10 U/mg Für Primärzellisolation Lösung in 1X PBS zu einer Arbeitskonzentration von 1,18 U/mL, ggf. Lagerung bei -20 °C
DNase	DNase 1 aus Rinderpankreas (D5025), 2 000 U/mg Für Primärzellisolation Lösung in 0,15 M NaCl Lösung zu einer Arbeitskonzentraion von 10 000 U/mL , ggf. Lagerung bei -20 °C
Elastase	Elastase aus Schweinepankreas (LS002292), 4,53 U/mg Für Primärzellisolation Lösung in 1X PBS zu einer Arbeitskonzentration von 2,9 U/mL
Trypsin	Trypsin aus Rinderpankreas (T8003), 10 000 U/mg, Lagerung bei -20 °C Für Primärzellisolation Lösung in 6,66 ml gepufferter isotoner Kochsalzlösung pro Gramm Trypsin, ggf. Lagerung bei -20 °C
Vitamin D3	1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D <sub>3</sub> (D1530), Lagerung bei -20 °C Für Zellkulturversuche Lösung von je 10 $\mu$ g in 2,4 ml 100 % Ethanol und Lagerung bei -20 °C als 10 $\mu$ M Stocklösung

### 3.1.4 Kits

**Tabelle 4: Verwendete Arbeitskits zur Aufbereitung der Zellen**

Prozess	Kit	Hersteller
Reverse Transkription	High Capacity RNA-to-cDNA™ Kit	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
RNA Isolation aus Zellysat (HPAEpiC)	NucleoSpin RNA Plus XS Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
RNA Isolation aus Zellysat (HPMEC)	peqGOLD Total RNA Kit	VWR PEQLAB, Darmstadt, Deutschland

### 3.1.5 Primärantikörper für Immunhistochemie

**Tabelle 5: Für Färbungen verwendete Primärantikörper**

Antigen Zielstruktur	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Bestellnr.
CD31	Maus	1:50	Dako, Glostrup, Dänemark	M 0823
CD74	Maus	1:200	Abcam, Cambridge, UK	AB 22603
DCLK1	Kaninchen	1:200	Abcam, Cambridge, UK	AB 109029
E-Cad	Ziege	1:40	R&D, Minneapolis, USA	AF 748
Ki67	Maus	1:500	BD Pharmingen™	556003
LL-37	Maus	1:50	Abcam, Cambridge, UK	AB 69484
MUC5B	Kaninchen	1:250	Abcam, Cambridge, UK	AB 2533338
SP-C	Kaninchen	1:400	Abcam, Cambridge, UK	AB 3786
VE-Cadherin	Ziege	1:50	R&D, Minneapolis, USA	AF 938
ZO-1	Maus	1:100	Abcam, Cambridge, UK	AB 2533147
ZO-1	Kaninchen	1:100	Abcam, Cambridge, UK	AB 2533938
β Tubulin	Maus	1:250	Abcam, Cambridge, UK	AB 2533072

### 3.1.6 Sekundärantikörper für Immunhistochemie

**Tabelle 6: Für Färbungen verwendete Sekundärantikörper**

Sekundär- antikörper	Zielstruktur	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Bestellnr.
Alexa Fluor 488	Ziegen-Ig	Esel	1:1000	Invitrogen, Oregon, USA	A11055
Alexa Fluor 488	Kaninchen-Ig	Esel	1:1000	Invitrogen, Oregon, USA	A21206
Alexa Fluor 555	Ziegen-Ig	Esel	1:1000	Invitrogen, Oregon, USA	A21432
Alexa Fluor 555	Maus-Ig	Esel	1:1000	Invitrogen, Oregon, USA	A31570



### 3.1.7 PCR Primer

**Tabelle 7: Primer für in der PCR untersuchte Genabschnitte**

QuantiTect Primer Assay	Ggf. Gen- / Alternativbezeichnung	Hersteller	Bestell- nummer
CD31	Platelet And Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 (PECAM-1)	QIAGEN, Niederlande	QT00081172
CD44		QIAGEN, Niederlande	QT00073549
CD74		QIAGEN, Niederlande	QT00059403
DCLK1		QIAGEN, Niederlande	QT00071323
DEFB1	Humanes $\beta$ -Defensin 1 (HBD-1)	QIAGEN, Niederlande	QT0008302
DEFB4A	Humanes $\beta$ -Defensin 2 (HBD-2)	QIAGEN, Niederlande	QT00204617
E-Cadherin	E-Cadherin 1, CDH1, CAM 120/80	QIAGEN, Niederlande	QT00080143
HOPX		QIAGEN, Niederlande	QT00492996
LGR5		QIAGEN, Niederlande	QT00027720
LL-37	CAMP, Cathelicidin	QIAGEN, Niederlande	QT00010458
RPL13A	60S ribosomal protein L13a, 'housekeeping gene'	QIAGEN, Niederlande	QT00089915
SCGB1A1	Clara Cell Phospholipid binding Protein, CC16	QIAGEN, Niederlande	QT00091091
SFTPA2	Surfactant Protein A2, SFA, SP-A	QIAGEN, Niederlande	QT00072926
SFTPC	Surfactant Protein C, SP-C	QIAGEN, Niederlande	QT00000714
VE-Cadherin		QIAGEN, Niederlande	QT00013244
Villin		QIAGEN, Niederlande	QT00017549
ZO-1	Zonula-occludens 1, TJP1	QIAGEN, Niederlande	QT00077308

### 3.1.8 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien für Zellkultur und -Aufbereitung**

Material	Ggf. Handelsname	Hersteller
Bechergläser		DURAN, SCHOTT, Mitterteich, Deutschland
Deckgläser	Cover Glasses No.1	Th Geyer, Warschau, Polen

ECIS 8-Well-Goldelektroden	ECIS Cultureware 8W10E PET	Applied BioPhysics, New York, USA
Kryoröhrchen	CryoPure Tube 1.8mL	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Objektträger	Labsolute Objektträger, reinweiß, geschnitten	Th Geyer, Warschau, Polen
Parafilm Verschlussfolie		Merck, Darmstadt, Deutschland
Pasteurpipetten	Pasteurpipetten aus Glas (150, 230 mm)	Hecht Assistent, Sondheim, Deutschland
PCR Reagiergefäße	Rotor-Gene® Style 4-Strip Tubes and Caps, 0.1m	STARLAB, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Biosphere® plus Filter Tips, Low Retention Pipettenspitzen ohne Filter (10, 200, 1000 µL)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Präparierbesteck: Pinzetten, Schere		Carl ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Reagiergefäße	Protein Low Binding Reagiergefäß (500, 1500, 2000 µL)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten	Serologische Pipetten (5mL, 12mL and 25mL)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sterilfilter	Bottle-Top-Filter mit SFCA-Membran (Porengröße 0,2 µm, 150 ml, 50 mm)	Carl ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Transwell Zellkultureinsätze	Transwell® Permeable Filter Support	Corning, USA
Zellkulturflaschen	Tissue culture flasks vent. cap (T25, T75, T175)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturröhrchen	Sarstedt Inc Screw Cap Tube (50, 15 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellsieb	EASYstrainer™ 100 µm für 50 mL Röhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

### 3.1.9 Geräte

**Tabelle 9: verwendete Laborgeräte**

Geräte	Model	Hersteller
Brutschrank	BBD6220, HERA cell 240	Thermo Scientific, Langenselbold, Germany
ECIS Gerät (kontinuierliche TEER- und Impedanzmessung)	ECIS-Z	Applied BioPhysics, New York, USA
Einfrierhilfe	NALGENE® Mr. Frosty	Thermo Scientific, USA
Feinwaage	BP 211D	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	EVOS FL Auto 2	Life Technologies, Grand Island, USA
Gefrierschrank (-20°C)	Premium NoFrost comfort	LIEBEHERR, Austria
Gefrierschrank (-80°C)	HERA freeze	Heraeus, Hanau, Deutschland
Konzentrationsmessgerät für Nucleinsäuren	Nano Drop 2000	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Kühlschrank (4°C)	profi line	LIEBEHERR, Austria
Lichtmikroskop	Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Magnet zur Aufreinigung der HPMEC	DynaMag™ - 2 Magnet	Invitrogen, Carlsbad, USA
Mikrozentrifugen	3722L 220VAC	Fisher Scientific, USA Carl ROTH, Germany
Petrischalen	Ibidi µ-dish 35 mm, low	Ibidi GmbH, Gräfelfing, Bayern
pH-Meter	Inolab, pH 7110	WTW, Weilheim, Germany
Pipetten	Research plus (10µl, 100µl und 1000µl)	Eppendorf, Hamburg, Germany
Real-time PCR Cycler	Rotor-Gene Q	Qiagen, Hilden, Deutschland
Rollmischer Lungengewebe	3107A INC - Biometra OV5 Incubator	Analytik Jena, Jena, Deutschland
Sterilwerkbänke	HERA safe	Heraeus, Hanau, Germany
Stickstofftank	Locator 4 plus	Thermo Scientific, USA

TEER Messgerät	EVOM <sup>2</sup> Epithelial Voltohmmeter mit STX2 - Elektrode	World Precision Instruments, Berlin, Deutschland
Waage	BP211D	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	Wasserbad 1004	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zentrifugen	Biofuge primo R Biofuge pico Multifuge 3 S-R Hermle Z 206 A	Heraeus, Hanau, Deutschland Heraeus, Hanau, Deutschland Heraeus, Hanau, Deutschland HERMLE Labortechnik, Wehingen, Deutschland

### 3.1.10 Software

**Tabelle 10: zur Datenerfassung und -Auswertung verwendete Software**

Software	Version	Firma
Bildbearbeitung	NIH ImageJ	National Institutes of Health
ECIS (Electric Cell Impedance Sensing; Impedanzmessung)	ECIS acquisition, control and display software	Applied BioPhysics, New York, USA
Real-time PCR	Rotor-Gene Q software 2.3.5	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Statistik	Graphpad Prism 5	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA

## 3.2 Gewinnung der Primärzellen

### 3.2.1 Herkunft des Gewebes

Im Rahmen von Tumorresektionen entferntes, tumorfreies humanes Lungengewebe wurde aus der Klinik für allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie des UKSH bezogen. Die Verwendung des menschlichen Materials wurde durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Christian Albrechts Universität zu Kiel genehmigt und von jedem Patienten schriftlich bewilligt. Die 2-6 g schweren Resektate stammten aus der Peripherie des jeweiligen Lungenlappens und waren meist mit Pleura überzogen. Der Anteil mitresezierter Bronchiolen sowie Fibrosierung und Antrakose des Gewebes variierte spenderabhängig.

### 3.2.2 Isolation der Alveolarepithelzellen

Zur Gewinnung von Alveolarepithelzellen aus dem Gewebe wurde das Protokoll von Murphy et al. (Murphy et al., 1999) zugrundegelegt und an einzelnen Stellen modifiziert. Der Isolationsprozess umfasste ab Entnahme folgende Schritte: Das Lungengewebe wurde in Gewebepuffer bei Raumtemperatur gelagert und binnen zwei Stunden nach OP verarbeitet. Mit sterilem Präparationsbesteck wurden Bronchiolen und Pleura weitestgehend entfernt und das Gewebe in kleinste Stücke geschnitten. Diese wurden anschließend mit BSSB Puffer gewaschen und danach in ca. 20 mL Gewebepuffer mit 1,18 U/mL Dispase über Nacht (12 - 14 Stunden) bei 4 °C auf einem Rollmischer inkubiert.

Nach erneutem Waschen mit BSSB Puffer folgte ein Verdau mit Trypsin und Elastase, durch den die Epithelzellen aus den Bindegewebsstrukturen herausgelöst wurden. Dazu wurden die Gewebstücke in 30 mL BSSB Puffer mit Zugabe von 150 mg Trypsin (10 000 U/mg) und 0,641 mg Elastase (4,53 U/mg) gegeben und für eine Stunde bei 37 °C im Wärmesrotor geschwenkt. Der Verdau wurde durch Zugabe von 40 mL DMEM/F12, versetzt mit 10 mL FBS und 1 mL DNase (10 000 U/mL), gestoppt und die Gewebestückchen durch Auf- und Abpipettieren weiter aufgefaser. Durch Auswaschen und Abfiltrieren der makroskopischen Gewebsreste mit einem 100 µm-Zellsieb wurden die Zellen schließlich in BSSB Puffer gelöst und bei 400 g für 10 - 15 Minuten abzentrifugiert. Dann wurde das Zellgemisch in einem Adhäsionsmedium aus 3 mL SAGM, 3 mL DMEM/F12 und 120 µL DNase (10 000 U/mL) in eine unbeschichtete T25 Flasche transferiert und für 90 Minuten bei 37 °C inkubiert. Enthaltene Endothelzellen und Fibroblasten, welche schneller adhäreren als Alveolarepithelzellen, konnten sich dadurch am Boden absetzen, während die Epithelzellen überwiegend in Lösung blieben. Die adhärenen Zellen wurden nach Entfernung des Überstands in EGM2 Medium weiterkultiviert, um daraus HPMEC zu gewinnen. Der Überstand wurde gesammelt, die Zellsuspension durch Zentrifugation auf ein Volumen von 10 mL reduziert und als oberste Schicht auf einen Gradienten aus je 10 ml einer unterschiedlich dichten Percoll Lösung gegeben. Das Röhrchen wurde für 20 Minuten bei 400 g mit geringer Beschleunigung und ohne Bremse zentrifugiert. Die humanen primären Alveolarepithelzellen (HPAEpiC) sammelten sich dadurch in der Zwischenphase und konnten aus dieser nach Entfernung der oberen Phase abgesaugt werden. Um die Zellen vom toxischen Percoll zu reinigen, wurden sie mit BSSB Puffer durch Zentrifugation und Resuspension gewaschen, schließlich in SAGM resuspendiert und mit einer Dichte von 360 000 /cm<sup>2</sup> auf Transwell® Filtereinsätze ausgesät.

### 3.2.3 Isolation der Endothelzellen

Das bei der Primärzellisolation in der T25 Flasche verbliebene Zellgemisch wurde in EGM2 Medium weiterkultiviert, bis die enthaltenen Endothelzellen Konfluenz erreichten oder eine Überwucherung mit Fibroblasten drohte. Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage. Mit dem Dynabeads® CD31

Endothelial Cell Kit wurden die Endothelzellen entsprechend der Herstellerangaben weiter aufgereinigt. Aufgrund der geringen Zellzahl erwies sich abweichend von diesen ein Volumen von 25 µl der originalen Dynabeads je ml Zellsuspension als optimal. Durch Bindung magnetischer Partikel an den endothelspezifischen Oberflächenmarker CD31 konnten so die humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen (HPMEC) mittels eines Magneten aus dem Zellgemisch herausgezogen werden. In der Regel waren zwei bis drei Zyklen aus Kultur und Aufreinigung nötig, um die gewünschte Reinheit zu erzielen. Für die definitiven Versuche wurde daher die dritte bis sechste Passage der HPMEC eingesetzt. Sofern nicht direkt verwendet, wurden die Endothelzellen in EGM2 Medium mit 10 % DMSO in flüssigem Stickstoff eingefroren, andernfalls in EGM2 mit einer Dichte von 50 000/cm<sup>2</sup> auf die basolaterale Seite der Transwell® Filter ausgesät.

### **3.3 Kultursystem und Behandlung mit Vitamin D3**

#### **3.3.1 Transwell® System:**

Um die alveolokapilläre Membran zu imitieren, wurden Transwell® Filtereinsätze verwendet, die die beidseitige Besiedlung einer semipermeablen Membran (Dicke: 10 µm, Fläche: 0,33 cm<sup>2</sup>, Porengröße: 0,4 µm) erlauben. Dadurch können kokultivierte Zelltypen miteinander kommunizieren, bilden jedoch getrennte Layer aus. In den Monokulturen wurden HPAEpiC auf der apikalen Seite mit einer Dichte von 360 000 Zellen pro cm<sup>2</sup> ausgesät, in den Kokulturen zusätzlich HPMEC auf der basolateralen Seite mit 50 000 Zellen pro cm<sup>2</sup>. Die hohe Aussaatdichte der Alveolarepithelzellen wurde gewählt, um eine schnelle Konfluenz zu erreichen, bevor ggf. noch enthaltene Fibroblasten sich etablieren konnten. Die HPAEpiC stammten direkt aus dem Lungengewebe des Vortags, die HPMEC von einem der vorherigen Spender, was durch den Aufreinigungsprozess unvermeidbar war.

#### **3.3.2 Kulturbedingungen und Behandlungsschema**

In den Monokulturen wurde für beide Kompartimente SAGM Medium verwendet: 200 µL apikal und 800 µL basolateral. Der niedrige Serumgehalt fördert den Typ 1 Phänotyp und hemmt Fibroblastenwachstum. In den Kokulturen wurde apikal SAGM und basolateral EGM2 in den entsprechenden Volumina eingesetzt. Die Filter wurden bereits am Vortag der Aussaat apikal mit je 10 µg/ml Fibronectin und Kollagen Typ 1 in SAGM beschichtet. Kollagen Typ 1 fördert dabei die Transdifferenzierung zu Typ 1 Zellen (Maria Iris Hermanns, 2005). Die Filter für Kokulturen erhielten zusätzlich eine Beschichtung mit 10 µg/ml Fibronectin in EGM2 von basolateral. Die Zellen wurden bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

Die Filter wurden je Spender in drei Behandlungsmodi á sechs Filter aufgeteilt: Tag 3, Tag 7 Kontrolle und Tag 7 mit Vitamin D3. Es wurden insgesamt sieben Monokulturen und drei Kokulturen angelegt.

Bei zwei Spendern reichte die gewonnene Zellzahl für einen direkten Vergleich zwischen Mono- und Kokultur aus.

Ab Tag 3 wurde der transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER) bei allen Filtern gemessen. Ein Teil der Kulturen wurde danach bereits durch Fixierung oder Lyse beendet, um später in Färbungen und PCR-Daten den Kulturverlauf beurteilen zu können. Die TEER-Daten dieser Filter flossen in die der unbehandelten Kontrollgruppe an Tag 3 ein. Der Rest der Filter wurde bis Tag 7 weiterkultiviert. Dabei wurde täglich der TEER gemessen und anschließend das Medium gewechselt. Bei der Hälfte der verbliebenen Filter wurde das apikale und basolaterale Medium ab dem ersten Mediumwechsel an Tag 3 mit 10 nM Vitamin D3 (1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>) versetzt. Vitamin D3 wurde dazu in Ethanol gelöst (10  $\mu$ M), bei -80 °C gelagert, und 1:1000 verdünnt in das jeweilige Medium gegeben. Nach der letzten TEER Messung an Tag 7 wurden auch diese Kulturen mittels Fixierung oder Lyse beendet.

Im klinischen Kontext werden Vitamin D Spiegel von 100 nM empfohlen und Serumkonzentrationen von 75 nM bereits als insuffizient betrachtet. In vitro erwiesen sich in vorherigen Versuchsreihen jedoch bereits 10 nM als optimal, um einen Effekt gegenüber der Vergleichsgruppe abzubilden, deren Medien ja vollständige Vitamin D Depletion suggerierten.

Die Messung des TEER wurde mit einer STX2 Chopstick Elektrode vorgenommen, welche mit einem Kontakt in das apikale, mit einem in das basolaterale Kompartiment getaucht wurde, ohne dabei das Plastik des Filters zu berühren.

### **3.4 Immunhistochemische Färbungen**

Zur Fixierung wurden die Zellen nach Asservierung des Überstands mit 100  $\mu$ L pro Well 4 % Paraformaldehyd versetzt und nach zehnminütiger Inkubationszeit dreimal mit 200  $\mu$ L 1x PBS pro Well und je fünf Minuten Inkubationszeit gewaschen. Bis zu den Färbungen wurden die Filter mit PBS feuchtgehalten und bei 4 °C aufbewahrt.

Um die Zellen für die Färbung permeabel zu machen, wurden sie für zehn Minuten mit 150  $\mu$ L pro Well 0,5 % Triton inkubiert, worauf erneut ein Waschschrift nach obigem Schema folgte. Auf Basis von 1x PBS mit 1 % BSA wurden die Primärantikörper entsprechend verdünnt (siehe Tabelle 5) und je 100  $\mu$ L auf ein Well gegeben. Für die Kofärbungen wurden beide Primärantikörper gleichzeitig verwendet. Die Primärantikörper wurden für 130 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, worauf ein erneuter Waschschrift folgte. Die Sekundärantikörper wurden 1:1000 in 1x PBS mit 1 % BSA verdünnt und mit 100  $\mu$ L pro Well für eine Stunde im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden ab diesem Punkt lichtgeschützt gehandhabt. Nach erneutem Waschen der Zellen erfolgte die Kernfärbung mit 150  $\mu$ L

pro Well Hoechst Fluoreszenzfarbstoff, der dazu 1:500 in 1x PBS verdünnt wurde. Nach zehnminütiger Inkubationszeit und einem letzten Waschschrift wurden die Filtermembranen aus dem Transwell® System gelöst, mit der gefärbten Zellschicht nach oben auf Objektträger gelegt und mit Fluoromount-G Mounting Medium und Deckglas versiegelt.

### **3.5 Quantitative realtime PCR**

Für die Erhebung der PCR Daten wurden mindestens drei Wiederholungen aus unterschiedlichen Spendern durchgeführt. Zur RNA Gewinnung wurde für die HPMEC das Kit von PEQLab und für die HPAEpiC das NucleoSpin RNA Plus XS Kit von Macherey-Nagel genutzt, da bei letzteren die extrahierte RNA Menge meist sehr gering war. Zum Lysieren der Zellen wurden dazu nach Asservierung des Überstands 400 µL pro Well des RNA Lysis Puffer T (HPMEC) respektive 50 µL pro Well Lysis Puffer 1 (HPAEpiC) zugegeben und das Zelllysats unter Auf- und Abpipettieren und vorsichtigem Kratzen mit der Pipettenspitze von der Filtermembran abgelöst und gesammelt. Bei den Kokulturen wurde in der Regel nur die apikale Zellschicht geerntet, wobei durch Kontroll-PCR dreier Spender auf die endothelspezifischen Marker CD31 und VE Cadherin sichergestellt wurde, dass dabei kein Übertritt von basolateralem Zellmaterial stattfand. Die weitere Aufbereitung erfolgte nach Anleitung des jeweiligen Kit-Herstellers. Sofern nicht direkt verwendet, wurde die RNA bei -80 °C gelagert. Zum Umschreiben in cDNA wurde das High Capacity RNA-to-cDNA™ Kit von Applied Biosystems unter Einsatz von 1 µg RNA genutzt und die fertige cDNA bei -20 °C gelagert oder direkt verwendet.

