

Schlussbericht zum Teilvorhaben

Teil I - Kurzbericht

3D Lungenorganoid-Reporter-Plattform zur Testung von Wirkstoffen – Das Atemwegsepithel als therapeutisches Target – 3D-REPLACE (Teilprojekt 1)

Im Rahmen des BMBF Förderprogrammes

„Alternativmethoden zum Tierversuch“

Zuwendungsempfänger: Universität des Saarlandes, Klinik für Innere Medizin V-Pneumologie, Allergologie, Beatmungsmedizin und Zentrum für Human- und Molekularbiologie und Experimentelle und Klinische Pharmakologie

Förderkennzeichen: 03LW0140K

Laufzeit des Vorhabens: 01.04.2022 – 31.12.2024

Berichtszeitraum: 01.04.2022 – 31.12.2024

Erstellt von: Prof. Dr. Christoph Beißwenger, Univ.-Prof. Dr. Daniela Yildiz

Im Rahmen von 3D-REPLACE wurde eine personalisierte auf humanen 3D-Lungenorganoiden-basiernde Analyseplattform als Alternative zum Tierversuch aufgebaut. Diese Plattform ermöglicht es, Krankheitsmechanismen aufzuklären und potenzielle Wirkstoffe hinsichtlich ihres Einflusses auf die Zelldifferenzierung und entzündliche Prozesse des Lungenepithels im Semi-Hochdurchsatzverfahren zu testen. Das Vorhaben knüpfte an den aktuellen Stand der Zellkulturtechnologien an, insbesondere an die Nutzung von Organoidmodellen zur präklinischen Testung von Substanzen.

Es wurden Patientenproben primärer Lungenepithelstammzellen gesammelt und eine Biobank mit über 90 Proben aufgebaut. Es wurden Organoidkulturen für die gesamte Laufzeit des Projekts bereitgestellt. Für die Kultivierung von Organoiden wird standardmäßig Matrigel verwendet, das aus tumorbelasteten Mäusen gewonnen wird. Im Verlauf des Projekts wurde ein Matrigel-freies Organoidmodell etabliert, wodurch die ethischen Grundsätze des 3R-Prinzips über das erwartete Ziel hinaus adressiert wurden. Dieses Modell wurde signifikant weiterentwickelt und charakterisiert. Mittels Proteom- und Einzelzellanalysen konnte gezeigt werden, dass die Inkubation mit dem Zytokin IL-13 zu sekretorischen Organoiden führte. IL-13 ist ein entscheidendes Zytokin bei der chronischen Entzündung der Lunge. Die IL-13-behandelten Organoide wiesen eine verminderte Beweglichkeit auf und exprimierten IL-13-induzierte Faktoren wie ALOX15 und FCGBP.

Das Matrigel-freie Modell bildete die Grundlage für die Entwicklung des Differenzierungs-Reporter-Assays. Über lentivirale Vektoren wurden die Gene für fluoreszierende Markerproteine in Lungenorganoiden unter Genpromotoren eingebracht, welche Zelltypspezifisch angeschaltet werden und damit die Differenzierung anzeigen (FOXJ1 für Zilienzellen, ALOX15 für sekretorische Zellen, p63 für Basalzellen). Es wurden Stammzellen zahlreicher Spender mit den verschiedenen lentiviralen Partikeln transduziert und in 96-Well-Platten zu Organoiden differenziert. Die durch IL-13 verursachte Hemmung der Bildung der Zilien und die gesteigerte Expression von sekretorischen Faktoren spiegelte sich auch im Differenzierungs-Reporter-Assay wieder. So konnte z.B. eine signifikante Zunahme der Fluoreszenz bei mit FOXJ1-Reporter-Vektoren transduzierten Stammzellen im Verlauf der Differenzierung gemessen werden. Die Behandlung mit IL-13 führte zu einem verminderten Signal für FOXJ1 und einem gesteigerten Signal für ALOX15. Die Inhibition IL-13-induzierter Signalwege mit Wirkstoffen, die zum Beispiel JAK-Abhängige Signalwege adressieren, hemmte den Effekt von IL-13 hinsichtlich der Signale für FOXJ1 und ALOX15. Zusätzliche histologische, mikroskopische und molekularbiologische Analysen bestätigten, dass der Reporter-Assay die Differenzierung der Organoide richtig wiedergibt.