### **3.6 Auszählung der proliferierenden Zellen**

Ki67, ein nukleäres Protein, das nur in der Interphase exprimiert wird und so Zellzyklusaktivität anzeigt, wurde in Monokulturen mit und ohne Vitamin D3 Behandlung gefärbt und der Anteil proliferierender Zellen bei drei Spendern verglichen. Da je nach Zellzyklusphase eine oder mehrere Ki67-Markierungen pro Zelle erscheinen und dies für automatisierte Erkennungssoftware eine potenzielle Fehlerquelle darstellte, wurde eine manuelle Auszählung durchgeführt. Dafür wurden pro Spender und Behandlungsgruppe in drei zufällig gewählten, nicht überlappenden Bildausschnitten in 10-facher Vergrößerung (Fläche:  $942\text{ }\mu\text{m} \times 750\text{ }\mu\text{m} = 706\,500\text{ }\mu\text{m}^2$ ) zunächst alle Zellkerne und dann jene mit Anfärbung für Ki67 unter Zuhilfenahme von Gitternetzlinien gezählt. Die Mittelwerte der drei Bildausschnitte wurden gebildet und in prozentuale Relation gesetzt (Ki67 Markierungen / alle Nuclei), um den Anteil proliferierender Zellen zwischen der Kontrollgruppe und der Vitamin D3 Gruppe zu vergleichen.



## **3.7 Kontrollversuche an Endothelzellen**

### **3.7.1 Kulturbedingungen**

Alle HPMEC Kulturen wurden bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> in EGM2 Medium kultiviert. Die jeweiligen Kulturflächen wurden mit 10 µg/mL Fibronectin beschichtet. Für die Passagierung der HPMEC wurden die Zellen mit PBS gespült und anschließend mit 3 mL (T25 Flaschen) bzw. 5 mL (T75 Flaschen) Trypsin/EDTA für zehn Minuten inkubiert. Die Trypsinisierung wurde mit dem doppelten Volumen an 1x PBS mit 10 % FBS gestoppt, die Zellen nach Abzentrifugation in EGM2 Medium resuspendiert und je nach Flaschengröße in 6 bzw. 15 mL pro Flasche auf das doppelte der vorherigen Fläche ausgesät bzw. mit einer Dichte von 50 000 / cm<sup>2</sup> auf die definitiven Kulturflächen aufgebracht.

### **3.7.2 Färbungen, PCR und Widerstandsmessungen von HPMEC Monokulturen**

Die Reinheit der HPMEC wurde durch immunhistochemische Färbung der endothelspezifischen Oberflächenproteine CD31 und VE-Cadherin kontrolliert. Dafür wurden die HPMEC eines Spenders mit einer Dichte von 50 000/cm<sup>2</sup> auf zwei 8-Well-Ibidi-Slides ausgesät und für sieben Tage kultiviert. Wie bei den definitiven Kokulturen wurde hier ab Tag drei das Medium gewechselt und bei der Hälfte der Wells 10 nM Vitamin D3 zugegeben.

Um die Barrierebildung der HPMEC alleine gegenüber den Kokulturen abzugrenzen, wurde in einer basolateralen Monokultur auf Transwell® Filtern der TEER der HPMEC gemessen. Auch hier wurden sechs Filter mit 10 nM Vitamin D3 behandelt und sechs als Kontrolle belassen. Von diesen Filtern wurden ebenfalls Kontrollfärbungen auf Reinheit (endothelspezifische Oberflächenantigene CD31 und VE-Cadherin) und Konfluenz (Tight Junctions: ZO-1) vorgenommen.

Sowohl bei den Ibidi Kulturen als auch bei den Transwell® Kulturen wurde zudem durch Färbung die Expression von DCLK1 durch HPMEC ausgeschlossen, und ein etwaiger Einfluss einer VD3 Behandlung auf die Ausbildung von Tight junctions durch Färbung von ZO-1 untersucht.

Da der TEER der HPMEC in den Transwell® Kulturen sich auf einem sehr niedrigen Niveau bewegte und durch die Messung mittels STX2 Chopstick Elektrode nur unzureichend erfasst werden konnte, wurden zusätzlich unterschiedliche Passagen zweier Spender auf 8-Well-Goldelektroden des ECIS Systems ausgesät, welches eine sehr viel sensitivere und zudem kontinuierliche Messung von Impedanz und TEER ermöglicht. Wie in den Kokulturversuchen wurde ab Tag drei täglich das Medium gewechselt und je ein Slide mit 10 nM Vitamin D3 behandelt.

### 3.8 Statistik

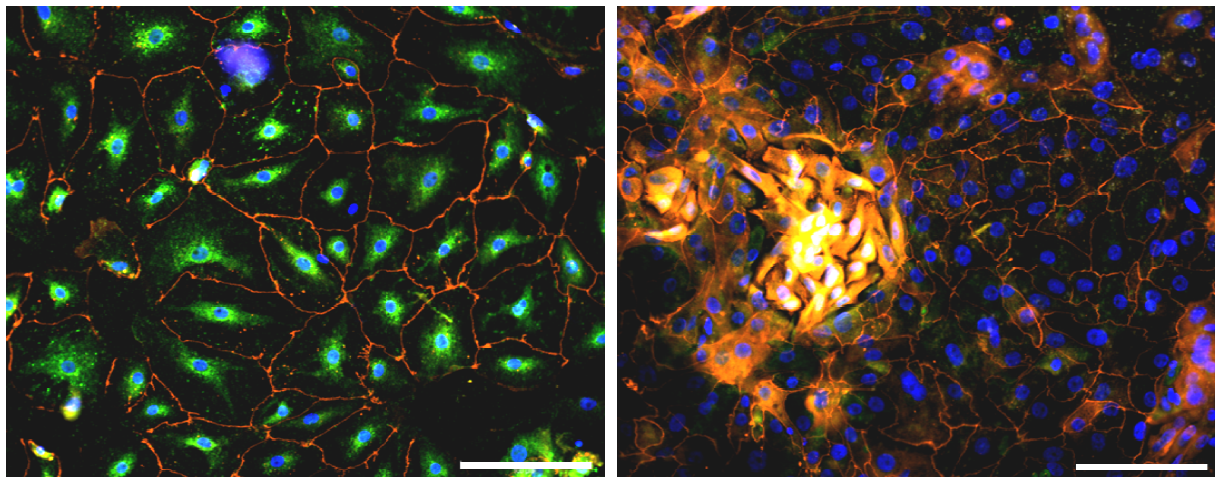
Alle statistischen Berechnungen wurden mit GraphPad Prism 5 durchgeführt. Für den Vergleich der PCR Daten zwischen Tag 3 und Tag 7, respektive Tag 7 Kontrolle und Tag 7 mit Vitamin D3, sowie den Vergleich der TEER-Daten aus verschiedenen Kulturmodi wurde der T-Test für verbundene Stichproben (paired t-test) durchgeführt. Dadurch konnte der Verlauf der Werte innerhalb des einzelnen Sponsors berücksichtigt werden, ohne durch die spenderabhängigen individuellen Schwankungen beeinflusst zu sein. Unterschiede wurden als signifikant bewertet, wenn der p-Wert kleiner als 0,05 war (\* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ ). Da die unbehandelten Proben von Tag 7 einerseits mit Tag 3, und andererseits mit den mit Vitamin D3 behandelten Proben von Tag 7 verglichen wurden, wurde die Bonferroni-Korrektur für Mehrfachtestung angewendet und der p-Wert jeweils mit 2 multipliziert. Für die PCR Daten wurden jeweils drei oder mehr Wiederholungen aus verschiedenen Spendern durchgeführt.

Die quantitative Auszählung der Ki67 Färbungen wurde ebenfalls an drei verschiedenen Spendern wiederholt. Wegen der eingeschränkten Verfügbarkeit des humanen Gewebes wurde bei der qualitativen Auswertung der Färbungen zugunsten weiterer Färbekombinationen z.T. auf eine dreimalige Wiederholung verzichtet und die Bestätigung von Beobachtungen an mindestens einem weiteren Spender vorgenommen.

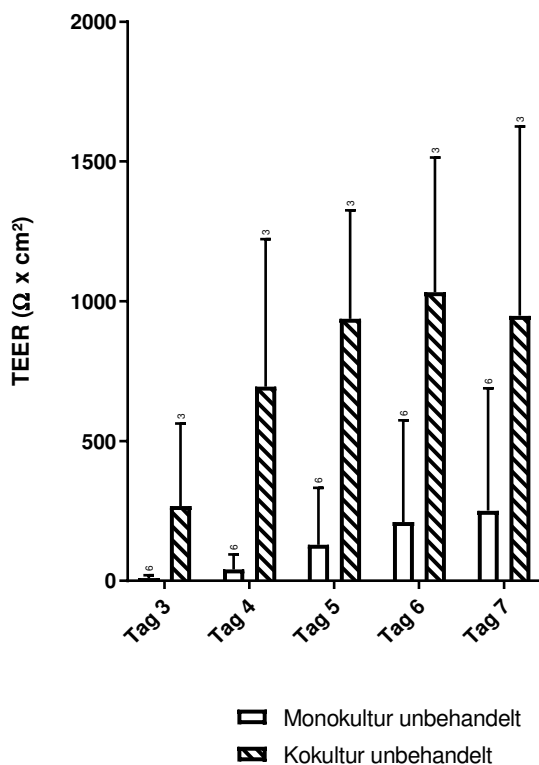
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Verhalten der Zellen im Kulturverlauf

Um die Konfluenz der kultivierten Alveolarepithelzellen zu erfassen, wurden die Zellkontaktproteine ZO-1 und E-Cad an Tag 3 und Tag 7 immunhistochemisch gefärbt. Für die Transdifferenzierung der Typ 2 Zellen wurde das Surfactantprotein SP-C ebenfalls an Tag 3 und Tag 7 gefärbt. Die Färbungen zeigten hier bei fast allen Spendern bereits an Tag 3 ein konfluentes Epithel, das an Tag 7 bei allen Spendern Konfluenz erreicht und kontinuierliche Schlussleistenkomplexe ausgebildet hatte. Die initiale Reife war dabei zwischen den einzelnen Spendern sehr unterschiedlich. Während bei einigen Spendern an Tag 3 in allen Zellen noch eine homogene, perinukleäre SP-C Färbung vorlag und das Epithel aus isomorphen, halb-flachen Zellen bestand (siehe Abb. 3 links), zeigten andere bereits ein heterogenes Muster aus kuboidalen, SP-C exprimierenden Arealen und vereinzelt SP-C armen, abgeflachten Zellen mit Typ 1 Morphologie. Unabhängig vom Ausgangszustand ließ sich jedoch im Kulturverlauf von Tag 3 bis Tag 7 eine zunehmende Heterogenisierung des Epithels beobachten: neben Arealen mit sehr großen, flach ausgebreiteten Zellen mit Verlust der SP-C Anfärbung entwickelten sich Zellcluster mit kuboidalen, teilweise mehrschichtig wachsenden Zellen, von denen viele eine intensive SP-C Anfärbung aufwiesen (siehe Abb. 3 rechts). Kofärbungen der beiden Typ 2 Marker SP-C und CD74 zeigten außerdem, dass alle CD74 exprimierenden Zellen auch SP-C exprimierten, es jedoch auch Typ 2 Zellen mit SP-C- aber ohne CD74 Expression gab, CD74 also eine Subpopulation der Typ 2 Zellen zu markieren scheint.



**Abb. 3:** Kofärbung von ZO-1 und SP-C am apikalen Epithel an Tag 3 (links) und Tag 7 (rechts). rot: ZO-1, grün: SP-C, blau: Nuclei, Maßstab = 100  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 4: TEER der unbehandelten Mono- und Kokulturen auf Transwellfiltern von Tag 3 bis Tag 7.** Monokulturen n=6, Kokulturen n=3, jeweils 6 Transwells.

Die Barriere der Primärzellen auf den Transwellfiltern wurde mittels täglicher TEER Messungen von Tag 3 bis Tag 7 erfasst. Die Absolutwerte unterlagen dabei einer starken spenderabhängigen Schwankung. Vor allem bei den Monokulturen blieben die Widerstände hinter der aus der Literatur erwarteten Höhe zurück (siehe Abb.18 im Anhang). Bei allen Spendern ließ sich jedoch eine kontinuierliche Zunahme des TEER verzeichnen, mit einem Trend zu früheren Maxima in den Kokulturen. Während in den Monokulturen die Widerstände erst im späteren Verlauf, meist Tag 5, über den Leerwert anstiegen, war in den Kokulturen schon an Tag 3 eine hohe Barriere von 100 bis zu 500  $\Omega \times \text{cm}^2$  messbar (siehe Abb. 4).

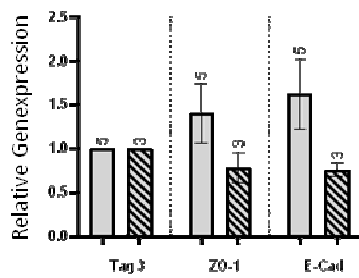
Für die in der Literatur beschriebene Transdifferenzierung der isolierten Typ 2 Zellen zu Typ 1 Zellen, wurde außerdem die Genexpression verschiedener Typ 1- und Typ 2 Marker mittels PCR untersucht. Dazu wurden auch hier Proben von Tag 3 und Tag 7 miteinander verglichen, um den Kulturverlauf abzubilden. Die mRNA Expression der Typ 2 Marker SP-C und CD74 war hierbei im Kulturverlauf rückläufig; für SP-C signifikant. Die mRNA Expression des ebenfalls als Typ 2 Marker geltenden CD44 nahm hingegen in den Mono- und Kokulturen zu (siehe Abb. 5 c)). Die Expression der mit dem Auftreten von Typ 1 Zellen korrelierten Marker Cav-1 und HOPX entwickelte sich im Kulturverlauf mit Ausnahme einer signifikanten Abnahme der HOPX Expression in den Kokulturen nicht eindeutig (siehe Abb. 5 b)).

Morphologisch formierten sich sowohl den in Mono- als auch in den Kokulturen teils mehrschichtig wachsende Cluster kuboidaler Zellen zwischen den flachen Typ 1 Arealen. Diese Zellcluster wurden im Kulturverlauf größer. Einige dieser Zellen zeigten starke SP-C Anfärbung, andere gar keine, sodass die Anwesenheit weiterer, mitisolierter Bronchial- oder Stammzelllinien in Betracht gezogen wurde. Daher wurden mittels PCR die Expressionslevel verschiedener Bronchialepithel- und Stammzellmarker im Kulturverlauf untersucht (siehe Abb. 5 d) und e)). CC16 als Marker für

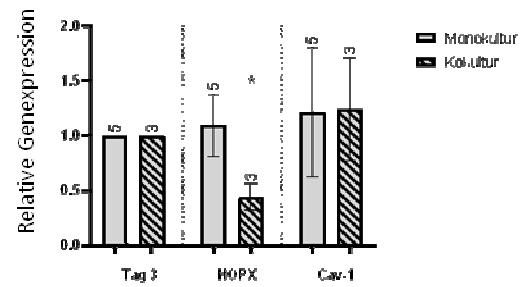
Keulenzellen fiel dabei sowohl in Mono- als auch in Kokultur signifikant ab ( $p < 0,001$  respektive  $p < 0,01$ ). Das basale Atemwegszellen markierende Keratin 14 (CK14) hingegen nahm im Kulturverlauf zu, was ein Hochwachsen mitisolierter Bronchialepithelzellen nahelegte. DCLK1 und LGR5 als stammzellassozierte Marker zeigten lediglich in den Monokulturen eine geringe Zunahme, während sich für den Bürstenzellmarker Villin kein eindeutiger Trend beobachten ließ.

Die epitheliale Immunreaktion wurde ebenfalls im Kulturverlauf untersucht, um Referenzwerte für die spätere Vitamin D3 Behandlung zu gewinnen. Anhand der mRNA Expression von SP-A, HBD-1, HBD-2 und LL-37 wurde der Reizzustand des Epithels an Tag 3 und Tag 7 mittels PCR verglichen. SP-A zeigte hierbei sowohl in Mono- als auch in Kokultur eine Abnahme. Die mRNA Konzentration der  $\beta$  Defensine HBD-1 und HBD-2 nahm sowohl in Mono- als auch in Kokultur zu. Das Cathelicidin LL-37 zeigte keinen eindeutigen Trend (siehe Abb. 5 f)).

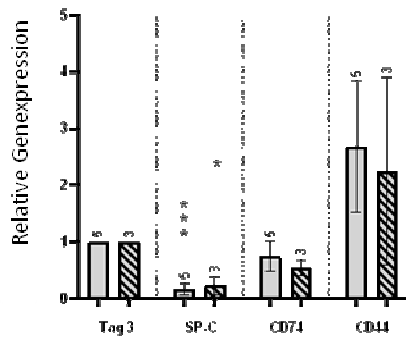
a) Zellkontakte



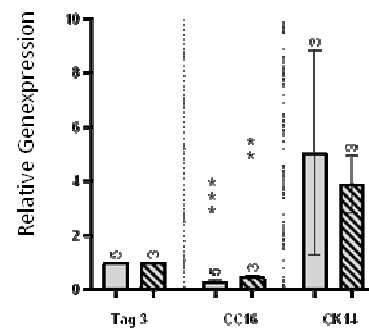
b) Typ 1 Marker



c) Typ 2 Marker

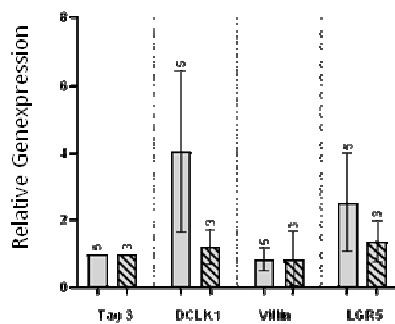


d) Bronchialepithelmarker



e)

Progenitor- und Stammzellassoziierte Marker



f)

Marker der epithelialen Immunreaktion

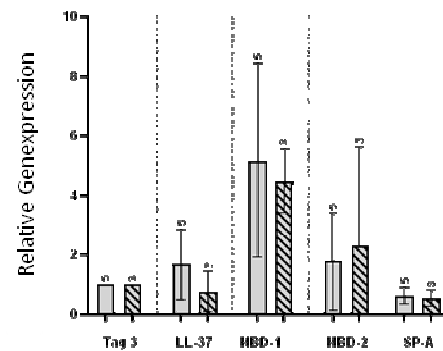


Abb. 5: qPCR von Markermolekülen im Kulturerlauf. Vergleich der relativen Genexpression von Tag 7 zum Ausgangswert von Tag 3 (jew. Referenzwert von 1). Tag 3 stellt jeweils den Referenzwert 1 für alle Moleküle dar. Die übrigen Werte stellen die relative Genexpression des jeweiligen Moleküls an Tag 7 dar. Monokulturen n=5 (CK14 Monokulturb n=3); Kokulturen n=3. paired t-test: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

## 4.2 Einfluss der Kokultivierung

In den gemessenen Widerstandswerten zeichneten sich trotz großer Unterschiede in den Absolutwerten der einzelnen Spender zwei Effekte der Kokultivierung ab: 1.) Der transepitheliale Widerstand der Kokulturen war grundsätzlich höher als in den Monokulturen. 2.) Die Kokulturen bildeten früher eine Barriere aus (vgl. Abb. 4 sowie Abb. im Anhang). Morphologisch wirkten die Kokulturen an Tag 3 bereits weiter entwickelt als die Monokulturen. In Färbungen von SP-C und den Zellkontakten des apikalen Zelllayers war in den Kokulturen an Tag 3 bereits eine deutliche Abgrenzung von Typ 1 und Typ 2 Zellen möglich, während in den Monokulturen die SP-C Expression oft noch homogener über das ganze Zelllayer verteilt war und auch an Tag 7 in den abgeflachten Typ 1 Zellen noch Anteile von SP-C Expression zu finden war. Bei 2 Spendern war ausreichend Gewebe für einen direkten Vergleich zwischen Mono- und Kokultur innerhalb des gleichen Spenders vorhanden, der den Eindruck einer früheren TEER Entwicklung und morphologischen Reifung der Kokulturen bestätigte (vgl. Abb. 15 im Anhang sowie in Abb. Spender D.19-12 und D.19-14).

Die PCR Ergebnisse der Kokulturen folgten für die meisten Marker dem gleichen Trend wie in den Monokulturen (vgl. Abb. 5). Ausnahme hiervon waren 1.) die Zellkontaktmoleküle, deren mRNA Expression unter Kokultivierung im Kulturverlauf abnahm, 2.) die Expression von HOPX, die nur in Kokultur stark abfiel und 3.) die Expression von LL-37, die in Kokultur einen abfallenden, in Monokultur einen ansteigenden Trend aufwies.

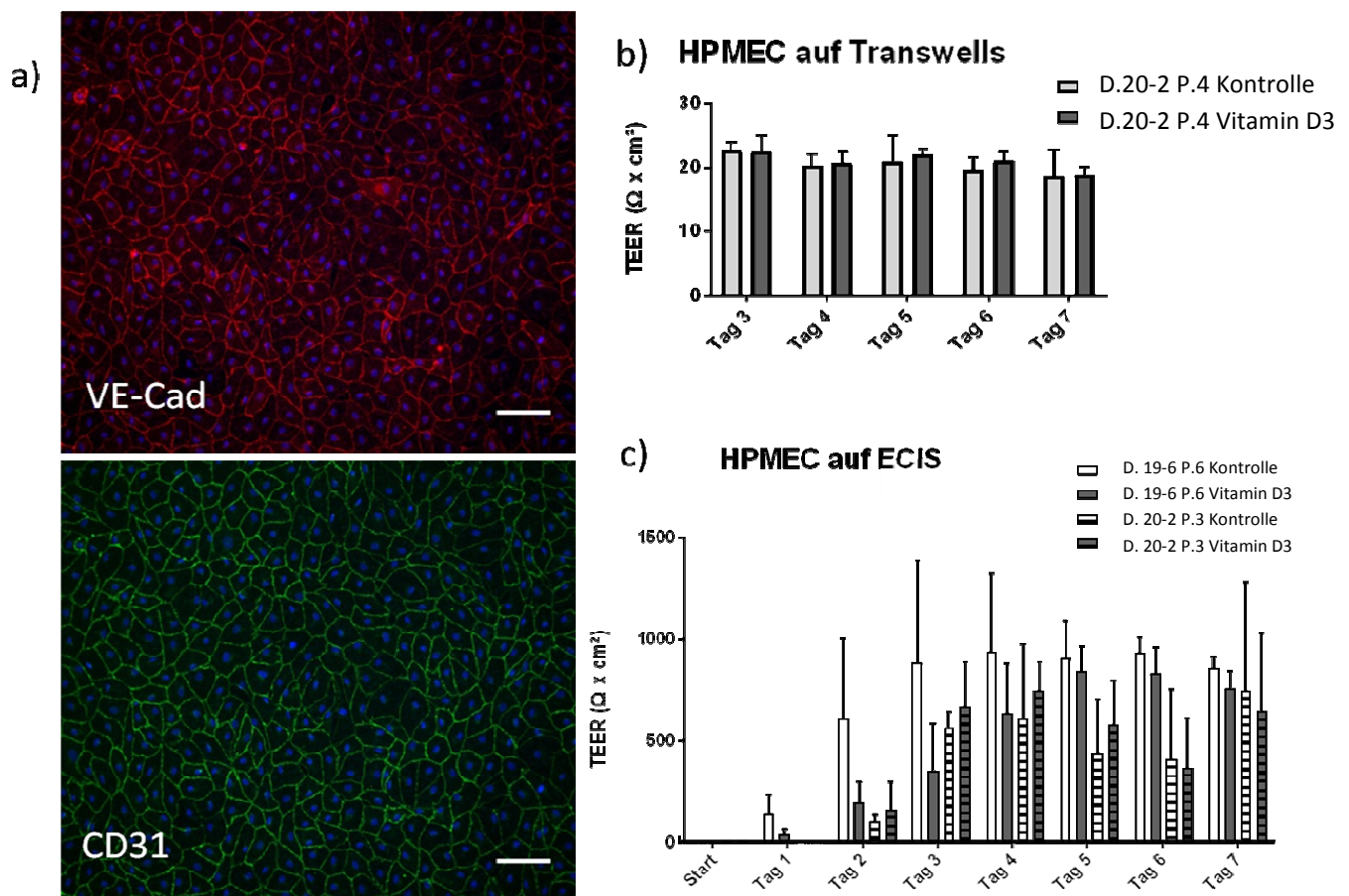
Die Vermischung von apikaler mit basolateraler RNA bei der Lyse des apikalen Zelllayers der Kokulturen wurde mittels PCR ausgeschlossen. Dafür wurde das apikale Zelllysat auf die endothelspezifischen Oberflächenmarker CD31 und VE-Cad untersucht. Als Positivkontrolle wurde dabei Lysat von HPMEC verwendet, als Negativkontrolle die Typ 2 Zelllinie H441 herangezogen. Hierbei ließen sich weder CD31 noch VE-Cad im apikalen Lysat detektieren, sodass davon auszugehen ist, dass die PCR Ergebnisse der Kokultur ausschließlich das Verhalten des apikalen Zelllayers widerspiegeln.

## 4.3 Kontrollversuche an Endothelzellen

Zur Überprüfung von Reinheit und Konfluenz der aus dem Lungengewebe extrahierten Endothelzellen wurden diese unter sonst gleichen Kulturbedingungen auf Transwells in basolateraler Monokultur, sowie auf 8-well Ibidi Trägern kultiviert und auf die endothelspezifischen Oberflächenproteine CD31 und VE-Cadherin immunhistochemisch gefärbt. Hierbei zeigte sich durchweg die Ausbildung eines konfluenten, einschichtigen Zellverbandes mit endotheltypischer Morphologie und Expression von CD31 und VE-Cadherin in allen Zellen. Die Ergebnisse dieser Kontrollfärbungen konnten somit Reinheit und Konfluenz der HPMEC bestätigen (siehe Abb. 6 a)).

Außerdem wurde durch immunhistochemische Färbung eine etwaige Expression von DCLK1 und SP-C durch die HPMEC ausgeschlossen, und ein potenzieller Einfluss von Vitamin D3 auf die Ausbildung von Tight Junctions durch Färbung von ZO-1 untersucht. Mit Ausnahme eines Spenders, der unter Vitamin D3 eine stärkere Intensität der ZO-1 Anfärbung aufwies, zeigte die Behandlung der HPMEC mit Vitamin D3 hier keinen Effekt.

Konsens der Literatur ist, dass Endothelzellen die alveoläre Barriere regulieren, jedoch selbst keine TEER-relevante Barriere bilden (Maria Iris Hermanns et al., 2009b; Vestweber, 2000; L. Wang et al., 2013). Um dennoch einen Referenzwert zu gewinnen und den in den Kokulturen erhöhten TEER gegenüber einer alleinigen Addition durch die endothelialen Barriere abzugrenzen, wurde der TEER in basolateraler HPMEC Monokultur unter sonst gleichen Bedingungen von Tag 3 bis Tag 7 gemessen. Hierbei zeigten sich im Verlauf konstante Widerstandswerte um die  $20 \Omega \times \text{cm}^2$ , die wesentlich niedriger als die alleinige Differenz zwischen Mono- und Kokulturen der HPAEpiC ausfielen. Die Behandlung mit Vitamin D3 zeigte keinen Effekt auf den TEER der HPMEC in Transwellis (siehe Abb. 6 b)).



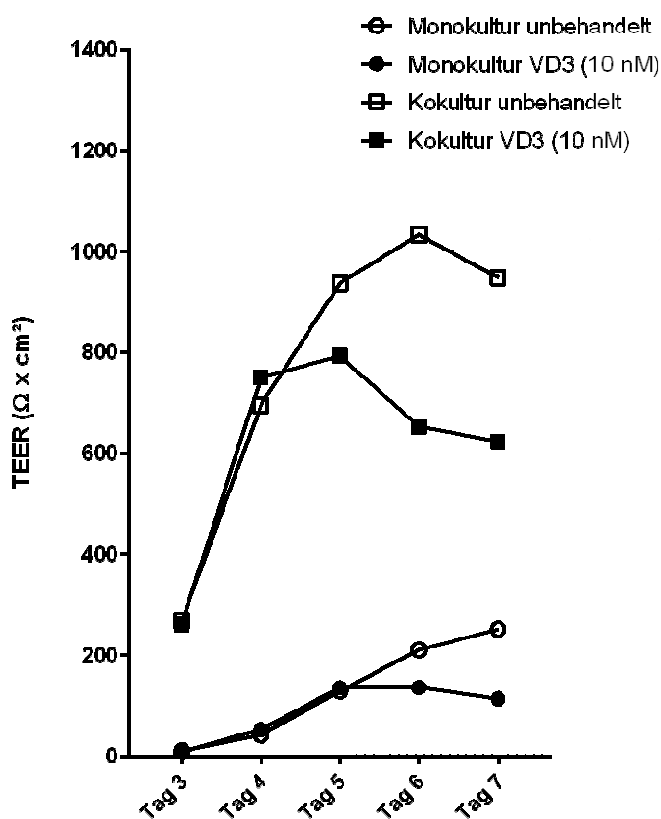
**Abb. 6:** Färbung (a) und Widerstände auf Transwells (b) und ECIS (c) von aus dem Lungengewebe isolierten Endothelzellen. a) blau: Nuclei, grün: CD31, rot: VE-Cadherin, Maßstab =  $100 \mu\text{m}$  b) 6 wells c) 8 wells



Zusätzlich wurde der Widerstand des Endothellayers mittels ECIS System erfasst. Dieses erlaubt eine kontinuierliche und sensitivere Messung der Impedanz des Zelllayers, bei der die Zellen nicht durch die Chopstickelektrode irritiert werden müssen. Die Endothelzellen zweier Passagen wurden unter gleichen Versuchsbedingungen wie in den Transwells auf Goldelektroden kultiviert. Hierbei ließen sich Widerstandswerte um  $500 - 1000 \Omega \times \text{cm}^2$  detektieren, die zum Ende der 7 tägigen Kulturdauer wie bei den Alveolarepithelkulturen unter Vitamin D3 niedriger ausfielen als in der Kontrollgruppe (siehe Abb. 6 c)).

## 4.4 Einfluss von Vitamin D3 auf die Primärzellen

### 4.4.1 Effekte von Vitamin D3 auf Barriere und Transdifferenzierung



**Abb. 7a: Einfluss der Vitamin D3 Behandlung auf den TEER.** Monokulturen: n=6, Kokulturen: n=3. Jeweils 12 Transwells. Aufgrund sehr heterogener Absolutwerte hier lediglich der Mittelwert. Für die Einzelwerte siehe Abb.7b

Der Einfluss von Vitamin D3 auf den Widerstand war aufgrund der sehr heterogenen Absolutwerte der Einzelspender schwer fassbar und nicht signifikant, jedoch zeichnete sich bei der Mehrheit der Spender überraschenderweise ein Trend zu niedrigeren TEER Werten unter Vitamin D3 ab. Dies stand im Gegensatz zu der reproduzierbaren TEER-Erhöhung bei den H441 Zellen in vorherigen Versuchen (siehe Abb.18 im Anhang). Außerdem konnte ein früheres Gipfeln des TEER unter Vitamin D3 beobachtet werden: Während die Kontrollkulturen den maximalen TEER in der Regel bis Tag 6 oder 7 hielten, fiel er in den mit Vitamin D3 behandelten Kulturen meist bereits an Tag 5 wieder ab (siehe Abb.7a+b).

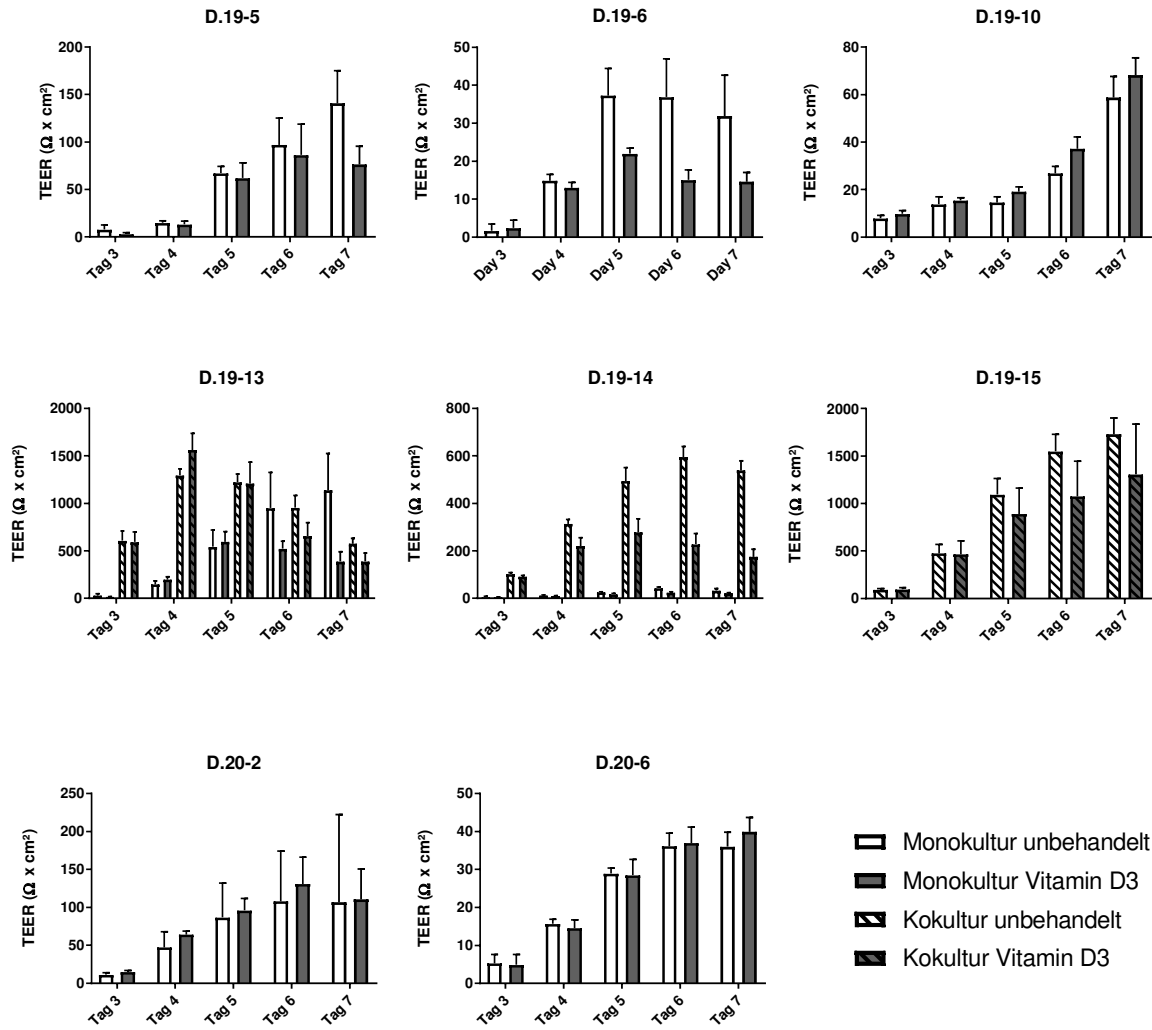
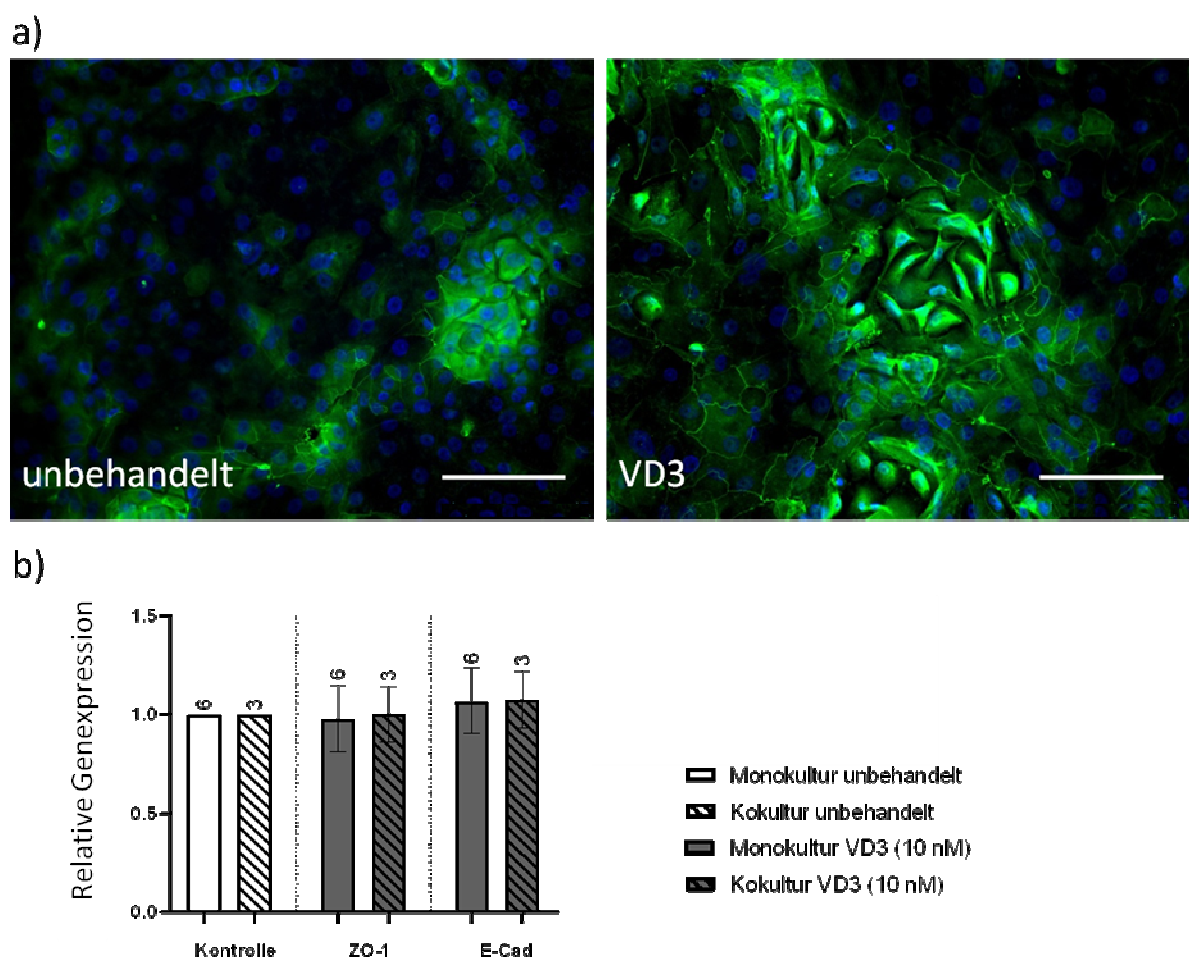
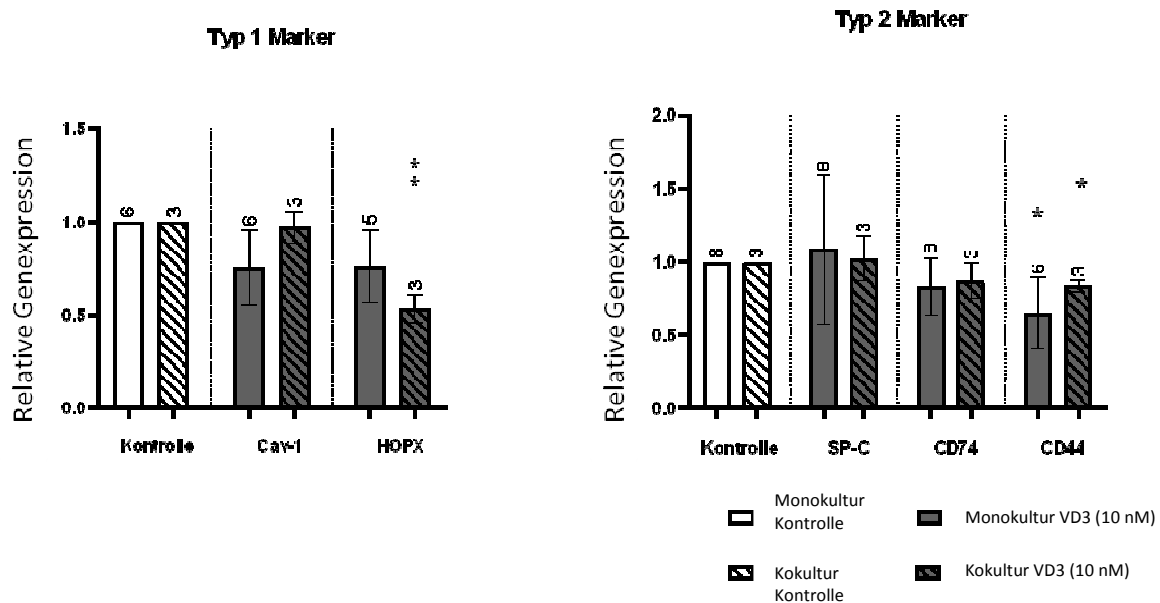


Abb.7b: TEER der Einzelspender. Jeweils 12 Transwells.

Als morphologisches Korrelat der Barriere wurde die Ausprägung der Tight Junctions mit- und ohne Vitamin D3 anhand immunhistochemischer Färbungen von ZO-1 verglichen. Hier zeigten sich zwei Effekte: 1.) in den flachen Typ 1 Arealen nahm die ZO-1 Intensität zu und es ließen sich bei gleicher Sensorempfindlichkeit des Mikroskops kontinuierlichere Bänder aus Tight Junctions zwischen den Typ 1 Zellen detektieren. 2.) Gleichzeitig nahm unter Vitamin D3 eine Population undifferenziert wirkender kleiner Zellen mit nicht-translozierten Tight Junctions (Anfärbung von ZO-1 nur diffus im Zytoplasma verteilt ohne Assoziation an die Plasmamembran) zu, die sich in Clustern zwischen den Typ 1 Zellen anordneten (siehe Abb. 8 a)). Auf mRNA Ebene ließ sich eine Änderung der Zellkontaktproteine ZO-1 und E-Cad nicht detektieren (siehe Abb. 8 b)).



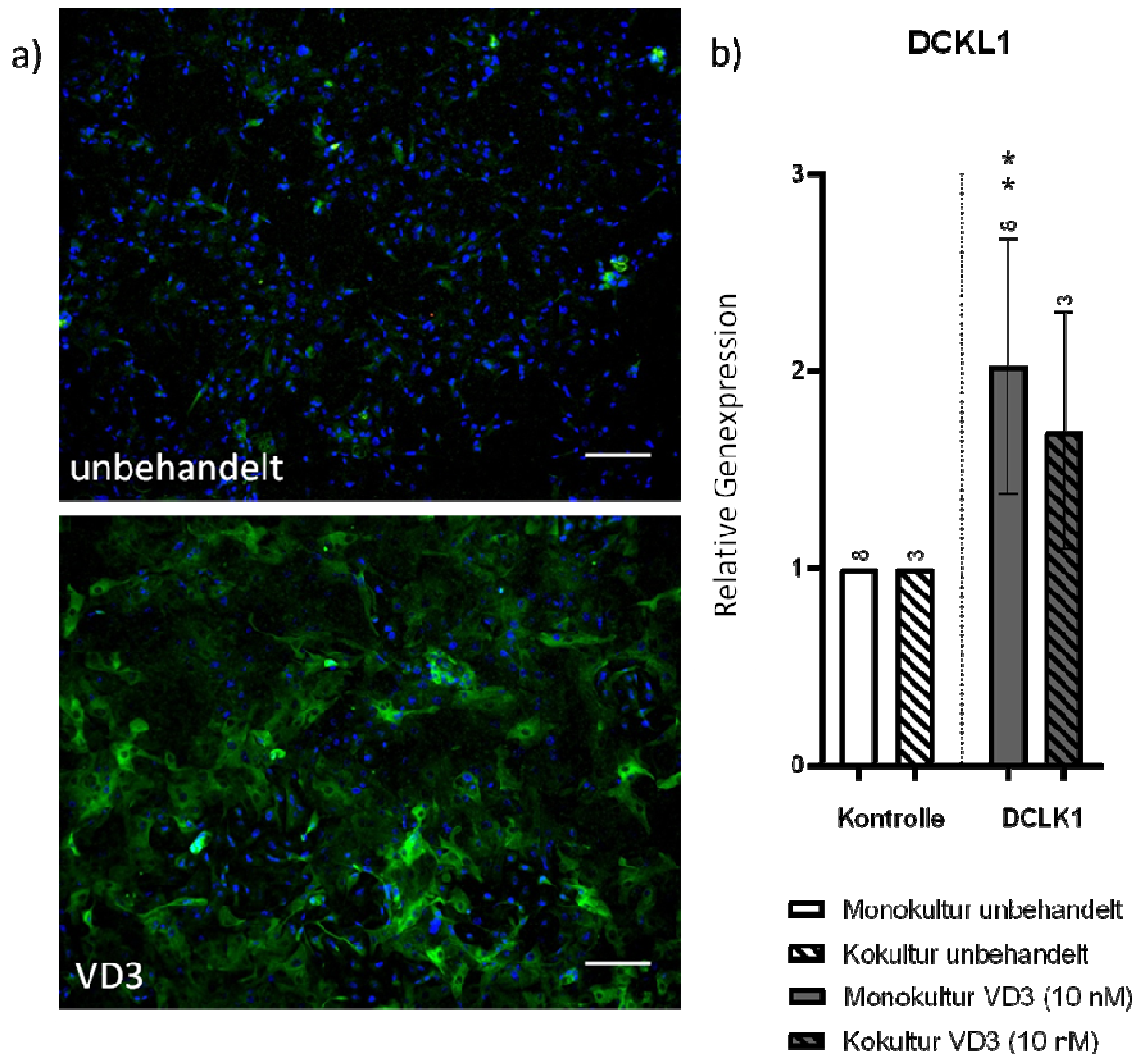
**Abb. 8: Ausbildung von Zellkontakten mit- und ohne Vitamin D3.** a) Immunhistochemische Färbung des Tight Junction Proteins ZO-1 in Monokultur. Unter Vitamin D3 zum einen vermehrt undifferenziert wirkende Zellen mit nicht-translozierten Tight Junctions (rechtes Bild in der Mitte), zum anderen stärkere Ausbildung von Tight Junctions in den flachen Typ 1 Arealen (rechtes Bild, z.B. links unten). blau: Nuclei, grün: ZO-1, Maßstab = 100  $\mu\text{m}$  b) Genexpression von ZO-1 oder E-Cadherin mit und ohne VD3. Monokulturen n=6, Kokulturen n=3. paired t-test. Die unbehandelten Kulturen stellen jeweils den Referenzwert von 1 dar.