Es wurde ein Seneszenz-Assay im 96-Well-Format entwickelt, unter anderem mittels Doxorubicin-induzierter Seneszenz und der Verwendung von Senolytika wie Quercetin und Dasatinib. Die durchgeführten Experimente belegten, dass Doxorubicin Seneszenz in

Organoiden induziert, während die pharmakologische Intervention mit Senolytika seneszente Zellen in den Organoiden verringerte. Einzelzellanalysen bestätigten das Vorhandensein typischer Atemwegsepithelzelltypen wie Basalzellen, sekretorische Zellen, Becherzellen, deuteromale Zellen und Zilienzellen. Zudem wurde ein Cluster mit Seneszenz-artigen Zellen identifiziert, dessen Anteil nach Gabe von Quercetin signifikant reduziert war.

Epigenetische Analysen wurden mit patientenbezogenen Organoiden durchgeführt, die aus Stammzellen von Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen differenziert wurden. Hierbei wurden differentiell methylierten Gene identifiziert, die mit der Ziliogenese in Zusammenhang stehen, darunter WRAP78.

Es wurden Wirkstoffe hinsichtlich Toxizität und Entzündung mittels molekularbiologischer und biochemischer Testverfahren geprüft. Anknüpfend werden im Anschluss an dieses Vorhaben interessante Kandidaten weiter charakterisiert.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass durch die Förderung von 3D-Replace eine 3D-Lungenorganoid-Plattform für präklinische Tests von Wirkstoffen etabliert werden konnte. In der 96-Well-Plattform lassen sich verschiedene Endpunkte innerhalb eines einzigen Versuchszyklus erfassen. Fluoreszenzmessungen und mikroskopische Aufnahmen können direkt in der Platte durchgeführt werden, während Faktoren wie Zytokine in den Überständen analysiert werden können. Zudem ermöglichen zahlreiche Methoden, darunter biochemische Assays und Einzelzellsequenzierungen, weiterführende und mechanistische Untersuchungen an isolierten Organoiden. Die Verwendung Matrigel-freier Organoide im Differenzierungs-Reporter-Assays stellt einen großen Fortschritt im Sinne des 3R da und kann sowohl in der Regulatorik als auch der Grundlagenforschung implementiert werden.

Die wissenschaftliche Verwertung der Ergebnisse erfolgte durch Publikationen in anerkannten internationalen Journalen sowie durch Präsentationen auf nationalen und internationalen Konferenzen. Im Rahmen des Projekts wurden 2 naturwissenschaftliche Promotion, eine medizinische Promotion und eine Masterabschlussarbeit erarbeitet. Die erarbeiteten Modelle sind essenziell für laufende Projekte und haben bereits zur Anwerbung weiterer Drittmittel beigetragen. Des Weiteren erfolgt die Verwendung der Systeme in Repurposing-Vorhaben.

Schlussbericht zum Teilvorhaben

Teil II - Eingehende Darstellung

3D Lungenorganoid-Reporter-Plattform zur Testung von Wirkstoffen – Das Atemwegsepithel als therapeutisches Target – 3D-REPLACE (Teilprojekt 1)

Im Rahmen des BMBF Förderprogrammes

„Alternativmethoden zum Tierversuch“

Zuwendungsempfänger: Universität des Saarlandes, Klinik für Innere Medizin V-
Pneumologie, Allergologie, Beatmungsmedizin und Zentrum für
Human- und Molekularbiologie und Experimentelle und Klinische
Pharmakologie

Förderkennzeichen: 03LW0140K

Laufzeit des Vorhabens: 01.04.2022 – 31.12.2024

Berichtszeitraum: 01.04.2022 – 31.12.2024

Erstellt von: Prof. Dr. Christoph Beißwenger, Univ.-Prof. Dr. Daniela Yildiz

Inhaltsverzeichnis

1. Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele...3
2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises...10
3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit...10
4. Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse...10
5. Fortschritt anderer Stellen auf dem Gebiet während des Vorhabens...11
6. Veröffentlichungen
 - a. Erstellte Veröffentlichungen und Vorträge...11
 - b. Auflistung der im Rahmen des Projekts betreuten studentischen Arbeiten...12

1 Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

Das primäre Ziel von 3D-REPLACE war der Aufbau einer personalisierten humanen 3D Lungenorganoid-basierten Analyseplattform als Alternative zum Tierversuch. Diese ermöglicht, Krankheitsmechanismen aufzuklären und potentielle Wirkstoffe wie antiphlogistische Naturstoff(extrakt)e hinsichtlich ihres Einflusses auf die Zelldifferenzierung und entzündlichen Prozesse des Lungenepithels im Hochdurchsatzverfahren (HTS) zu testen.