**Abb. 9: Einfluss von Vitamin D3 auf die Genexpression von Typ 1 und Typ 2 Markern in Mono- und Kokultur an Tag 7.** Monokulturen:  $n \geq 6$ , Kokulturen  $n = 3$ . Die unbehandelten Kulturen stellen jeweils den Referenzwert von 1 dar. paired t-test \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$

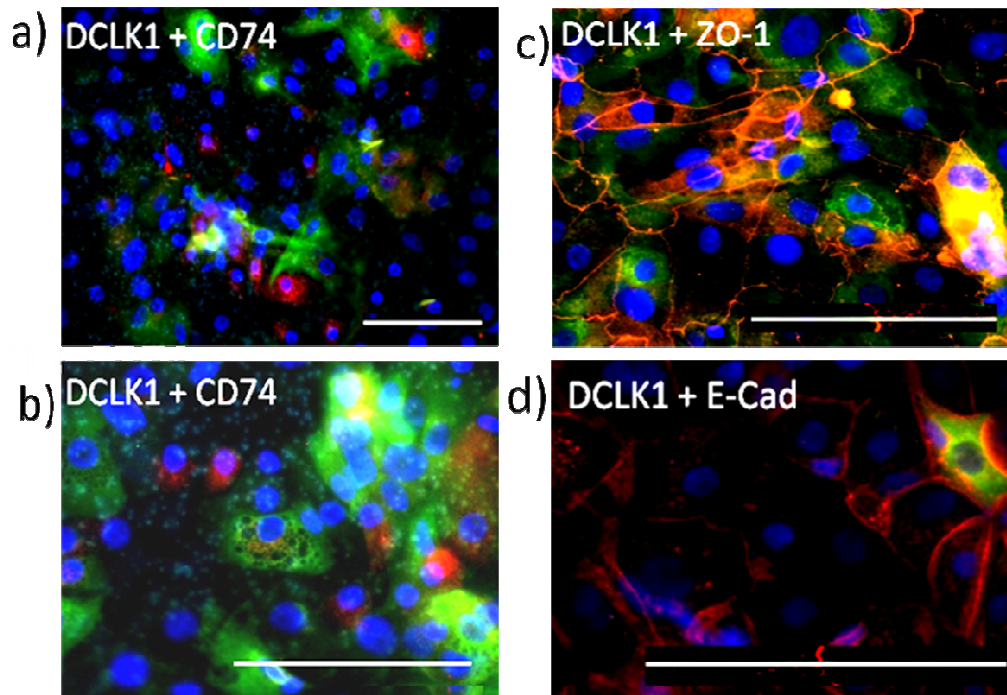
Auch mittels PCR wurden Marker erfasst, um die Transdifferenzierung von Typ 2 zu Typ 1 Zellen zu untersuchen. Die mit dem Vorliegen barrierebildender Typ 1 Zellen assoziierten Marker HOPX und Cav-1 (Fuchs et al., 2003; Ota et al., 2018) zeigten eine Abnahmetendenz unter Vitamin D3; HOPX in den Kokulturen signifikant mit  $p < 0,01$  (siehe Abb. 9). Die Typ 2 Marker CD74 und CD44 nahmen unter Vitamin D3 ebenfalls ab; für CD44 in Mono- und Kokulturen signifikant mit  $p < 0,05$  (siehe Abb. 9). Für den Typ 2 Marker SP-C ließ sich auf mRNA Ebene kein Effekt von Vitamin D3 feststellen. In Färbungen von SP-C zeigte sich jedoch bei der Hälfte der Mono- und Kokulturen eine starke Intensitätszunahme unter Vitamin D3 (siehe hierzu Abb.13 b)).

#### 4.4.2 Induktion von DCLK1 durch Vitamin D3



**Abb. 10: Induktion von DCLK1 durch Vitamin D3:** a) Färbungen in Monokultur an Tag 7. blau = Nuclei, grün = DCLK1, Maßstab = 100  $\mu$ m. b) mRNA Expression von DCLK in Mono- und Kokultur an Tag 7. Monokultur n=8, Kokultur n=3. Die unbehandelten Kulturen stellen jeweils den Referenzwert von 1 dar. paired t-test \*\*  $p < 0,01$

Sowohl in den Mono- als auch in den Kokulturen zeigte sich in der PCR eine reproduzierbare Induktion der DCLK1 durch Vitamin D3. In den Monokulturen war die Zunahme der mRNA Expression mit  $p < 0,01$  signifikant, in den Kokulturen zeigte sich ein eindeutiger Trend in allen Versuchen (vgl. Abb. 10 b)). In immunhistochemischen Färbungen von DCLK1 ließ sich der Eindruck einer Induktion durch Vitamin D3 bestätigen: unter Behandlung mit Vitamin D3 fanden sich mehr Zellen mit DCLK1 Expression als in der Kontrollgruppe, wobei die Intensität von DCLK1 in den einzelnen Zellen variierte (vgl. Abb. 10 a) sowie Abb.13 c)).



**Abb. 11: Kofärbungen zur Charakterisierung der DCLK1 exprimierenden Zellen.** a) + b) Nähe zu Typ 2 Zellen an Tag 7 und Bürstenzell- typische zytoplasmatische Vesikel c) Bedeckung durch Ausläufer von Typ 1 Zellen d) Epithelialer Charakter mit Anfärbung von E-Cadherin. blau: Nuclei, grün: DCLK1, rot: CD74 bzw. ZO-1 bzw. E-Cad, Maßstab = 100  $\mu$ m.

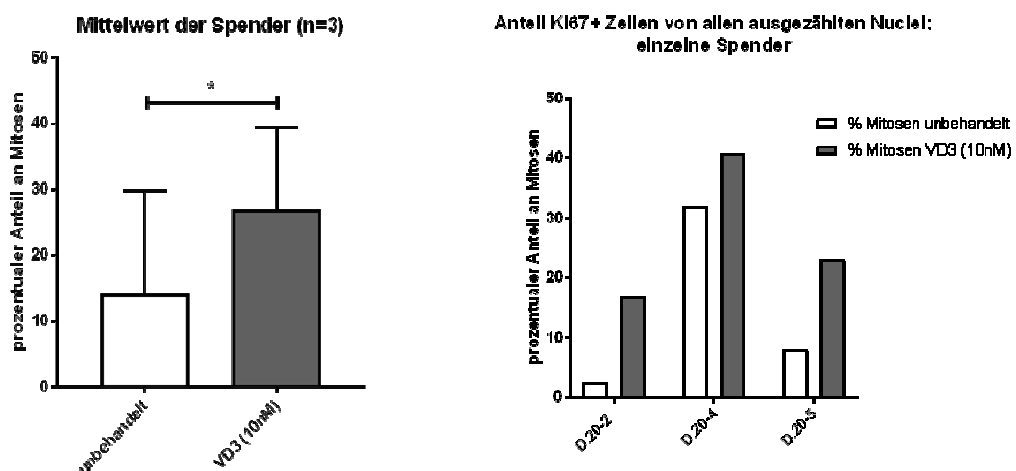
Um die DCLK1 exprimierenden Zellen weiter zu charakterisieren, wurden Kofärbungen von DCLK1 mit verschiedenen Markern an Monokulturen vorgenommen: CD74 als Typ 2 Marker, E-Cadherin als Indikator epithelialen Ursprungs und ZO-1 als Indikator für eine potenzielle Barrierefunktion. Hierbei zeigten die DCLK1 exprimierenden Zellen sowohl die Ausbildung von epithelalem Cadherin (Abb. 11 d)), als auch eine zirkumferentielle Anfärbung von Tight Junctions. Kofärbungen mit CD74 offenbarten an Tag 3 teils doppelt positive Zellen, an Tag 7 die Aufteilung in entweder DCLK1- oder CD74 positive Zellen, die sich in räumlicher Nähe zueinander anordneten ( vgl. Abb. 11 a)),. Außerdem ließen sich Charakteristika beobachten, die für Bürstenzellen typisch sind: zytoplasmatische Vesikel als Zeichen von Glykogenspeicherung (Abb. 11 b)), und die Bedeckung durch Ausläufer von Typ 1 Zellen (Abb. 11 c)).

#### 4.4.3 Zunahme der Proliferation unter Vitamin D3

Die bis dahin vorliegenden Ergebnisse waren Grundlage für eine Hypothese, die die weiteren Experimente leitete: Unter Vitamin D3 ließ sich ein Trend zu niedrigeren TEER Werten beobachten. Gleichzeitig nahm unter Vitamin D3 eine Population morphologisch undifferenziert wirkender Zellen zu, die in ZO-1 Färbungen aufgrund nicht-translozierter Tight Junctions keine Barriere zu bilden schienen. Außerdem bewirkte Vitamin D3 eine reproduzierbare Induktion von DCLK1, einer Kinase in

Bürstenzellen, die vermutlich stammzellmodulierend und proliferativ wirkt (Middelhoff et al., 2017). Möglicherweise regte Vitamin D3, über DCLK1 Induktion vermittelt, die Proliferation nicht-barrierebildender Stamm- oder Progenitorzellen in dem Primärzellisolat an, was die beobachtete Abnahmetendenz des TEER unter Vitamin D3 erklären könnte.

Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde in Monokulturen von drei weiteren Spendern Ki67 als Indikator für Proliferationsaktivität gefärbt und ausgezählt. Dafür wurde pro Spender und Behandlungsgruppe in drei nicht überlappenden Bildausschnitten (Fläche 706 500  $\mu\text{m}^2$ ) der prozentuale Anteil der Ki67 markierten Zellkerne an allen Zellkernen erfasst und hieraus der Mittelwert als Proliferationsindex des einzelnen Spenders berechnet. Das Ergebnis offenbarte für jeden der drei Spender eine um 10 - 15 % höhere Proliferationsrate unter Vitamin D3 mit Ausgangswerten, die sich spenderabhängig zwischen 5 % und 30 % aller Nuclei bewegten (siehe Abb. 12).



**Abb. 12: Anteil Ki67 markierter Nuclei in immunhistochemischen Färbungen von Monokulturen mit- und ohne Vitamin D3 an Tag 7.** Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Ki67 markierten Zellkernen von allen Nuclei. **links:** Mittelwert aus drei Spendern paired t-test \*  $p < 0,05$ . **rechts:** Proliferationsindex der Einzelspender.

In Kofärbungen von DCLK1 mit MUC5B als Marker bronchialer Basalzellen und  $\beta$  Tubulin als Stammzellmarker wurde die Beziehung der DCLK1 positiven Zellen mit diesen Zelltypen untersucht (vgl. Abb.13 d) und e)). Dabei zeigte sich in beiden Färbungsmodi ein ähnliches Phänomen, das eine Stammzellnischen-modulierende Funktion der DCLK1 exprimierenden Zellen weiter untermauerte: Die DCLK1 exprimierenden Zellen ordneten sich zirkulär um Zellcluster von kuboidalen  $\beta$  Tubulin- bzw. MUC5B exprimierenden Zellen herum an. Die so gruppierten Zellinseln innerhalb der flachen

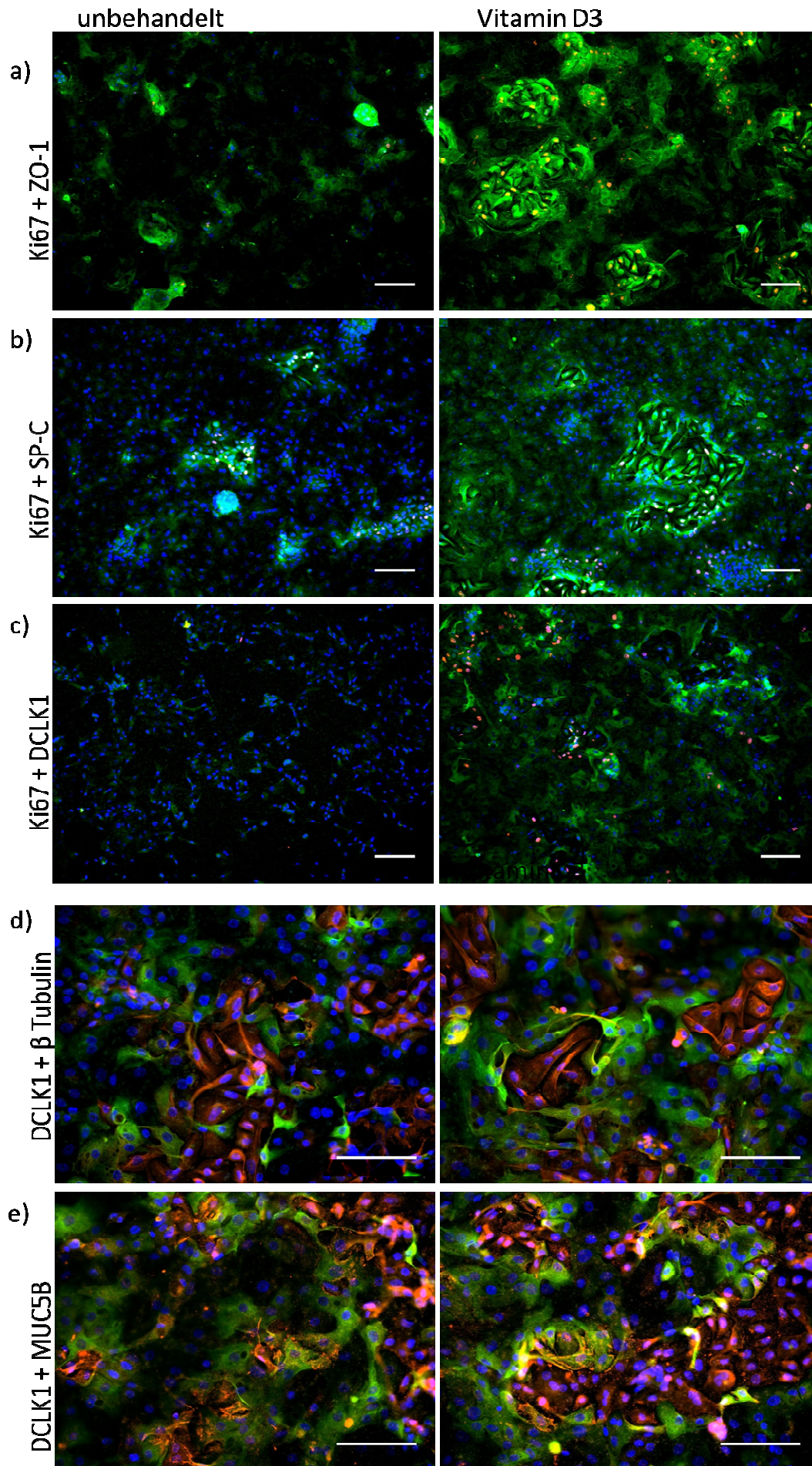
Typ 1 Areale wirkten größer unter Vitamin D3. Die nur DCLK1 positiven Zellen in der Peripherie der Zellinseln zeigten typische Bürstenzellmorphologie mit Vesikel. Zudem fanden sich jeweils im Grenzbereich zwischen Clustermitte und umgebenen DCLK1 exprimierenden Zellen doppelt positive Zellen mit DCLK1 Expression im Hauptkörper und  $\beta$  Tubulin, respektive MUC5B, in den Ausläufern. Diese Ausläufer waren teilweise zwischen die kuboidalen Zellen in der Mitte der Zellcluster gestreckt.

#### 4.4.4 Charakterisierung der proliferierenden Zellen

Um zu überprüfen, ob es sich bei den proliferierenden Zellen um die beobachteten undifferenzierten Zellcluster handelte, wurden Kofärbungen von Ki67 mit DCLK1 und ZO-1 vorgenommen. Diese zeigten ein Bild, das der Clusterformation in den MUC5B- und  $\beta$  Tubulinfärbungen ähnelte: Die DCLK1 positiven Zellen gruppieren sich um Zellinseln mit Ki67 Markierungen herum bzw. reichen mit Ausläufern zwischen diese und assoziierten sich in räumlicher Nähe (siehe Abb.13 c)). Viele der Ki67 positiven Zellen zeigten eine undifferenzierte Morphologie und ZO-1-Anfärbung lediglich im Zytoplasma, nicht aber an den Zellgrenzen, was auf das Vorliegen nicht-translozierter Tight Junctions und ausbleibende Barrierebildung hinweist. Die Anzahl dieser Zellen war in den mit Vitamin D3 behandelten Monokulturen höher, die Zellcluster größer (vgl. Abb.13 a) und b)). Die DCLK1 exprimierenden Zellen selbst proliferierten selten, vereinzelt ließen sich jedoch auch hier Ki67 Markierungen detektieren (siehe Abb.13 c)).

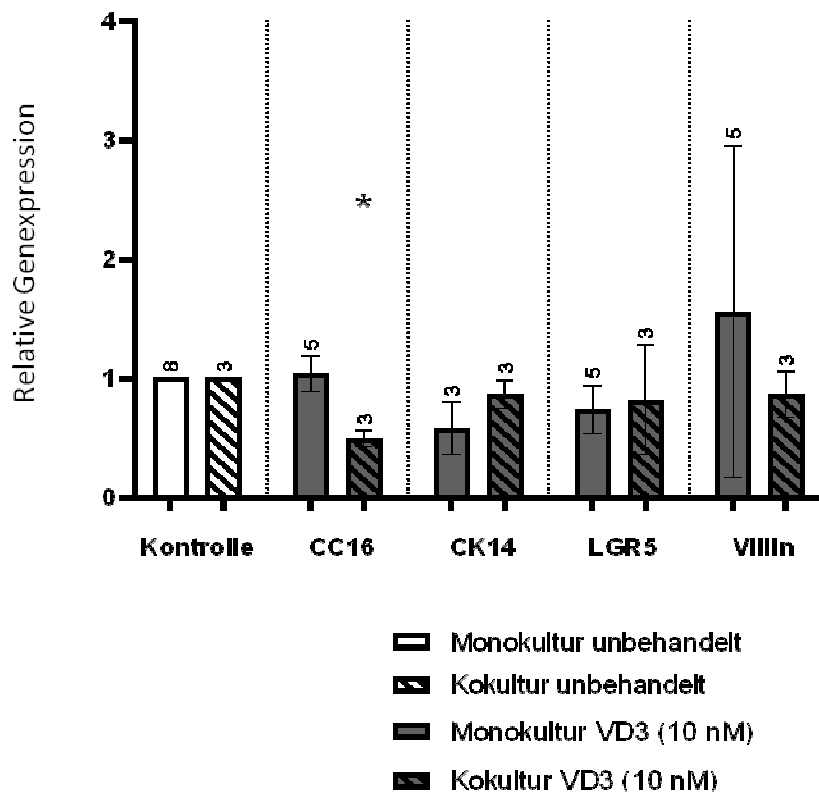
In Kofärbungen von DCLK1 und CD74, dem Marker einer als hochproliferativ geltenden Typ 2 Zell-Subpopulation, hatten DCLK1 positive Zellen sich in ähnlicher Weise an die Typ 2 Zellen assoziiert, wie sie es nun an die proliferierenden Zellen taten. Um die Hierarchie und Identität der proliferierenden Zellen im Verhältnis zu Typ 2 Zellen zu untersuchen, die bekanntermaßen ebenfalls in den Zellnachschub des Alveolarepithels involviert sind, wurden nun Kofärbungen von Ki67 und SP-C in Monokulturen vorgenommen. Tatsächlich zeigte ein Großteil der SP-C positiven Zellen Proliferationsaktivität und ihr Anteil nahm unter Vitamin D3 sichtbar zu. Jedoch proliferierten vereinzelt auch andere Zellen, die keine SP-C Anfärbung aufwiesen (siehe Abb.13 b)).





**Abb. 13:** Kofärbungen von Ki67 mit DCLK1, ZO-1 und SP-C (a-c), sowie Kofärbungen von DCLK1 mit MUC5B und  $\beta$  Tubulin (d-e) in Monokultur mit- und ohne Vitamin D3 an Tag 7.  
 blau: Nuclei, rot: Ki67 /  $\beta$  Tubulin / MUC5B, grün: DCLK1 / ZO-1 / SP-C. Maßstab = 100  $\mu$ m

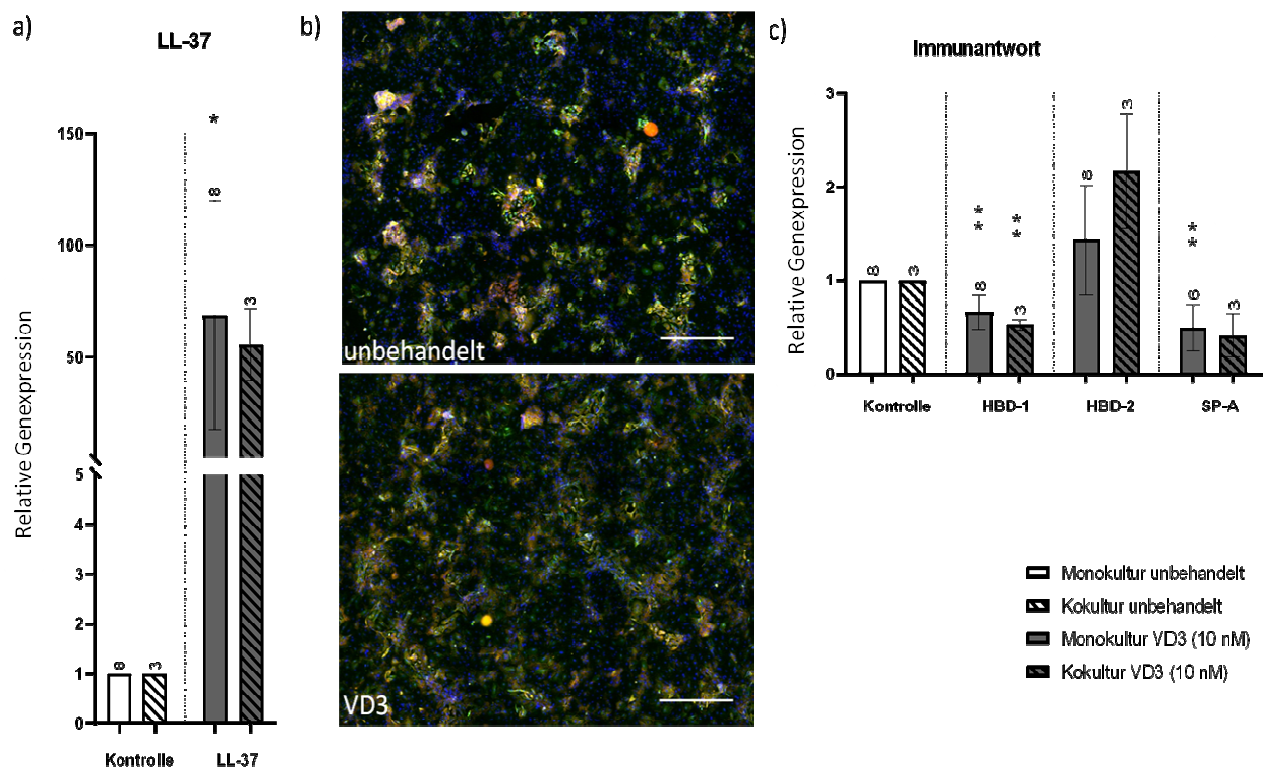
Auch mittels PCR wurde ein möglicher Einfluss von Vitamin D3 auf verschiedene Bronchialepithel- und Stammzellmarker in Mono- und Kokultur untersucht (siehe Abb. 14). Die morphologisch beobachtete Zunahme von Vorläufer-/Stammzellen spiegelte sich hier jedoch nicht wider. LGR5, ein Oberflächenrezeptor, der auf verschiedenen und unter anderem von Vitamin D3 modulierten Stammzellpopulationen beschrieben wird (Barker et al., 2013; Peregrina et al., 2015) fiel in den Monokulturen sogar andeutungsweise ab. Auch der Keulenzellmarker CC16 (scgb1a1) fiel unter Vitamin D3 signifikant ab und CK14, welches regenerative Basalzellen der Atemwege markiert (Ficial et al., 2014; Kumar et al., 2011), zeigte eine Abnahmetendenz. Lediglich die Expressionslevel von Villin, einem Marker der stammzellmodulierenden Bürstenzellen, zeigten in den Monokulturen eine geringe, jedoch nicht signifikante Zunahme.



**Abb. 14: Veränderung der mRNA Expression verschiedener Stamm- und Progenitorzellmarker unter Vitamin D3 an Tag 7.** Monokulturen n=5 (CK14 n=3), Kokulturen n=3. Die unbehandelten Kulturen stellen jeweils den Referenzwert von 1 dar. paired t-test \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$

#### 4.4.5 Effekt von Vitamin D3 auf die Immunhomöostase

Sowohl in den Mono- als auch in Kokulturen zeigte sich eine deutliche Induktion des Cathelicidins LL-37. In den Monokulturen stieg die mRNA Expression im Durchschnitt auf das 65-fache, in den Kokulturen auf das 50-fache der Kontrollkulturen an. Nach Bonferroni-Korrektur zeigten sich die Ergebnisse nur für die Monokultur signifikant mit  $p < 0,05$ . In Färbungen zeigte sich unter Vitamin D3 ein diffuses Verteilungsmuster von LL-37 über das Zelllayer, während sich in den Kontrollkulturen die Anfärbung von LL-37 in den kuboidalen Zellarealen und nur in vereinzelt Typ 1 Zellen konzentrierte (siehe Abb.15 a) und b)).



**Abb. 15: Einfluss von Vitamin D3 auf die epitheliale Immunantwort. Tag 7:** a) starke und signifikante Induktion von LL-37 in der PCR. Monokultur n=8, Kokultur n=3 b) Färbung von LL-37 in großflächiger Übersicht. blau = Nuclei, rot = ZO-1, grün = LL-37, Maßstab = 100  $\mu\text{m}$ . c) PCR der  $\beta$  Defensine und von SP-A. Monokultur n=8 (SP-A n=6), Kokultur n=3. Die unbehandelten Kulturen stellen jeweils den Referenzwert von 1 dar. paired t-test \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$

Die mRNA Konzentration der  $\beta$  Defensine entwickelte sich unterschiedlich. HBD-1 nahm im Vergleich zu den Kontrollkulturen signifikant ab (mit  $p < 0,01$  sowohl in Mono- als auch in Kokulturen), HBD-2 hingegen zeigte in beiden Kulturmodi eine leichte Zunahme. Das Surfactantprotein SP-A, das neben einer negativen Rückkopplung der Surfactantproduktion auch immunologische Funktionen hat, und von Typ 2 Zellen und Keulenzellen sezerniert wird (Al-Qahtani et al., 2019; Yamazoe et al., 2008), fiel unter Vitamin D3 ab; in den Monokulturen signifikant mit  $p < 0,01$  (siehe Abb.15 c)).

#### **4.5 Einfluss von SARS-CoV 2 Proteasen auf HPMEC**

Der Ausbruch der weltweiten Coronapandemie fiel mitten in die fast abgeschlossenen Experimente der vorliegenden Arbeit. Humane pulmonale Primärzellen stellten in dieser Zeit eine rare Quelle für schnellen und sicheren Erkenntnisgewinn dar, um die Wirkweise des Virus zu verstehen und therapeutische Angriffspunkte zu identifizieren. Neben den bereits vorliegenden Hinweisen, dass Vitamin D3 in die Immunhomöostase des Alveolarepithels einzugreifen scheint, war in diesem Kontext vor allem die Barriere der alveolokapillären Membran interessant, da inzwischen bekannt war, dass die Letalität einer Infektion mit SARS-CoV-2 zentral mit einer durch ARDS zusammenbrechenden Lungenfunktion zusammenhängt, worin die Barrieredisruption einen entscheidenden Eskalationsschritt markiert. Die Barriere der alveolokapillären Membran wiederum schien maßgeblich von der Interaktion mit den Endothelzellen abzuhängen, wie die TEER Werte der Kokulturen bis dahin gezeigt hatten. Um einen möglichen Einfluss von SARS-CoV-2 auf das Endothel der Lunge zu detektieren, und weil isolierte endotheliale Primärzellen im Gegensatz zum Alveolarepithel über mehrere Passagen kultivier- und vermehrbar sind, wurden die für diese Arbeit isolierten HPMEC genutzt, um sie mit drei Hauptproteasen des Virus zu versetzen. Mittels LC-MS konnten so über 300 Angriffspunkte des Virus identifiziert werden (Koudelka et al., 2021), was eine breite Basis für die weitere Forschung auch anderer Arbeitsgruppen legte.



## 5 Diskussion

### 5.1 Etablierung des Kultursystems

Die alveolokapilläre Membran konnte im Transwell-System auch mit Primärzellen erfolgreich modelliert werden. Die isolierten Primärzellen bildeten auf den Transwell-Filtern ein konfluentes Epithel aus, das morphologisch die Transdifferenzierung von Typ 2 zu Typ 1 Zellen vollzog und an Tag 7 eine heterogene, organisierte Zellkomposition darstellte. Diese war in der Lage, einen ansteigenden transepithelialen Widerstand und somit eine parazelluläre Barriere aufzubauen. Die Widerstände der Monokulturen blieben hinter der erwarteten Höhe zurück. Dies konnte auf ein defektes Enzym im Isolationsprozess zurückgeführt und in folgenden Versuchen behoben werden. Die Widerstände der Monokulturen sind daher hier nur eingeschränkt beurteilbar, wenngleich sie demselben Trend wie die der Kokulturen folgten. Die Kokultivierung mit HPMEC stabilisierte und beschleunigte die epitheliale Integrität und Ausreifung, was sich in höheren TEER-Werten und einer schnelleren Ausdifferenzierung des apikalen Zelllayers äußerte und den bisherigen Konsens der Literatur bestätigt (Fuchs et al., 2003; Maria Iris Hermanns et al., 2009a, 2010; L. Wang et al., 2013). Die Primärkultur aus humanen Lungenzellen kann somit als im Vergleich zu H441 authentischeres Modell der alveolokapillären Membran verwendet werden. Gegebenenfalls waren die sehr heterogenen absoluten TEER Werte, sowie die unterschiedliche Reife des Epithels an Tag 3 durch die individuellen Spendervoraussetzungen mitbedingt. Alter und Lebensgewohnheiten (z.B. Nikotinabusus, medikamentöse Vorbelastung, kardiopulmonale Erkrankungen) des Patienten, sowie Umstände und Ort der Gewebeentnahme (OP-Dauer, Ischämiezeit, Lungensegment, zentrale oder periphere Entnahmestelle) können sich hier auf den Fibrosegrad des Gewebes und das Regenerationspotenzial der Zellen ausgewirkt haben.

Die Genexpression der Typ 2 Marker spiegelt vermutlich mehrere Effekte eines dynamischen Systems wider: Während die Abnahme der Typ 2 Marker SP-C und CD74 mit der morphologisch beobachteten Transdifferenzierung kohärent ist, könnte die Zunahme von CD44 auf die Proliferation einer Typ 2-Subpopulation hinweisen. CD44 wird als Oberflächenmarker einer hochproliferativen Untergruppe der Typ 2 Zellen beschrieben, die für Regeneration zuständig ist, und fungiert außerdem als membranständiger Rezeptor für die Verankerung in der extrazellulären Matrix (Q. Chen et al., 2021). Die Primärzellen erfahren durch den Isolationsprozess mit der Herauslösung aus dem Zellverbund, der Exposition zu Enzymen und Percoll, intermittierend abgeschnittener Nährstoffversorgung und mechanischer Belastung ein massives Trauma, das möglicherweise einen starken Regenerationsreiz setzt. Dieser könnte die Proliferation der CD44 exprimierenden Typ 2 Subpopulation innerhalb des Typ 2 Pools angeregt haben. Diese Teilfunktion würde mit der in der Literatur zunehmenden

Evidenz, dass es sich bei Typ 2 Zellen nicht um einen definitiven Zelltyp, sondern vielmehr um eine in sich heterogene Population mit verschiedenen Funktionen handelt, übereinstimmen (Q. Chen et al., 2021; Marsh et al., 2009; Treutlein et al., 2014).

Im Kulturverlauf konnte außerdem ein Hochwachsen kuboidaler Zellen beobachtet werden, die nicht alle SP-C exprimierten und aufgrund ihrer Morphologie am ehesten mitisolierte Bronchial- oder Progenitorzellen waren. Sie formierten sich mit den Typ 2 Zellen zu teils mehrschichtigen Inseln innerhalb der flachen Typ 1 Areale und waren von DCLK1 positiven Zellen umgeben. CK14 als Marker bronchialer Basalzellen (Kumar et al., 2011) nahm in der PCR sowohl in Mono- als auch in Kokultur über den Kulturverlauf zu, was die Vermutung, dass Bronchialepithelzellen mitisoliert wurden und sich in der Kultur etablieren konnten, zu bestätigen scheint. CK14 exprimierende Basalzellen haben, insbesondere nach Verletzung, regeneratives Potenzial für die Alveolen (Ficial et al., 2014), sodass eine Zunahme dieser Zellen ebenfalls auf Regenerationsbestrebungen des kultivierten Epithels hinweist. CC16, ein Marker für Keulenzellen (ehemals Clarazellen), zeigte sowohl in Mono- als auch in Kokultur eine deutliche und signifikante Abnahme. Keulenzellen kommen in den Bronchioli terminales vor und gelten als Reserve für den alveolären Zellersatz. Sie können zu Typ 1 und Typ 2 Zellen differenzieren (Zheng et al., 2017). Es ist denkbar, dass das oben beschriebene Isolationstrauma mitisolierte Keulenzellen zur Ausdifferenzierung anregte, wodurch die Expression von CC16 herunterreguliert wurde.

Als Indikatoren der epithelialen Immunreaktion zeigte eine Abnahme von SP-A in Monokultur und eine Zunahme von HBD-1 in Mono- und Kokultur. Das Surfactantprotein SP-A kann über negative Rückkopplung die Surfactantproduktion hemmen (Lykkedegn et al., 2015a). Die Abnahme von SP-A kann somit Zeichen der nach der Aussaat anlaufenden Surfactantproduktion sein. HBD-1 wird von alveolären Epithelzellen konstitutiv exprimiert und hat als  $\beta$  Defensin sowohl direkte antimikrobielle Effekte, als auch immunmodulatorische Eigenschaften. Die genauen Mechanismen sind komplex und können kontextabhängig pro- oder antiinflammatorisch sein (Aarbiou et al., 2002; Hiemstra, 2007; da Silva et al., 2017). Die verstärkte Expression von HBD-1 im Kulturverlauf weist darauf hin, dass der Isolationsprozess Auslöser einer epithelialen Immunreaktion ist, was gleichzeitig über das Kultursystem aussagt, dass eine Repräsentativität für ruhendes Alveolarepithel in vitro nur eingeschränkt gegeben ist.

Insgesamt konnte eine barrierebildende, konfluente Alveolarepithelkultur mit Typ 2 und Typ 1 Zellen etabliert werden, deren Dynamik im Zeichen ablaufender Reparaturprozesse nach dem Isolationstrauma zu interpretieren ist. Das apikale Epithel stellt dabei mit einer in sich heterogenen Typ 2 Zell-Population, transdifferenzierenden Zellen und verschiedenen Stamm- und Bronchialzellen

eine heterogene und äußerst dynamische Zellpopulation dar, die ergänzend zu den Vorversuchen an H441 Zellen ein authentisches Abbild der alveolären Homöostase liefert.

## 5.2 Effekte von Vitamin D3 auf die Barriere

Unter Vitamin D3 zeichnete sich überraschenderweise ein Trend zu niedrigeren TEER Werten gegenüber der Kontrollgruppe ab, was im Gegensatz zu der reproduzierbaren TEER-Erhöhung bei den H441 Zellen stand. In den Zellkontaktfärbungen ließen sich zwei Phänomene beobachten: zum einen eine Zunahme der Tight Junctions in den flachen Typ 1 Arealen, zum anderen eine Zunahme kuboidaler, nicht barrierebildender Zellen. Auf mRNA Ebene veränderte sich die Expression der Zellkontaktbestandteile ZO-1 und E-Cad nicht. Das Genexpressionslevel in der PCR repräsentiert hier jedoch das gesamte Zelllayer, sodass kein Rückschluss auf die Expression in den einzelnen Zelltypen möglich ist. Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass Vitamin D3 direkten Einfluss auf die Ausbildung von Tight Junctions hat. Knockoutmausmodelle des Vitamin D Rezeptors (VDR) führten zu erhöhter alveolärer Permeabilität und kompromittierten Zellkontakten (H. Chen et al., 2018; Shi et al., 2016). An einer humanen Darmzelllinie konnte unter Vitamin D die vermehrte Ausbildung von Tight Junctions beobachtet werden. Eine Beteiligung der Histondeacetylase HDAC11 an den Regulationsmechanismen wird hier vermutet. Diese blockiert die Promoterregionen von Tight Junction Proteinen und wird durch Bindung des VDR wieder abgelöst (Feng-HuaLiu et al., 2017), sodass Vitamin D die Transkription von Tight Junctions freigibt. Die tatsächliche Ausbildung von Tight Junctions wird jedoch vor allem posttranslational durch Internalisierung versus Translokation an die Zellmembran reguliert (Rajasekaran et al., 1996; Schneeberger et al., 2004). Die Färbungen der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass Vitamin D3 in die Ausbildung von Tight Junctions in Typ 1 Zellen im Sinne einer Translokation an die Zellmembran fördert.

Diese Beobachtung stand zunächst im Widerspruch zu den tendenziell niedrigeren TEER Werten unter Vitamin D3. Gleichzeitig wurde jedoch eine Zunahme kuboidaler Zellen beobachtet, die eine starke, aber nur zytoplasmatische Anfärbung von ZO-1 aufwiesen, deren Tight Junctions also nicht-transloziert vorlagen und die folglich keine Barriere bilden dürften. Diese Zellen zeigten unter Vitamin D3 verstärkte Proliferationsaktivität. Vitamin D3 scheint demnach unterschiedliche Effekte zu haben, die sich gegenläufig auf den TEER auswirken: Neben der vermehrten Translokation von Tight Junctions in Typ 1 Zellen trägt es zur Vermehrung nicht-barrierebildender Zellen bei. Welcher der beiden Effekte im TEER sichtbar wird, könnte spenderspezifisch davon abhängen, in welchem Differenzierungsstadium sich die Zellen an Tag 3 befinden und welche Subtypen und Proliferationsaktivität das Isolat aufweist: liegen schon viele Typ 1 Zellen vor, die nach in vitro Transdifferenzierung als postmitotisch beschrieben werden (Wang & Hubmayr, 2011), wird die Barriere durch Translokation der Tight Junctions gestärkt. Liegen noch viele proliferationsfähige Typ 2

Zellen vor oder ist der Anteil mitotischer Vorläuferzellen hoch, überwiegt die Vermehrung nicht-barrierebildender Zellen. Bei den H441 Zellen, die als Krebszelllinie ein ohnehin dysreguliertes Proliferationsverhalten haben, dominiert vermutlich der erste Effekt, sodass Vitamin D3 hier stets eine Zunahme des TEER bewirkte.

### 5.3 Induktion der DCLK1

Vitamin D3 bewirkte in allen Monokulturen eine signifikante Induktion der Double-cortin-like-Kinase 1 (DCLK1). Nach Wissen der Autorin ist eine Vitamin D-abhängige Induktion der DCLK1 an primären Lungenzellen bisher noch nicht beschrieben worden. Die Induktion der DCLK1, die an den H441 Zellen beobachtet wurde (Xiong et al., 2023), konnte somit bestätigt werden. DCLK1 Expression ist typisch für Bürstenzellen, die in der Lunge auch als 'tuft cells' bezeichnet werden (Gerbe et al., 2011; Middelhoff et al., 2017). In den Färbungen wiesen die DCLK1 exprimierenden Zellen Charakteristika von Bürstenzellen auf: zytoplasmatische Vesikel als Zeichen von Glykogeneinlagerung, räumliche Nähe zu Typ 2 Zellen und die Bedeckung durch Ausläufer von Typ 1 Zellen (Hijiya et al. 1977; Sbarbati et al. 2005), sodass davon auszugehen ist, dass es sich in den Primärkulturen um diesen Zelltyp handelt. Der DCLK1 bzw. den DCLK1-exprimierenden Bürstenzellen werden chemosensitive, immunmodulatorische und barrierestärkende Eigenschaften zugeschrieben, die alle den klinisch protektiven Effekt von Vitamin D3 vermitteln könnten:

Als Bitterrezeptoren bewirken sie eine protektive Apnoe, beschleunigen den Zilienschlag und leiten eine Bronchodilatation ein (O'Leary et al., 2019). Damit wird die Reaktion der Lunge auf Antigenexposition moduliert und die Atemwegsclearance positiv beeinflusst. Vitamin D3 wird zudem ein protektiver Effekt gegenüber der Entwicklung von Asthma und COPD zugeschrieben (Grant et al., 2020; Shi et al., 2016). Es ist denkbar, dass die Induktion DCLK1 exprimierender Bürstenzellen hierbei eine Rolle spielt, indem diese der Obstruktion und Hyperreagibilität durch Dilatation und verbesserte Atemwegsclearance entgegenwirken.

Auch an der immunmodulatorischen Wirkung von Vitamin D3 könnten Bürstenzellen beteiligt sein. Für Vitamin D3 selbst wird angenommen, dass es die TH2-Antwort gegenüber der Aktivität von TH1 und TH17 Zellen fördert (Chirumbolo et al., 2017), sodass im Gegensatz zur Makrophagenaktivierung durch TH1 Zellen die Aktivierung von B-Zellen durch TH2 Zellen eintritt, was in der Lunge vermutlich schonender und weniger destruktiv wirkt. Auch Bürstenzellen können durch Zytokinausschüttung die Rekrutierung von Immunzellen modulieren (O'Leary et al., 2019) und außerdem die Freisetzung des schleimhautschützenden und immunregulatorischen Cathelicidins LL-37 in epithelialen Nachbarzellen induzieren (O'Leary et al., 2019). Ein Teil des protektiven Effektes von Vitamin D3 könnte also durch



Induktion der Bürstenzellen vermittelt sein, zur Glättung der Immunantwort beitragen und sich hierüber schützend auf die Lunge auswirken.

Die DCLK1 hat zudem direkte Effekte auf die parazelluläre Barriere von Epithelien. DCLK1-Knockoutmodelle führten zum Zusammenbruch der intestinalen bzw. pulmonalen Barriere (May et al., 2014; Middelhoff et al., 2017; Yi et al., 2018). Durch Regulation der Mikrotubuluspolymerisation ist die DCLK1 eng in Migrations- und Adhäsionsprozesse involviert (O’Leary et al., 2019), wodurch auch die Ausprägung von Zellkontakten beeinflusst wird. In Vorversuchen an H441 Zellen ging ein erhöhter TEER mit stärkerer DCLK1 Expression einher, eine Hemmung von DCLK1 auf Proteinebene führte jedoch paradoxerweise zur Stärkung der epithelialen Barriere, was auf einen komplexeren Regulationsmechanismus hinweist. Eine Beteiligung der DCLK1 am barrierefördernden Effekt von Vitamin D3 ist somit denkbar, der genaue Mechanismus jedoch noch fraglich.