Die Ergebnisse der durchgeführten Arbeiten werden im Folgenden entsprechend der Planungsstruktur des Projekts nach Arbeitspaketen gegliedert dargestellt. Inhaltlich werden dabei nur die Arbeitspakete betrachtet, die von der UdS bearbeitet wurden. Die vom Projektpartner 2 (HIPS) übernommenen Arbeitspakete werden nicht detailliert behandelt. Allerdings werden die an den Schnittstellen durchgeführten Arbeiten der UdS beschrieben und gemäß Arbeitsplan den entsprechenden Arbeitspaketen zugeordnet.

AP1 - Aufbau der Biobank

In AP 1 wurden Patientenproben (primärer Lungenepithelstammzellen) gesammelt. Es wurden über 90 Proben gesammelt. Es wurden über die gesamte Projektlaufzeit ausreichend Zellen isoliert und kultiviert.

AP2 Organoidkulturen

Es wurden über die Laufzeit des gesamten Projekts Organoidkulturen angelegt und für die einzelnen AP zur Verfügung gestellt. Da Matrigel während der Corona-Zeit nicht erhältlich war, wurden für die Erarbeitung des Differenzierungs-Reporter-Assays auf ein kürzlich publiziertes Matrigel-freies Organoid Modell zurückgegriffen. Dies ist im Sinne der Grundsätze des 3R, da Matrigel aus Tumor-belasteten Mäusen gewonnen wird. Wir haben das Matrigel-freie Organoid-Modell signifikant weiterentwickelt und charakterisiert. Mittels Proteom-Analysen und Einzelzellanalysen, welche zusätzlich aus eigenen Mitteln finanziert wurden, zeigten wir, dass die Inkubation mit dem Zytokin IL-13 zu sekretorischen Organoiden führte. IL-13 ist ein entscheidendes Zytokin bei der allergischen Entzündung der Lunge. IL-13-behandelte Organoiden wiesen eine verminderte Beweglichkeit auf und exprimierten IL-13-induzierte Faktoren wie ALOX15 und FCGBP (Abbildung 1). Dieses Modell diene als Grundlage für die Entwicklung des Reporter-Assays.