Neben den chemosensorischen, immunmodulatorischen und barrierestärkenden Eigenschaften, liegt ein weiterer Fokus derzeitiger Forschung auf der Regeneration von Epithel, in der die DCLK1 durch Stammzellmodulation eine essentielle Rolle zu spielen verspricht. DCLK1 exprimierende Bürstenzellen sind an der Schaffung des Mikromilieus von Stammzellnischen vermutlich maßgeblich beteiligt (Middelhoff et al., 2017). Ein eigener Stammzellcharakter bzw. eine fakultative Dedifferenzierung der Bürstenzellen zur Repopulation von Stammzellpools wird ebenfalls diskutiert (O’Leary et al., 2019). Diese proliferativen Eigenschaften bergen zudem Entartungspotenzial, was die DCLK1 in verschiedenen Tumorentitäten als potenziellen Tumorstammzellmarker ins Gespräch bringt (Chandrakesan et al., 2017; Lu et al., 2021; C. B. Nguyen et al., 2016; Omori et al., 1998; Westphalen et al., 2016). In der vorliegenden Arbeit veränderte sich die Zellzusammensetzung unter Vitamin D3 hin zu proliferierenden Subpopulationen bzw. Vorläuferzellen. Eine Vermittlung dieses Effektes durch die DCLK1 könnte dem zugrunde liegen.

Die DCLK1 ist somit an allen drei untersuchten Aspekten der alveolokapillären Membran beteiligt: der Barriere, der Zellzusammensetzung und der Immunantwort des Alveolarepithels. Es ist denkbar, dass eine Induktion der DCLK1 bzw. DCLK1-exprimierender Bürstenzellen ein zentraler Baustein in dem klinisch protektiven Effekt ist, den Vitamin D3 auf die Lunge hat.

## 5.4 Förderung pulmonaler Progenitorzellen durch Vitamin D3

Unter Vitamin D3 nahm die Proliferation im apikalen Epithellayer zu. Die proliferierenden Zellen bildeten dabei Zellcluster, die von DCLK1 exprimierenden Zellen umgeben waren und überwiegend SP-C Expression aufwiesen. Ihre Morphologie war jedoch nicht typisch für Typ 2 Zellen, sondern eher undifferenziert. Die Zentren der Zellcluster färbten für MUC5B und  $\beta$  Tubulin an, was vermuten lässt, dass die proliferierenden Zellen zumindest in Teilen bronchialen- bzw. Stammzellcharakter aufweisen. Außerdem deutete sich eine Entwicklung der Zellcluster 'von innen nach außen' an mit zentralen Zellen, die positiv für MUC5B bzw.  $\beta$  Tubulin waren, doppelt positiven Zellen im Übergangsbereich und ausschließlich DCLK1 exprimierenden Zellen in der Peripherie. Diese Beobachtungen könnten Ausdruck einer zunehmenden Differenzierung DCLK1 positiver Zellen aus einem Stammzellpool sein, dessen Proliferation sie anschließend selbst fördern. Denkbar wäre, dass Vitamin D3 diesen Stammzellpool zur Proliferation anregt, und dass die Induktion der DCLK1 diesen Effekt vermittelt. Die Literatur gibt hierzu einige Hinweise:

Für DCLK1 und den Stammzellmarker LGR5 wird sowohl eine Koregulation, als auch ein Entstehen von DCLK1 positiven Bürstenzellen aus LGR5 positiven Stammzellen beschrieben (J. H. Lee et al., 2017; Middelhoff et al., 2017). LGR5 gilt als Marker für (Reserve-)stammzellen, die u.a. in Darm-, Bronchial- und Alveolarepithel vorkommen (Barker et al., 2013; Gracz et al., 2013). Im Darm beschrieben Middelhoff et al. die Entwicklung DCLK1 exprimierender Bürstenzellen aus z.T. LGR5 positiven Stammzellen, mit deren Differenzierung die DCLK1 Expression zu- und das Proliferationspotenzial abnimmt (Middelhoff et al., 2017). Die gleiche Entwicklung konnte in den Zellclustern beobachtet werden: Mit zunehmender Entfernung vom Clustermittelpunkt wirkten die Zellen differenzierter, die DCLK1 Expression stieg und die Proliferation sistierte. Im Darm wurden LGR5+ Stammzellen zudem als Vitamin D abhängig beschrieben (Peregrina et al., 2015). Möglich wäre also, dass Vitamin D3 LGR5+ Stammzellen aktiviert und ihre Ausdifferenzierung zu DCLK1 exprimierenden Bürstenzellen fördert. In vivo Effekte legen jedoch auch einen rückwirkenden Einfluss von DCLK1 auf LGR5 nahe. Ein Knockout der DCLK1 resultierte in verschiedenen Tiermodellen nicht nur im Zusammenbruch der intestinalen respektive pulmonalen Barriere, sondern auch in massiv eingeschränktem Regenerationspotenzial (Middelhoff et al., 2017; Yi et al., 2018) unter Reduktion des Stammzellmarkers LGR5 (May et al., 2014). Vermittler dieser wechselseitigen Auswirkungen könnten hier der Wnt und Notch Signalweg sein, die beide von LGR5 und DCLK1 bedient werden, Vitamin D abhängig sind und für die Lungenregeneration und epitheliale Integrität eine zentrale Rolle spielen (Barker et al., 2013; May et al., 2014).

Bei den proliferierenden Zellen könnte es sich um sogenannte bronchioalveoläre Stammzellen (BASC) bzw. bronchioepitheliale Stammzellen (BESC) handeln. Diese exprimieren MUC5B bzw.  $\beta$  Tubulin

(Barkauskas et al., 2013; Schilders et al., 2016; Yuan et al., 2019), sind jedoch bipotent und können neben Bronchialepithel auch Alveolarepithel hervorbringen. Dies würde die zusätzlich intensive Färbung von SP-C als Typ 2 Marker innerhalb der Zellcluster erklären. In der gesunden adulten Lungenhomöostase wird das Alveolarepithel hauptsächlich aus Typ 2 Zellen regeneriert. Unter Verletzungsbedingungen hingegen wird eine Rekrutierung proximalerer Progenitorzellen vermutet, die der embryonalen Genese ähnelt (Barkauskas et al., 2013; Q. Chen et al., 2021; Desai et al., 2014).  $\beta$  Catenin/Wnt Signaling beeinflusst hierbei das Lungenepithel im Sinne einer Ausreifung, indem es die Ausdifferenzierung von BESC zu Typ 2 Zellen (Yuan et al., 2019) und einen alveolären Differenzierungsweg embryonaler Progenitorzellen fördert. Für Vitamin D3 hingegen ist eine hemmende Wirkung auf den  $\beta$  Catenin/Wnt Signalweg beschrieben worden (Kaler et al., 2009; Larriba et al., 2013). Sollten die proliferierenden Zellen BASC/BESC sein, könnte Vitamin D3 somit über eine Hemmung des  $\beta$  Catenin/Wnt Signalweges ihre Ausdifferenzierung hemmen und im Gegenzug ihre Proliferation anregen. Damit würde Vitamin D3 embryonale Regenerationswege stärken und könnte so einen potenteren Zellnachschub gewährleisten, was mit der beobachteten unreifen Morphologie und verstärkten Proliferation im Zelllayer übereinstimmen würde.

Eine von Vitamin D3 modulierte Interaktion von DCLK1 exprimierenden Bürstenzellen und pulmonalen Progenitorzellen scheint greifbar, eine Hierarchie allerdings nur hypothetisch festzulegen. Die Vermutung, dass der sich in klinischen Studien abzeichnende protektive Effekt von Vitamin D3 nicht nur auf einer Stärkung der Barriere, sondern auch auf einer Veränderung der Zellzusammensetzung beruht, scheint sich jedoch zu bestätigen und unter anderem auf der Induktion DCLK1 exprimierender Bürstenzellen zu beruhen, die ihrerseits mit pulmonalen Stammzellen in wechselseitiger Beziehung stehen. Ein gewinnbringender Folgeschritt könnte hier die Isolation einzelner Zellen aus den Zellclustern mittels Laser-Mikrodissektion sein. Eine Proteomanalyse könnte die Identität der proliferierenden Zellen weiter aufdecken und damit wertvolle Hinweise für die Hierarchie des dynamischen Systems alveolärer Regeneration liefern.

## 5.5 Einfluss von Vitamin D3 auf die Immunhomöostase der Lunge

Unter Vitamin D3 wurde eine starke und in den Monokulturen signifikante Induktion des Cathelicidins LL-37 beobachtet. Damit konnten die vorherigen Ergebnisse der H441 Zellen auch in den Primärzellen bestätigt (Xiong et al., 2023), und die Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen an Primärzellen untermauert werden (Hansdottir et al., 2008). In seiner Funktion ist LL-37 bisher vor allem dafür bekannt gewesen, LPS, ein Oberflächenmolekül Gram negativer Bakterien, zu neutralisieren (Fahy et al., 2005; Hase et al., 2002). Doch auch die Förderung von Wundheilung und Angiogenese, sowie die Stärkung epithelialer Barrieren durch LL-37 sind beschrieben worden (Aarbiou et al., 2002; Peric et al., n.d.; Pinheiro da Silva & Machado, 2017). Durch Induktion von LL-37 kann Vitamin D3 also nicht nur die Abwehr Gram negativer Erreger unterstützen, sondern auch die alveoläre Barriere stärken und damit den Verlauf von Lungenerkrankungen entscheidend beeinflussen, indem das Einwandern von Immunzellen in den Alveolarraum mit konsekutiver Surfactantdestruktion effektiv verhindert wird. In Vorversuchen mit H441 Kulturen resultierte die Stimulation mit LL-37 damit übereinstimmend in einer konzentrationsabhängigen Verstärkung des TEER (Xiong et al., 2023). Die starke Induktion von LL-37 durch Vitamin D3 könnte also neben dem immunologischen Effekt auch die Barriere des Alveolarepithels beeinflussen.

Bei den  $\beta$  Defensinen zeigte sich unter Vitamin D3 in den Mono- und Kokulturen eine signifikante Abnahme von HBD-1 und ein leichter aber nicht signifikanter Anstieg von HBD-2. HBD-1 wird von Epithelien konstitutiv, HBD-2 vornehmlich im inflammatorischen Kontext gebildet (Aarbiou et al., 2002; Hiemstra, 2007). Die Suppression von HBD-1 und Induktion von HBD-2 könnte also auf eine Verschiebung der Immunität eines ruhenden Epithels hin zu aktivierten Abwehrmechanismen hindeuten, was auch Grund für die oben beschriebene Rekrutierung proximalerer Vorläuferzellen sein könnte.

In der normalen Lungenhomöostase bleibt das Alveolarepithel durch den Flüssigkeitsfilm, die mukoziliäre Reinigung und die direkten antimikrobiellen Eigenschaften von Cathelicidin und Defensinen vor Antigenkontakt abgeschirmt. Die beobachtete Induktion von LL-37 und HBD-2 im ruhenden Epithel könnte diesen Abschirmmechanismus stärken und so chronische Entzündungsreize verhindern. Die Hemmung von HBD-1 hingegen könnte Antigentoleranz fördern, was insbesondere im Kontext der bei Asthma erhöhten HBD-1 Spiegel (Leung et al., 2006) plausibel wäre. Im klinischen Kontext hat Vitamin D3 sowohl auf die Suszeptibilität als auch den Verlauf erregerinduzierter Lungenerkrankungen positive Effekte. Die hier detektierte Modulation der  $\beta$  Defensine könnte ein molekulares Korrelat dessen sein, bei dem diese eine Aktivierung des Immunsystems a priori verhindern, überschießende Immunreaktionen dämpfen und toleranzfördernd wirken.

Auch das Surfactantprotein SP-A ist in die Immunhomöostase der Lunge involviert und wurde durch Vitamin D3 in den Monokulturen signifikant inhibiert. An H441 Zellen war eine Zunahme von SP-A unter LPS-Exposition auf mRNA Ebene beobachtet worden (Janga et al., 2018). In Versuchen der eigenen Arbeitsgruppe zeigte sich zusätzlich eine Abnahme unter simultaner wie alleiniger Vitamin D3 Behandlung (Xiong et al., 2023). SP-A scheint demnach auf proinflammatorische Stimuli hin induziert zu werden und Vitamin D3 diese Induktion zu antagonisieren. Dieser Effekt konnte hier in den Primärzellen bestätigt werden. SP-A kann kontextabhängig pro- oder antiinflammatorisch wirken, indem es bei geringer Antigenexposition diese agglutiniert und der mukoziliären Reinigung zuführt und so vor dem Immunsystem abschirmt. In der normalen Homöostase wird so eine permanente Aktivierung des Immunsystems verhindert. Bei stärkerer Erregerexposition hingegen fungiert SP-A als Opsonin für Makrophagen und verstärkt so die Immunreaktion (Mason, 2006; Phelps, 2001). Gleichzeitig kann SP-A aber auch die Aktivität von Makrophagen hemmen und so die Surfactantdegradation verhindern (Spengler et al., 2018). Eine Inhibition von SP-A durch Vitamin D3 könnte somit im Entzündungsgeschehen je nach Kontext sowohl aktivierende als auch dämpfende, toleranzfördernde Effekte haben. Durch negative Rückkopplung kann SP-A zudem die Surfactantrezirkulation hemmen (Lykkedegn et al., 2015a), sodass das Absinken der SP-A Expression auch Indikator einer verstärkten Surfactantsekretion sein könnte. Die hier in einigen Färbungen beobachtete Zunahme der SP-C Intensität unter Vitamin D3 wäre damit kohärent.

Für die Immunhomöostase der Lunge ist eine feinste Abstimmung von Immun- und Entzündungsreaktionen essentiell. Einerseits erfordert die große Kontaktfläche mit der Außenwelt einen suffizienten Schutz vor dem Eindringen von Erregern in die unmittelbar angrenzende Blutbahn, andererseits muss die vulnerable aber lebenswichtige alveolokapilläre Membran vor Destruktion durch überschießende Immunreaktionen geschützt werden. Als Mediatoren einer ausgefeilten Immunantwort wirken antimikrobielle Peptide (AMP) nicht nur direkt antimikrobiell, sondern greifen auch modulatorisch in die Immunantwort ein. Dabei können sie je nach Kontext pro- und antiinflammatorisch wirken. Beide Funktionen wiederum können je nach Krankheitsbild und Ausprägung protektiv oder destruierend für den Organismus sein (Aarbiou et al., 2002; da Silva et al., 2017). Die genauen Mechanismen sind erst rudimentär erforscht und die mitunter konträre Wirkung der AMPs in verschiedenen Organen, Organismen und experimentellen Szenarien stellt die Wissenschaft vor neue Herausforderungen und Möglichkeiten. Schon lange wird vermutet, dass Vitamin D bei der Gratwanderung zwischen Erregerabwehr und Selbstschutz in der Lunge eine zentrale modulierende Rolle spielt. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Induktion des Cathelicidins LL-37 und des humanen  $\beta$  Defensins HBD-1, sowie die Reduktion von HBD-2 und SP-A durch Vitamin D3 könnten zugrundeliegende Mechanismen sein.

## 5.6 Einfluss von Vitamin D3 auf das Endothel

In exemplarischen Endothel-Kontrollkulturen konnten mittels ECIS-Impedanzmessung Widerstände gemessen werden, die unter Vitamin D3 Behandlung anstiegen. Endotheliale Tight Junctions sind im zellulären Schlussleistenkomplex eher punktuell konzentriert als zirkumferentiell angeordnet, sodass die parazelluläre Dichtigkeit der Lungenbarriere vornehmlich auf den Tight Junctions der Alveolarepithelzellen beruht (Vestweber, 2000; Wang et al., 2013). Ein protektiver Effekt von Vitamin D3 auf das Endothel ist jedoch durchaus wahrscheinlich. Klinisch bessert Vitamin D3 nachweislich die endotheliale Barriere bei Sepsispatienten (Nguyen et al., 2013). In Outgrowth Endothelial Cells (OEC) wurde außerdem mit der Induktion des Vitamin D bindenden Proteins (VDBP) durch LPS ein Zusammenhang von Vitamin D3 zu endothelialen Schutzmechanismen beschrieben (Janga et al., 2018). Im Darmepithel hemmt Vitamin D3 die Bindung von NFκB an die Promoterregion der Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK), die die Kontraktion von Zellen über das Aktinskelett bewirkt (Du et al., 2015). Die Kontraktion von Endothelzellen ist zentraler Mechanismus endothelialer Barrieredisruption (Vestweber, 2000), sodass eine Hemmung der MLCK durch Vitamin D3 auch in der Lunge barriereprotektiv wirken könnte. Eine weitere Untersuchung der endothelialen Barriere in Abgrenzung zur Barrierebildung durch das Alveolarepithel könnte hier sinnvoll sein, sollte jedoch nicht Fokus der vorliegenden Arbeit sein.

Auch die zahlreichen identifizierten Angriffspunkte der SARS-CoV-2 Hauptproteasen (Mpro) auf die Proteine von pulmonalen Endothelzellen (Koudelka et al., 2021) weisen darauf hin, dass das pulmonale Endothel bei Lungenerkrankungen eine zentrale Rolle spielt, und könnten dazu beitragen, die Pathophysiologie von COVID-19 weiter zu entschlüsseln und pharmakologische Zielmoleküle zu finden. Mpro selbst, die Hauptprotease von SARS-CoV-2, konnte bereits als potenzielles Targetmolekül hervorgehoben werden (Gao et al., 2022; J. Lee et al., 2022). Vor diesem Hintergrund könnte eine weiterführende Untersuchung von Endothelkulturen mit und ohne Vitamin D3 helfen, den klinisch protektiven Effekt von Vitamin D3 auf Endothelzellen auch auf molekularer Ebene zu greifen.

## 6 Zusammenfassung

Mit der Isolation und Kultivierung von Primärzellen auf Transwellfiltern konnte ein Modell der alveolokapillären Barriere untersucht werden, das gegenüber der Zelllinie H441 das distale Lungenepithel mit einer höheren Dynamik widerspiegelt. Die aus humanem Lungengewebe isolierten primären Alveolarepithelzellen zeigten Konfluenz und transdifferenzierten zu einem heterogenen Epithel aus Typ 1 und Typ 2 Zellen, das zusätzlich Zellen bronchialer Abstammung enthielt. Über Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER) wurde die parazelluläre Barrierebildung der Zellkulturen erfasst. Die Kokultivierung mit ebenfalls primären Endothelzellen führte zu höheren Widerstandswerten und einer morphologisch schnelleren Ausreifung des apikalen Epithels. Dies entsprach dem aktuellen Konsens der Literatur, nach dem die Kokultivierung mit Endothelzellen in vitro einen stabilisierenden Effekt hat und die alveoläre Barriere durch die komplexe Interaktion beider Zelltypen aufgebaut und reguliert wird. In den Monokulturen erschwerten niedrige und zwischen den Einzelspendern stark schwankende Widerstände valide Aussagen über den Einfluss von Vitamin D3 auf die elektrische Barriere. Es zeichnete sich jedoch - konträr zu den H441 Zellen - ein Trend zu unter Vitamin D3 niedrigeren TEER Werten ab. Dabei wurden in den Primärkulturen morphologisch zwei Effekte beobachtet, die sich gegenläufig auf den gemessenen transepithelialen elektrischen Widerstand auswirken könnten: zum einen zeigte sich in Typ 1 Zellen eine vermehrte Translokation von Tight Junctions, was auf einen barrierestärkenden Effekt von Vitamin D3 in diesen bereits ausdifferenzierten Zellen hinweist. Zum anderen wurde eine vermehrte Proliferationsaktivität von unreifen bronchialen Zellen beobachtet, die mit morphologisch nicht-translozierten Tight Junctions vermutlich keine Barriere bilden. Die vermehrte Proliferation nicht-barrierebildender Zellen könnte hierbei die Tendenz zu den niedrigeren TEER Werten unter Vitamin D3 im Primärzellisolat erklären - ein Effekt, der in H441 Zellen gegebenenfalls nicht zum Tragen kommt, da diese als Krebszelllinie ohnehin verändertes Proliferationsverhalten zeigen.

Es wurde eine signifikante Induktion des in proproliferative Regelkreise involvierten Enzyms Doublecortin-like Kinase 1 (DCLK1) unter Vitamin D3 in PCR und Färbungen nachgewiesen. Gleichzeitig zeigte sich unter Vitamin D3 die erhöhte Proliferationsaktivität undifferenziert aussehender Zellen. Kofärbungen lieferten hier Hinweise auf einen möglicherweise DCLK1-vermittelten Effekt von Vitamin D3, der zur Vermehrung jener a.e. als bronchioalveolären Progenitorzellen einzustufenden Vorläuferzellen führte. Eine Vitamin D3-abhängige Induktion der DCLK1 in Alveolarepithel ist bislang noch nicht beschrieben worden. Sie könnte für die aktuelle Forschung an pulmonalem Stammzellditing und Tissueengineering einen hilfreichen Baustein darstellen und auch für klinische Regenerationsansätze von Bedeutung sein. Beispielsweise der Erhalt und die Regeneration von Typ 2

Zellen stellen seit langem eine Herausforderung dar und haben im Zuge der COVID-19 Pandemie neu an Dringlichkeit gewonnen. Die vorliegende Arbeit liefert hier ergänzende Hinweise darauf, dass bronchioalveoläre Progenitorzellen Typ 2 Zellen hervorbringen, und ihre Induktion durch Vitamin D3 gefördert wird. Die hier detektierte, mit einer DCLK1 Induktion einhergehende, erhöhte Proliferationsrate von broncho-alveolären Progenitorzellen könnte für ein Verständnis der Reparaturprozesse in der adulten Lunge wesentlich sein und dazu beitragen, Typ 2 Zellen auch in vivo regenerieren zu können. Und somit z.B. der bisher als irreversibel geltenden pulmonalen Fibrose entgegenzuwirken, die Langzeitfolge des ARDS und Korrelat des Post-COVID-Syndoms ist.

Mit der potenten Induktion des Cathelicidins LL-37 durch Vitamin D3 konnten außerdem signifikante Effekte auf die Immunhomöostase des Alveolarepithels beobachtet werden. Die direkte antimikrobielle Wirkung von LL-37, sowie seine modulatorische Funktion in der Immunantwort, trägt vermutlich dazu bei, überschießende Inflammation im Alveolarepithel zu dämpfen und so die vulnerable alveolokapilläre Membran vor Selbstdestruktion zu schützen. In der Pathophysiologie des ARDS markiert der Barrierezusammenbruch dieser einen entscheidenden Eskalationsschritt, sodass eine gedämpfte Immunreaktion in der Lunge zu einem mildereren Krankheitsverlauf beitragen kann. Auch die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Modulation der am Schleimhautschutz beteiligten  $\beta$  Defensine HBD-1 und HBD-2 könnte zum Schutz der Alveolen im Sinne eines Gleichgewichtes zwischen suffizienter Pathogenabwehr und destruktiver Immunreaktion dienen. Zusätzlich wurde eine Zunahme von SP-C in den Färbungen und eine sinkende Expression von SP-A in der PCR beobachtet, was ebenfalls auf eine veränderte Immunreaktion, sowie auf eine verstärkte Surfactantproduktion unter Vitamin D3 hindeutet. Eine verstärkte Surfactantproduktion würde sich ebenfalls schützend auf das Alveolarepithel auswirken und könnte, etwa durch Überstandsanalysen mittels ELISA, in Folgeversuchen weiter untersucht werden.

Die zuvor beobachteten Effekte von Vitamin D3 in H441 Zellen (die Induktion der DCLK1, die Induktion des humanen Cathelicidins LL-37 und die Reduktion der SP-A Expression) konnten auch an den Primärzellen bestätigt werden. Durch die Inkubation der aus dem humanen Lungengewebe isolierten primären pulmonalen Endothelzellen mit SARS-CoV-2 Proteasen konnte darüber hinaus eine große Bandbreite von Angriffspunkten des Virus identifiziert werden und die Bedeutung seiner Hauptprotease Mpro als potenzielles Ziel für eine spezifische pharmakologische Therapie gegen COVID-19 herausgehoben werden.



Insgesamt zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass Vitamin D3 alle drei untersuchten Aspekte des alveolären Epithels - die Barrierefunktion, die Zellzusammensetzung und die Immunantwort - beeinflusst. Folgende Mechanismen könnten dabei zum klinisch protektiven Effekt von Vitamin D3 beitragen: 1.) eine Barrierestärkung durch die vermehrte Translokation von Tight Junctions in Typ 1 Zellen, 2.) eine verbesserten Regeneration durch DCLK1-vermittelte Modulation von Stammzellnischen - mit proproliferativem Effekt auf Vorläuferzellen und einer Verschiebung hin zum Zellnachschub aus proximaleren Vorläuferzellen des Alveolarepithels und 3.) eine Optimierung der alveolären Immunantwort im Sinne eines Gleichgewichtes zwischen Abwehr und Selbstschutz. Alle drei Mechanismen könnten eine Rolle darin spielen, die Exazerbation von Lungenerkrankungen wie dem ARDS zu verhindern und ihre Langzeitschäden in der Lunge abzumildern, was insbesondere im Kontext von COVID-19 eine globale Bedeutung gewonnen hat.

## 7 Literaturverzeichnis

- Aarbiou, J., Rabe, K. F., & Hiemstra, P. S. (2002). Role of defensins in inflammatory lung disease. *Annals of Medicine*, 34(2), 96–101. <https://doi.org/10.1080/07853890252953482>
- Al-Qahtani, A. A., Murugaiah, V., Bashir, H. A., Pathan, A. A., Abozaid, S. M., Makarov, E., ... Al-Ahdal, M. N. (2019). Full-length human surfactant protein A inhibits influenza A virus infection of A549 lung epithelial cells: A recombinant form containing neck and lectin domains promotes infectivity. *Immunobiology*, 224(3), 408–418. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2019.02.006>
- Aman, J., Weijers, E. M., van Nieuw Amerongen, G. P., Malik, A. B., & van Hinsbergh, V. W. M. (2016). Using cultured endothelial cells to study endothelial barrier dysfunction: Challenges and opportunities. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 311(2), L453–L466. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00393.2015>
- Barkauskas, C. E., Crouce, M. J., Rackley, C. R., Bowie, E. J., Keene, D. R., Stripp, B. R., ... Hogan, B. L. M. (2013). Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *Journal of Clinical Investigation*, 123(7), 3025–3036. <https://doi.org/10.1172/JCI68782>
- Barker, N., Tan, S., & Clevers, H. (2013). Lgr proteins in epithelial stem cell biology. *Development (Cambridge)*, 140(12), 2484–2494. <https://doi.org/10.1242/dev.083113>
- Bhattacharya, J., & Matthay, M. A. (2013). Regulation and Repair of the Alveolar-Capillary Barrier in Acute Lung Injury. *Annual Review of Physiology*, 75(1), 593–615. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183756>
- Chandrakesan, P., Yao, J., Qu, D., May, R., Weygant, N., Ge, Y., ... Houchen, C. W. (2017). Dcl1, a tumor stem cell marker, regulates pro-survival signaling and self-renewal of intestinal tumor cells. *Molecular Cancer*, 16(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0594-y>
- Chen, H., Lu, R., Zhang, Y. guo, & Sun, J. (2018). Vitamin D Receptor Deletion Leads to the Destruction of Tight and Adherens Junctions in Lungs. *Tissue Barriers*, 6(4), 1–13. <https://doi.org/10.1080/21688370.2018.1540904>
- Chen, Q., Kumar, V. S., Finn, J., Jiang, D., Liang, J., Zhao, Y., & Liu, Y. (2021). Prediction to New Therapies CD44 high alveolar type II cells show stem cell properties during steady-state alveolar homeostasis. 41–51. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00564.2016>

- Chen, X., Rao, S. Q., Gao, B. H., & Jiang, Z. Q. (2015). Effect of early vitamin D supplementation on asthma and the possible mechanisms. *Genetics and Molecular Research*, 14(4), 14136–14143. <https://doi.org/10.4238/2015.October.29.35>
- Chirumbolo, S., Bjørklund, G., Sboarina, A., & Vella, A. (2017a). The Role of Vitamin D in the Immune System as a Pro-survival Molecule. *Clinical Therapeutics*, 39(5), 894–916. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2017.03.021>
- Chirumbolo, S., Bjørklund, G., Sboarina, A., & Vella, A. (2017b, May 1). The Role of Vitamin D in the Immune System as a Pro-survival Molecule. *Clinical Therapeutics*, Vol. 39, pp. 894–916. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2017.03.021>
- Claude, P. (1978). Morphological factors influencing transepithelial permeability: A model for the resistance of the Zonula Occludens. *The Journal of Membrane Biology*, 39(2), 219–232. <https://doi.org/10.1007/BF01870332>
- Dancer, R. C. A., Parekh, D., Lax, S., D'Souza, V., Zheng, S., Bassford, C. R., ... Thickett, D. R. (2015). Vitamin D deficiency contributes directly to the acute respiratory distress syndrome (ARDS). *Thorax*, 70(Dancer), 617–624. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2014-206680>
- Desai, T. J., Brownfield, D. G., & Krasnow, M. A. (2014). Alveolar progenitor and stem cells in lung development, renewal and cancer. *Nature*, 507(7491), 190–194. <https://doi.org/10.1038/nature12930>
- Du, J., Chen, Y., Shi, Y., Liu, T., Cao, Y., Tang, Y., ... Li, Y. C. (2015). 1,25-Dihydroxyvitamin D protects intestinal epithelial barrier by regulating the myosin light chain kinase signaling pathway. *Inflammatory Bowel Diseases*, 21(11), 2495–2506. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000526>
- Ebadi, M., & Montano-Loza, A. J. (2020). Perspective: improving vitamin D status in the management of COVID-19. *European Journal of Clinical Nutrition*, 74(6), 856–859. <https://doi.org/10.1038/s41430-020-0661-0>
- Fahy, R. J., & Wewers, M. D. (2005). Pulmonary defense and the human cathelicidin hCAP-18/LL-37. *Immunologic Research*, 31(2), 75–89. <https://doi.org/10.1385/ir:31:2:075>
- Feng-HuaLiu, Shan-ShanLi, Xiao-XiLi, Wang, S., Mao-GangLi, LiGuan, ... Yang, P. C. (2017). Vitamin D3 induces vitamin D receptor and HDAC11 binding to relieve the promoter of the tight junction proteins. *Oncotarget*, 8(35), 58781–58789. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17692>

- Ficial, M., Antonaglia, C., Chilosì, M., Santagiuliana, M., Tahseen, A.-O., Confalonieri, D., ... Confalonieri, M. (2014). Keratin-14 Expression in Pneumocytes as a Marker of Lung Regeneration/Repair during Diffuse Alveolar Damage. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 189(9), 1142–1145. <https://doi.org/10.1164/rccm.201312-2134LE>
- Fuchs, S., Hollins, A. J., Laue, M., Schaefer, U. F., Roemer, K., Gumbleton, M., & Lehr, C. M. (2003). Differentiation of human alveolar epithelial cells in primary culture: Morphological characterization and synthesis of caveolin-1 and surfactant protein-C. *Cell and Tissue Research*, 311(1), 31–45. <https://doi.org/10.1007/s00441-002-0653-5>
- Gao, S., Song, L., Claff, T., Woodson, M., Sylvester, K., Jing, L., ... Liu, X. (2022). Discovery and Crystallographic Studies of Nonpeptidic Piperazine Derivatives as Covalent SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c01716>
- Gatera, V. A., Abdulah, R., Musfiroh, I., Judistiani, R. T. D., & Setiabudiawan, B. (2018). Updates on the Status of Vitamin D as a Risk Factor for Respiratory Distress Syndrome. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8494816>
- Gerbe, F., Van Es, J. H., Makrini, L., Brulin, B., Mellitzer, G., Robine, S., ... Jay, P. (2011). Distinct ATOH1 and Neurog3 requirements define tuft cells as a new secretory cell type in the intestinal epithelium. *Journal of Cell Biology*, 192(5), 767–780. <https://doi.org/10.1083/jcb.201010127>
- Gracz, A. D., Fuller, M. K., Wang, F., Li, L., Stelzner, M., Dunn, J. C. Y., ... Magness, S. T. (2013). Brief Report: CD24 and CD44 mark human intestinal epithelial cell populations with characteristics of active and facultative stem cells. *Stem Cells*, 31(9), 2024–2030. <https://doi.org/10.1002/stem.1391>
- Grant, W. B., Lahore, H., McDonnell, S. L., Baggerly, C. A., French, C. B., Aliano, J. L., & Bhattoa, H. P. (2020). Evidence that vitamin d supplementation could reduce risk of influenza and covid-19 infections and deaths. *Nutrients*, 12(4), 1–19. <https://doi.org/10.3390/nu12040988>
- Hansdottir, S., Monick, M. M., Hinde, S. L., Lovan, N., Look, D. C., & Hunninghake, G. W. (2008). Respiratory Epithelial Cells Convert Inactive Vitamin D to Its Active Form: Potential Effects on Host Defense. *The Journal of Immunology*, 181(10), 7090–7099. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.10.7090>
- Hase, K., Eckmann, L., Leopard, J. D., Varki, N., & Kagnoff, M. F. (2002). Cell differentiation is a key determinant of cathelicidin LL-37/human cationic antimicrobial protein 18 expression by human

- colon epithelium. *Infection and Immunity*, 70(2), 953–963.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.70.2.953-963.2002>
- Hermanns, M I, Kasper, J., Unger, R. E., Carpentier, G., Roggen, E. L., & Kirkpatrick, C. J. (2015). *Assessment of respiratory sensitizers: Cytokine responses in a 3D alveolo-capillary barrier model in vitro*. 2, 1–9.
- Hermanns, Maria Iris. (2005). *Etablierung einer Ko-Kultur von Alveolarepithel und Mikrovaskulärem Endothel als in vitro Modell einer humanen respiratorischen Einheit*. (September), 1–222.
- Hermanns, Maria Iris, Fuchs, S., Bock, M., Wenzel, K., Mayer, E., Kehe, K., ... Kirkpatrick, C. J. (2009a). Primary human coculture model of alveolo-capillary unit to study mechanisms of injury to peripheral lung. *Cell and Tissue Research*, 336(1), 91–105. <https://doi.org/10.1007/s00441-008-0750-1>
- Hermanns, Maria Iris, Fuchs, S., Bock, M., Wenzel, K., Mayer, E., Kehe, K., ... Kirkpatrick, C. J. (2009b). Primary human coculture model of alveolo-capillary unit to study mechanisms of injury to peripheral lung. *Cell and Tissue Research*, 336(1), 91–105. <https://doi.org/10.1007/s00441-008-0750-1>
- Hermanns, Maria Iris, Kasper, J., Dubruel, P., Pohl, C., Uboldi, C., Vermeersch, V., ... Kirkpatrick, C. J. (2010). An impaired alveolar-capillary barrier in vitro: Effect of proinflammatory cytokines and consequences on nanocarrier interaction. *Journal of the Royal Society Interface*, 7(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1098/rsif.2009.0288.focus>
- Hernández, J. L., Nan, D., Fernandez-Ayala, M., García-Unzueta, M., Hernández-Hernández, M. A., López-Hoyos, M., ... Martínez-Taboada, V. M. (2021). Vitamin D Status in Hospitalized Patients with SARS-CoV-2 Infection. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 106(3), e1343–e1353. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa733>
- Hiemstra, P. S. (2007). The role of epithelial  $\beta$ -defensins and cathelicidins in host defense of the lung. *Experimental Lung Research*, 33(10), 537–542. <https://doi.org/10.1080/01902140701756687>
- Hijiya, K., Okada, Y., & Tankawa, H. (1977a). Ultrastructural study of the alveolar brush cell. *Journal of Electron Microscopy*, 26(4), 321–329. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jmicro.a050078>
- Hijiya, K., Okada, Y., & Tankawa, H. (1977b). Ultrastructural study of the alveolar brush cell. *Journal of Electron Microscopy*, 26(4), 321–329.
- Ilie, P. C., Stefanescu, S., & Smith, L. (2020). The role of vitamin D in the prevention of coronavirus

- disease 2019 infection and mortality. *Aging Clinical and Experimental Research*, 32(7), 1195–1198. <https://doi.org/10.1007/s40520-020-01570-8>
- Janga, H., Cassidy, L., Wang, F., Spengler, D., Oestern-Fitschen, S., Krause, M. F., ... Fuchs, S. (2018). Site-specific and endothelial-mediated dysfunction of the alveolar-capillary barrier in response to lipopolysaccharides. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 22(2), 982–998. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13421>
- Kaler, P., Augenlicht, L., & Klampfer, L. (2009). Macrophage-derived IL-1B stimulates Wnt signaling and growth of colon cancer cells: A crosstalk interrupted by vitamin D<sup>3</sup>. *Oncogene*, 28(44), 3892–3902. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.247>
- Kasper, M., Rudolf, T., Müller, M., Höfer, D., Drenckhahn, D., Woodcock-Mitchell, J., ... Attanasio, A. (1994a). Colocalization of cytokeratin 18 and villin in type III alveolar cells (brush cells) of the rat lung. *Histochemistry*, 101(1), 57–62. <https://doi.org/10.1007/BF00315832>
- Kasper, M., Rudolf, T., Müller, M., Höfer, D., Drenckhahn, D., Woodcock-Mitchell, J., ... Attanasio, A. (1994b). Colocalization of cytokeratin 18 and villin in type III alveolar cells (brush cells) of the rat lung. *Histochemistry*, 101(1), 57–62. <https://doi.org/10.1007/BF00315832>
- Kiemer, L., Lund, O., Brunak, S., & Blom, N. (2004). Coronavirus 3CLpro proteinase cleavage sites: Possible relevance to SARS virus pathology. *BMC Bioinformatics*, 5, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-72>
- Koudelka, T., Boger, J., Henkel, A., Schönherr, R., Krantz, S., Fuchs, S., ... Tholey, A. (2021). N-Terminomics for the Identification of In Vitro Substrates and Cleavage Site Specificity of the SARS-CoV-2 Main Protease. *Proteomics*, 21(2), 2–6. <https://doi.org/10.1002/pmic.202000246>
- Kumar, P. A., Hu, Y., Yamamoto, Y., Hoe, N. B., Wei, T. S., Mu, D., ... McKeon, F. (2011). Distal airway stem cells yield alveoli in vitro and during lung regeneration following H1N1 influenza infection. *Cell*, 147(3), 525–538. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.001>
- Lahdaoui, F., Messenger, M., Vincent, A., Hec, F., Gandon, A., Warlaumont, M., ... Seuningen, I. Van. (2017). Depletion of MUC5B mucin in gastrointestinal cancer cells alters their tumorigenic properties : implication of the Wnt /  $\beta$ -catenin pathway. 3733–3746.
- Larriba, M. J., González-Sancho, J. M., Barbáchano, A., Niell, N., Ferrer-Mayorga, G., & Muñoz, A. (2013). Vitamin D is a multilevel repressor of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in cancer cells. *Cancers*, 5(4), 1242–1260. <https://doi.org/10.3390/cancers5041242>

- Laucho-Contreras, M. E., Polverino, F., Rojas-Quintero, J., Wang, X., & Owen, C. A. (2018). Club cell protein 16 (Cc16) deficiency increases inflamm-aging in the lungs of mice. *Physiological Reports*, 6(15), 1–18. <https://doi.org/10.14814/phy2.13797>
- Lee, J. H., Tammela, T., Hofree, M., Choi, J., Marjanovic, N. D., Han, S., ... Kim, C. F. (2017). Anatomically and Functionally Distinct Lung Mesenchymal Populations Marked by Lgr5 and Lgr6. *Cell*, 170(6), 1149–1163.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.028>
- Lee, J., Kenward, C., Worrall, L. J., Vuckovic, M., Gentile, F., Ton, A. T., ... Paetzel, M. (2022). X-ray crystallographic characterization of the SARS-CoV-2 main protease polyprotein cleavage sites essential for viral processing and maturation. *Nature Communications*, 13(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32854-4>
- Leung, T. F., Li, C. Y., Liu, E. K. H., Tang, N. L. S., Chan, I. H. S., Yung, E., ... Lam, C. W. K. (2006). Asthma and atopy are associated with DEFB1 polymorphisms in Chinese children. *Genes and Immunity*, 7(1), 59–64. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364279>
- Liu, Q., Liu, K., Cui, G., Huang, X., Yao, S., Guo, W., ... Ren, T. (2019). residing at the bronchioalveolar-duct junction. *Nature Genetics*, 51(April). <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0346-6>
- Liu, Y., Kumar, V. S., Zhang, W., Rehman, J., & Malik, A. B. (2015). Activation of type II cells into regenerative stem cell antigen-1+ cells during alveolar repair. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 53(1), 113–124. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0497OC>
- Lu, Y., Maruyama, J., Sugimura, H., & Hata, Y. (2021). Doublecortin-like kinase 1 expression is induced by alternative NF- $\kappa$ B signaling in human lung cancer cells. *Journal of Medical and Dental Sciences*, 68, 39–48. <https://doi.org/10.11480/jmds.680005>
- Lykkedegn, S., Sorensen, G. L., Beck-Nielsen, S. S., & Christesen, H. T. (2015a). The impact of vitamin D on fetal and neonatal lung maturation. A systematic review. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 308(7), L587–L602. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00117.2014>
- Lykkedegn, S., Sorensen, G. L., Beck-Nielsen, S. S., & Christesen, H. T. (2015b). The impact of vitamin D on fetal and neonatal lung maturation. A systematic review. *American Journal of Physiology- Lung Cellular and Molecular Physiology*, 308(7), L587–L602. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00117.2014>
- Mandell, E., Seedorf, G., Gien, J., & Abman, S. H. (2014). Vitamin D treatment improves survival and infant lung structure after intra-amniotic endotoxin exposure in rats: Potential role for the

- prevention of bronchopulmonary dysplasia. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 306(5), 420–428. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00344.2013>
- Marsh, L. M., Cakarova, L., Kwapiszewska, G., Von Wulffen, W., Herold, S., Seeger, W., & Lohmeyer, J. (2009). Surface expression of CD74 by type II alveolar epithelial cells: A potential mechanism for macrophage migration inhibitory factor-induced epithelial repair. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 296(3), 442–452. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00525.2007>
- Mason, R. J. (2006). *Biology of alveolar type II cells*. 12–15.
- May, R., Qu, D., Weygant, N., Chandrakesan, P., Ali, N., Lightfoot, S. A., ... Houchen, C. W. (2014). Brief report: Dclk1 deletion in tuft cells results in impaired epithelial repair after radiation injury. *Stem Cells*, 32(3), 822–827. <https://doi.org/10.1002/stem.1566>
- Middelhoff, M., Westphalen, C. B., Hayakawa, Y., Yan, K. S., Gershon, M. D., Wang, T. C., & Quante, M. (2017). Dclk1-expressing tuft cells: Critical modulators of the intestinal niche? *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 313(4), G285–G299. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00073.2017>
- Murphy, S. A., Dindsale, D., Hoet, P., Nemery, B., & Richards, R. J. (1999). A comparative study of the isolation of type II epithelial cells from rat, hamster, pig and human lung tissue. *Methods in Cell Science*, 21(1), 31–38. <https://doi.org/10.1023/A:1009825008023>
- Neuhaus, W., Samwer, F., Kunzmann, S., Muellenbach, R. M., Wirth, M., Speer, C. P., ... Förster, C. Y. (2012). Lung endothelial cells strengthen, but brain endothelial cells weaken barrier properties of a human alveolar epithelium cell culture model. *Differentiation*, 84(4), 294–304. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2012.08.006>
- Nguyen, C. B., Kotturi, H., Waris, G., Mohammed, A., Chandrakesan, P., May, R., ... Ali, N. (2016). (Z)-3,5,4'-trimethoxystilbene limits hepatitis C and cancer pathophysiology by blocking microtubule dynamics and cell-cycle progression. *Cancer Research*, 76(16), 4887–4896. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2722>
- Nguyen, H. B., Eshete, B., Lau, K. H. W., Sai, A., Villarin, M., & Baylink, D. (2013). Serum 1,25-Dihydroxyvitamin D: An Outcome Prognosticator in Human Sepsis. *PLoS ONE*, 8(5), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064348>
- O'Leary, C. E., Schneider, C., & Locksley, R. M. (2019). Tuft Cells—Systemically Dispersed Sensory Epithelia Integrating Immune and Neural Circuitry. *Annual Review of Immunology*, 37(1), 47–72.