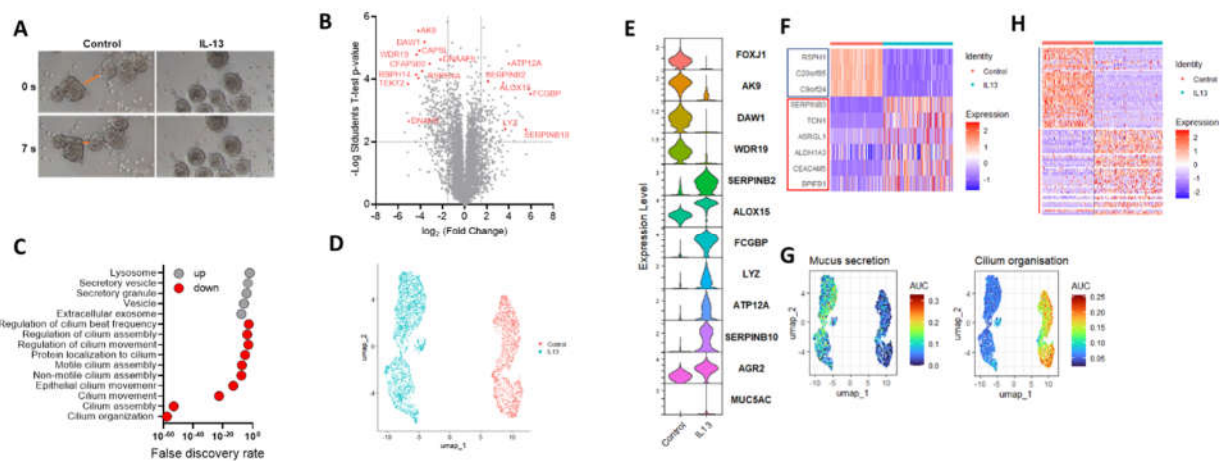


Abbildung 1: IL-13 induziert einen sekretorischen Phänotyp in Matrigel-freien Organoiden. (A) Phasenkontrastbilder der Organoiden. Die roten Balken zeigen die Bewegung der Organoiden nach 7 Sekunden. (B) Unterschiedlich exprimierte Proteine in IL-13-behandelten Organoiden im Vergleich zu Kontroll-Organoiden. (C) GO-Term-Anreicherung (biologische Prozesse) für unterschiedlich häufig vorkommende Proteine. (D) UMAP-Visualisierung nach Gruppen gefärbt. (E) Violinplots mit ausgewählten IL-13-regulierten Genen. (F) Heatmap für Marker von Flimmerzellen (blaue Box) und sekretorischen Zellen (rote Box). (G) Angezeigte Signalwege wurden mittels AUCCell analysiert. (H) Heatmap für Gene, deren entsprechende Proteine in der Proteomanalyse unterschiedlich exprimiert werden (blauer Balken: 282 herunterregulierte Proteine; roter Balken: 174 hochregulierte Proteine).

AP3 Histologische Analyse der Organoiden

Es wurden Organoiden in Paraffin eingebettet und hinsichtlich der Mukusbildung sowie Zilien- und Basalzellen analysiert. Es wurden fortlaufend begleitend zu den Versuchen und Testungen Organoiden analysiert. Dies führte unter anderem zu folgenden Ergebnissen: Mit verschiedenen lentiviralen Partikeln transduzierte Stammzellen differenzieren zu Organoiden mit Zilienzellen. IL-13 induziert die Expression von Muzinen und IL-13 regulierten Genen wie FCGBP und ALOX15 und hemmt die Zilienbildung (Beispiel Abbildung 2). Diese histologischen Analysen wurden bedarfsgerecht über die gesamte Laufzeit des Projekts durchgeführt.

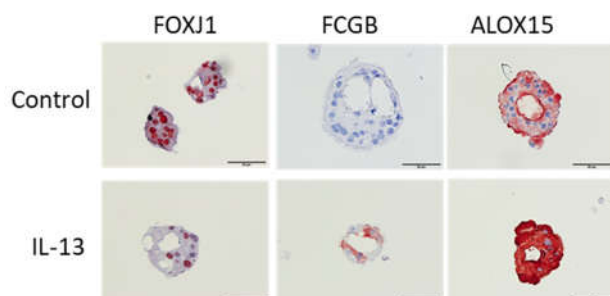


Abbildung 2: Immunhistologische Färbungen von Organoiden, die in Anwesenheit von Kontrollmedium oder IL-13 differenziert wurden. Folgende Marker wurden unter anderem verwendet: FOXJ1, Zilien-tragende Zellen; FCGBP und ALOX15, IL-13-regulierte Gene.

AP4 - Klonierung der Vektoren

In Arbeitspaket 4 wurden die Vektoren für das gesamte Vorhaben entwickelt und für weitere Arbeiten zur Verfügung gestellt. Im Berichtszeitraum wurden unter anderem Vektoren für FOXJ1, ALOX15 und p63 entwickelt. Die entwickelten Vektoren und lentiviralen Partikel wurden für das Vorhaben zur Verfügung gestellt.