<https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042718-041505>

Omori, Y., Suzuki, M., Ozaki, K., Harada, Y., Nakamura, Y., Takahashi, E. I., & Fujiwara, T. (1998).

Expression and chromosomal localization of KIAA0369, a putative kinase structurally related to Doublecortin. *Journal of Human Genetics*, 43(3), 169–177.

<https://doi.org/10.1007/s100380050063>

Ota, C., Ng-Blichfeldt, J. P., Korfei, M., Alsafadi, H. N., Lehmann, M., Skronska-Wasek, W., ...

Königshoff, M. (2018). Dynamic expression of HOPX in alveolar epithelial cells reflects injury and repair during the progression of pulmonary fibrosis. *Scientific Reports*, 8(1), 1–10.

<https://doi.org/10.1038/s41598-018-31214-x>

Pahar, B., Madonna, S., Das, A., Albanesi, C., & Girolomoni, G. (2020). Immunomodulatory role of the antimicrobial IL-37 peptide in autoimmune diseases and viral infections. *Vaccines*, 8(3), 1–19.

<https://doi.org/10.3390/vaccines8030517>

Peregrina, K., Houston, M., Daroqui, C., Dhima, E., Sellers, R. S., & Augenlicht, L. H. (2015). Vitamin D is a determinant of mouse intestinal Lgr5 stem cell functions. *Carcinogenesis*, 36(1), 25–31.

<https://doi.org/10.1093/carcin/bgu221>

Peric, M., Koglin, S., Kim, S., Morizane, S., Besch, R., Prinz, C., ... Gallo, R. L. (n.d.). *IL-17A Enhances Vitamin D 3 -Induced Expression of*. (10).

Phelps, D. S. (2001). Surfactant Regulation of Host Defense Function in the Lung: A Question of Balance. *Pediatric Pathology & Molecular Medicine*, 20(4), 269–292.

<https://doi.org/10.1080/15513810109168822>

Pinheiro da Silva, F., & Machado, M. C. C. (2017). The dual role of cathelicidins in systemic inflammation. *Immunology Letters*, 182, 57–60. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.01.004>

Quesada-Gomez, J. M., Entrenas-Castillo, M., & Bouillon, R. (2020). Vitamin D receptor stimulation to reduce acute respiratory distress syndrome (ARDS) in patients with coronavirus SARS-CoV-2 infections: Revised Ms SBMB 2020\_166. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 202. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2020.105719>

Rajasekaran, A. K., Hojo, M., Huima, T., & Rodriguez-Boulán, E. (1996). Catenins and zonula occludens-1 form a complex during early stages in the assembly of tight junctions. *Journal of Cell Biology*, 132(3), 451–463. <https://doi.org/10.1083/jcb.132.3.451>

Rhodes, J. M., Subramanian, S., Laird, E., Griffin, G., & Kenny, R. A. (2021). Perspective: Vitamin D

- deficiency and COVID-19 severity – plausibly linked by latitude, ethnicity, impacts on cytokines, ACE2 and thrombosis. *Journal of Internal Medicine*, 289(1), 97–115.  
<https://doi.org/10.1111/joim.13149>
- Roy, M. G., Livraghi-butrico, A., Fletcher, A. A., Mcelwee, M. M., Evans, S. E., Boerner, R. M., ... Evans, C. M. (2014). Muc5b is required for airway defence. *Nature*, 505(7483), 412–416.  
<https://doi.org/10.1038/nature12807>
- Santaolalla, A., Beckmann, K., Kibaru, J., Josephs, D., Van Hemelrijck, M., & Irshad, S. (2020, November 26). Association Between Vitamin D and Novel SARS-CoV-2 Respiratory Dysfunction – A Scoping Review of Current Evidence and Its Implication for COVID-19 Pandemic. *Frontiers in Physiology*, Vol. 11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.564387>
- Sbarbati, A., & Osculati, F. (2005a). A new fate for old cells: brush cells and related elements. *Journal of Anatomy*, 206(4), 349–358. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2005.00403.x>
- Sbarbati, A., & Osculati, F. (2005b). A new fate for old cells: Brush cells and related elements. *Journal of Anatomy*, 206(4), 349–358. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2005.00403.x>
- Schilders, K. A. A., Eenjes, E., Riet, S. van, Poot, A. A., Stamatialis, D., Truckenmüller, R., ... Rottier, R. J. (2016). Regeneration of the lung: Lung stem cells and the development of lung mimicking devices. *Respiratory Research*, 17(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/S12931-016-0358-Z>
- Schneeberger, E. E., & Lynch, R. D. (2004). The tight junction: A multifunctional complex. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 286(6 55-6). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00558.2003>
- Schnittler, H.-J. (1998). Structural and functional aspects of intercellular junctions in vascular endothelium. *Basic Research in Cardiology*, 93(3), s030–s039.  
<https://doi.org/10.1007/s003950050205>
- Schögler, A., Muster, R. J., Kieninger, E., Casaulta, C., Tapparel, C., Jung, A., ... Alves, M. P. (2016). Vitamin D represses rhinovirus replication in cystic fibrosis cells by inducing LL-37. *European Respiratory Journal*, 47(2), 520–530. <https://doi.org/10.1183/13993003.00665-2015>
- Shi, Y. Y., Liu, T. J., Fu, J. H., Xu, W., Wu, L. L., Hou, A. N., & Xue, X. D. (2016). Vitamin D/VDR signaling attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by maintaining the integrity of the pulmonary epithelial barrier. *Molecular Medicine Reports*, 13(2), 1186–1194.  
<https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4685>
- Spengler, D., Winoto-Morbach, S., Kupsch, S., Vock, C., Blöchle, K., Frank, S., ... Krause, M. F. (2018).

- Novel therapeutic roles for surfactant-inositols and -phosphatidylglycerols in a neonatal piglet ARDS model: A translational study. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 314(1), L32–L53. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00128.2017>
- Treutlein, B., Brownfield, D. G., Wu, A. R., Neff, N. F., Mantalas, G. L., Espinoza, F. H., ... Quake, S. R. (2014). Reconstructing lineage hierarchies of the distal lung epithelium using single-cell RNA-seq. *Nature*, 509(7500), 371–375. <https://doi.org/10.1038/nature13173>
- Vestweber, D. (2000). Molecular mechanisms that control endothelial cell contacts. *Journal of Pathology*, 190(3), 281–291. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(200002\)190:3<281::AID-PATH527>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(200002)190:3<281::AID-PATH527>3.0.CO;2-Z)
- Wang, L., Taneja, R., Wang, W., Yao, L. J., Veldhuizen, R. A. W., Gill, S. E., ... Mehta, S. (2013). Human Alveolar Epithelial Cells Attenuate Pulmonary Microvascular Endothelial Cell Permeability under Septic Conditions. *PLoS ONE*, 8(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055311>
- Wang, S., & Hubmayr, R. D. (2011). Type I alveolar epithelial phenotype in primary culture. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 44(5), 692–699. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0359OC>
- Wei, R., & Christakos, S. (2015). Mechanisms underlying the regulation of innate and adaptive immunity by vitamin D. *Nutrients*, 7(10), 8251–8260. <https://doi.org/10.3390/nu7105392>
- Westphalen, C. B., Takemoto, Y., Tanaka, T., Macchini, M., Jiang, Z., Renz, B. W., ... Wang, T. C. (2016). Dclk1 Defines Quiescent Pancreatic Progenitors that Promote Injury-Induced Regeneration and Tumorigenesis. *Cell Stem Cell*, 18(4), 441–455. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.03.016>
- Xiong, J., Kaleja, P., Ückert, L., Nezaratzadeh, N., Krantz, S., Krause, M. F., ... Fuchs, S. (2023). Alveolar–Capillary Barrier Protection In Vitro: Lung Cell Type-Specific Effects and Molecular Mechanisms Induced by 1 $\alpha$ , 25-Dihydroxyvitamin D3. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(8). <https://doi.org/10.3390/ijms24087298>
- Yamazoe, M., Nishitani, C., Takahashi, M., Katoh, T., Ariki, S., Shimizu, T., ... Kuroki, Y. (2008). Pulmonary surfactant protein D inhibits lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory cell responses by altering LPS binding to its receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 283(51), 35878–35888. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807268200>
- Yanagi, S., Tsubouchi, H., Miura, A., Matsumoto, N., & Nakazato, M. (2015). Breakdown of Epithelial Barrier Integrity and Overdrive Activation of Alveolar Epithelial Cells in the Pathogenesis of Acute Respiratory Distress Syndrome and Lung Fibrosis. *BioMed Research International*, 2015.

<https://doi.org/10.1155/2015/573210>

Yang, J., Hernandez, B. J., Alanis, D. M., Narvaez, O., Vila, L., Akiyama, H., ... Chen, J. (2016). *The development and plasticity of alveolar type 1 cells*. 54–65. <https://doi.org/10.1242/dev.130005>

Yi, J., Bergstrom, K., Fu, J., Shan, X., McDaniel, J. M., McGee, S., ... Xia, L. (2018). Dclk1 in tuft cells promotes inflammation-driven epithelial restitution and mitigates chronic colitis. *Cell Death and Differentiation*, (November). <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0237-x>

Yuan, T., Volckaert, T., Redente, E. F., Hopkins, S., Klinkhammer, K., Wasnick, R., ... De Langhe, S. P. (2019). FGF10-FGFR2B Signaling Generates Basal Cells and Drives Alveolar Epithelial Regeneration by Bronchial Epithelial Stem Cells after Lung Injury. *Stem Cell Reports*, 12(5), 1041–1055. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.04.003>

Zheng, D., Soh, B. S., Yin, L., Hu, G., Chen, Q., Choi, H., ... Chen, J. (2017). Differentiation of Club Cells to Alveolar Epithelial Cells in Vitro. *Scientific Reports*, 7(November 2016), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep41661>

Taschenlehrbuch Histologie, Renate Lüllmann-Rauch unter Mitarbeit von Esther Asan, 5., vollständig überarbeitete Ausgabe, Georg Thieme Verlag, 2015, ISBN 978-3-13-151665-7

## 8 Anhang

**Tabelle 11: Kurzübersicht der in der Arbeit verwendeten Zellmarker und Zielmoleküle**

Marker	Funktion
<b>Zellkontakte</b>	
<b>ZO-1</b>	intrazelluläres Tight Junction Protein
<b>E-Cad</b>	Transmembranprotein von Adhärenskontakten in epithelialen Zellen
<b>Typ 2 Marker</b>	
<b>SP-C</b>	Surfactantprotein, wird nur von Typ 2 Zellen produziert
<b>CD74</b>	Oberflächenrezeptor von Typ 2 Zellen, erkennt MIF, in proliferative Signalwege involviert
<b>CD44</b>	Oberflächenprotein von Typ 2 Zellen, markiert eine hochproliferative Subpopulation für Regeneration im Gesunden
<b>Typ 1 Marker</b>	
<b>HOPX</b>	Homeoprotein und neuerer Typ 1 Marker mit proliferationshemmender und Transdifferenzierung fördernder Wirkung
<b>Cav-1</b>	Transmembranprotein in Caveolae, unspezifisch für Typ 1 Zellen, da auch auf anderen Zellen exprimiert, nimmt jedoch bei Transdifferenzierung zu
<b>Endothelmarker</b>	
<b>VE-Cad</b>	Für Endothel spezifische Form von Cadherin, Transmembranprotein von Adhärenskontakten
<b>CD31</b>	Endothelspezifisches Oberflächenprotein
<b>Marker dritter Zelltypen</b>	
<b>CC16</b>	Sekretionsprotein von Keulenzellen (ehem. Clarazellen)
<b>CK14</b>	Zytoskelettbestandteil bronchialer Basalzellen
<b>Villin</b>	Aktin-crosslinking Protein, Marker für Bürstenzellen, welche DCLK1 exprimieren
<b>LGR5</b>	G-Protein gekoppelter Rezeptor und epithelialer Stammzellmarker
<b>MUC5B</b>	Glykoprotein des Mukusfilms, markiert bronchiales Epithel: Becher-, Keulen und Broncho-epitheliale Stammzellen
<b>B Tub</b>	Bestandteil der Mikrotubuli des Zytoskeletts, Indikator bronchialer Vorläuferzellen
<b>Zielmoleküle</b>	
<b>DCLK1</b>	Mikrotubulusassoziierte Kinase, Marker für Bürstenzellen, in stammzellmodulierende und proliferative Signalwege involviert
<b>SP-A</b>	Surfactantprotein, von Typ 2 Zellen und Keulenzellen exprimiert, fungiert als Opsonin und bewirkt negative Rückkopplung der Surfactantproduktion
<b>LL-37</b>	einziges humanes Cathelicidin, als Untergruppe der AMP in Schleimhautschutz involviert, wird von vielen Epithelien exprimiert

<b>HBD-1</b>	Teil der $\beta$ Defensine als weitere Untergruppe der AMP, wird konstitutiv von Epithel zum Schleimhautschutz exprimiert
<b>HBD-2</b>	Ebenfalls Teil der $\beta$ Defensine, reaktive Bildung nach Kontakt mit Mikroorganismen

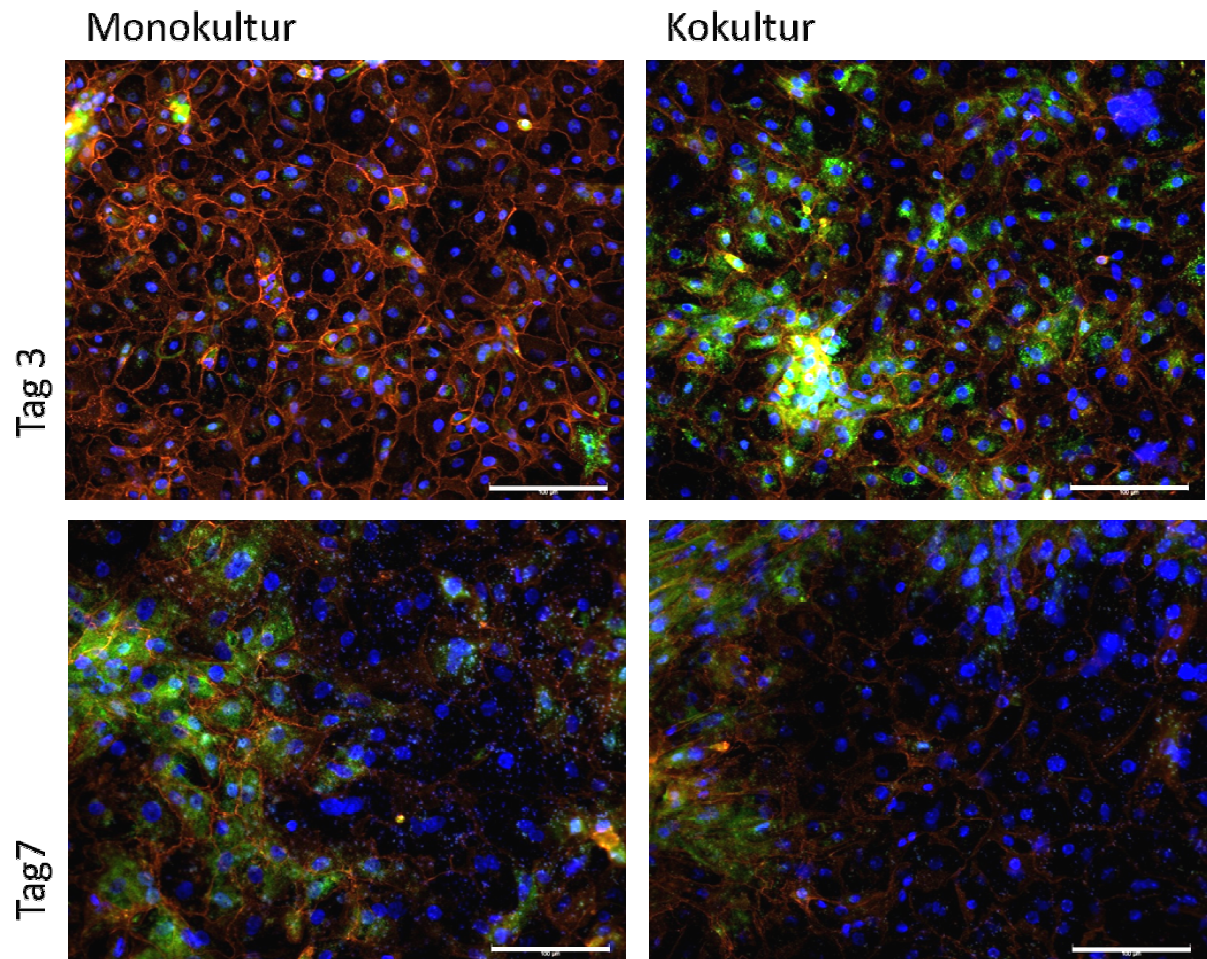


Abb. 15: Morphologischer Vergleich von Mono- und Kokultur: Färbung des apikalen Zelllayers von Mono- und Kokultur des gleichen Spenders an Tag 3 und Tag 7. blau: Nuclei, grün: SP-C, rot: E-Cadherin, Maßstab = 100  $\mu$ m.

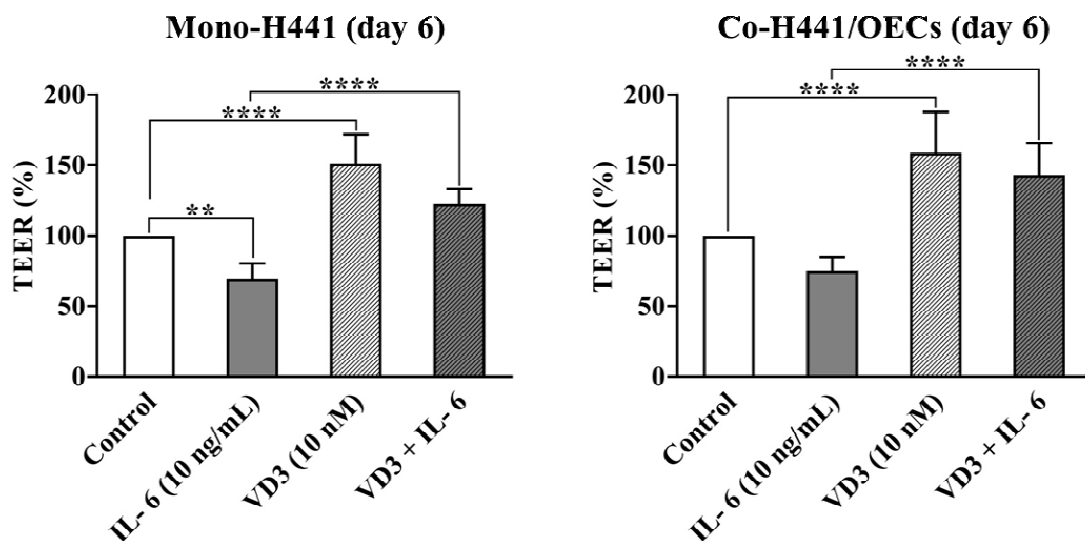


Abb. 18: Einfluss der Vitamin D3 Behandlung auf die elektrische Barriere von H441 Zellen in Mono- und Kokultur mit outgrowth endothelial cells, mit- und ohne Entzündungsreiz durch IL-6. (Xiong et al., 2023)

## 9 Publikationen

Aus dem Projekt der vorliegenden Arbeit sind folgende Publikationen hervorgegangen:

01.2021:

N-Terminomics for the Identification of In Vitro Substrates and Cleavage Site Specificity of the SARS-CoV-2 Main Protease, *Proteomics*  
(Koudelka et al., 2021)

04.2023:

Lung Cell Type-Specific Effects and Molecular Mechanisms Induced by 1 $\alpha$ , 25-Dihydroxyvitamin D3, *International Journal of Molecular Sciences*,  
(Xiong et al., 2023)

10.2024:

Effekte von Vitamin D3 auf die DCLK1 Expression und Proliferation alveolärer Epithelzellen in Primärkulturen. *Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie 2024*.  
DOI: 10.3205/24dkou255, URN: urn:nbn:de:0183-24dkou2553,  
(Krantz S., Fitschen-Oestern S., Seekamp A., Fuchs S. , 2024)



## 10 Danksagung

Mein allererster und größter Dank gilt Frau Prof. Dr. Sabine Fuchs für jede Minute an Rat, Hilfe und Geduld beim Betreuen meiner Arbeit, für jede wertvolle Anregung und das sorgfältige Spiegeln und Abwägen meiner Gedanken und Ideen, für Ermutigung und Korrektur - vor allem aber für die ansteckende Begeisterung für die Arbeit mit Primärzellen, die sich schnell und nachhaltig auf mich übertragen hat. Vielen Dank! Ich werde diese Zeit mein Leben lang schätzen.

Ein herzliches Dankeschön geht außerdem an meine Mitbetreuerin Dr. Stephanie Fitschen-Oestern, sowie an Junyu Xiong und Anne-Rose Nissen für geduldiges und willkommenheißendes Einarbeiten, Start- und Organisationshilfe und jedes auflockernde Gespräch zwischendurch. Danke auch an Dr. Julia Ohmes, die ich jederzeit alles fragen durfte, und deren Antworten viele Prozesse enorm erleichtert haben. Und an Nora Kirsten, mit der die langen Isolationsabende und Laborwochenenden zu einer überaus lustigen und erfrischenden Begegnung wurden.

Vielen herzlichen Dank an die medizinische Fakultät, die mir mit einem Promotionsstipendium ermöglicht hat, meiner Arbeit im Labor ein Semester ungeteilter Aufmerksamkeit zu widmen, was vor allem die Koordination mit dem Operationsteam sehr vereinfacht, aber auch maßgeblich zur Qualität der vorliegenden Arbeit sowie meines Medizinstudiums beigetragen hat.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie, die mich in dem gesamten Prozess mit Liebe, Interesse, Vorerfahrung, Ermutigung und ganz praktischem Rückhalt immer wieder angefeuert, aufgebaut und begleitet hat.

Und nicht zuletzt, sondern hier an herausgehobener Stelle, möchte ich jedem Patienten und jeder Patientin danken, der sein/die ihr Gewebe für meine Arbeiten zur Verfügung gestellt hat! Ohne diese so konkrete Einwilligung - inmitten einer akuten und lebensverändernden Erkrankungssituation - wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ich bin mir dem Wert dieser Entscheidung sehr bewusst und hoffe, mich mit dieser Dissertation ihrer als würdig zu erweisen.