AP5 - Entwicklung des Differenzierungs-Reporter-Assays

Da während der Corona-Zeit es kaum möglich war, Matrigel zu erwerben, wurde das Organoid-Modell auf ein Matrigel-freies System umgestellt. Wir haben ein kürzlich publiziertes Protokoll weiterentwickelt und unter anderem mittels Einzelzellanalysen (siehe oben) charakterisiert. Es wurden Stammzellen mit verschiedenen lentiviralen Partikeln transduziert und in 96-Well-Platten zu Organoiden differenziert. Es wurden unter anderem Vektoren für FOXJ1, MUC5AC, ALOX15 und p63 entwickelt und weitergehend validiert. Die histologischen Analysen sowie Evaluation unter dem Phasenkontrastmikroskop zeigten, dass die Zytokine (IL-13, IFN γ) die Ziliogenese hemmen und Mukusbildung und sekretorische Faktoren induzieren. Dies spiegelte sich auch im Differenzierungs-Reporter-Assay wieder. So konnte z.B. eine signifikante Zunahme der Fluoreszenz bei mit FOXJ1-Reporter-Vektoren transduzierten Stammzellen im Verlauf der Differenzierung gemessen werden. Die Behandlung mit IL-13 führte zu einem verminderten Signal für FOXJ1 und einem gesteigerten Signal für ALOX15. Die Inhibierung IL-13-induzierter Signalwege (z.B. JAK-Abhängige Signalwege) hemmte den Effekt von IL-13 hinsichtlich der Signale für FOXJ1 und ALOX15 (Abbildung 3). Eine Publikation zu diesem Modell wurde eingereicht und befindet sich in der Begutachtung.

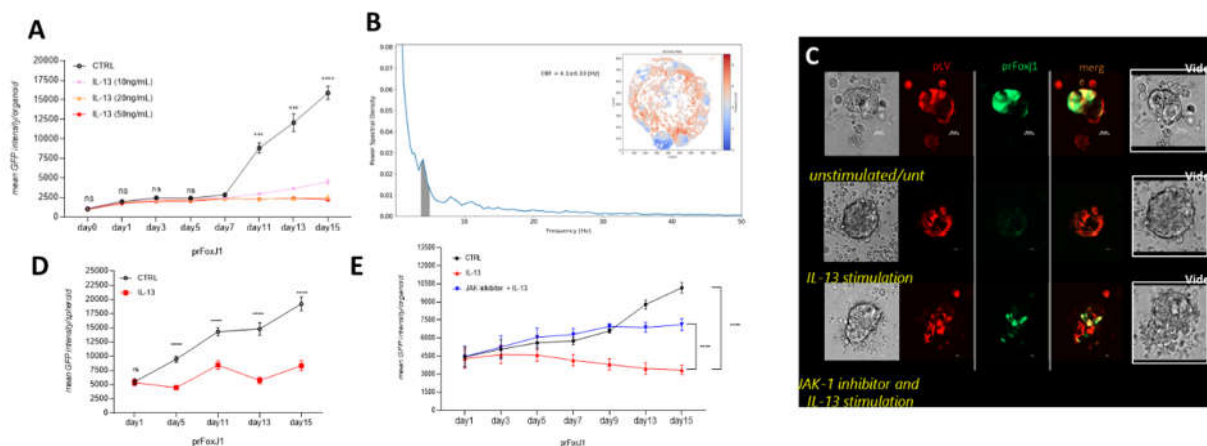


Abbildung 3: Reporter Assay. (A) Organoide wurden mit plv-MRSG-prFOXJ1-GFP transduziert, nachdem sie zweimal wöchentlich mit steigenden Konzentrationen des rekombinanten humanen IL-13-Zytokins (10ng/mL, 20ng/mL, 50ng/mL) stimuliert worden waren, und die mittlere Fluoreszenzintensität von eGFP wurde mit dem automatischen Mikroskop-Lesegerät Lyonheart FX von Agilent erfasst. (B) Repräsentatives Diagramm und Aktivitätskarte, die die Zilienschlagfrequenz (Hz) und die Aktivitätsverteilung einer Kontrolle. (C) Repräsentative konfokale und Hellfeld-Bilder für alle Bedingungen aufgenommen, und Videos wurden mit 15 Bildern pro

Sekunde aufgezeichnet. (D) Organoide von sieben weiteren Spendern wurden auf FOXJ1-Genexpression untersucht. (F) Organoide wurden 24 Stunden lang mit 5 μ M JAK-Inhibitor 1 vorbehandelt und dann zweimal wöchentlich mit IL-13 stimuliert.

AP6 - Biochemische und physiologische Testverfahren

Es wurden in Endpunktmessungen Verfahren zur Bestimmung der Zellproliferation, Stoffwechselaktivität, Viabilität und Apoptose etabliert und angewendet. Im laufenden Projekt wurden die etablierten Testverfahren routinemäßig zur Testung der Toxizität und Viabilität in den Versuchen der verschiedenen Arbeitspakete verwendet. Bei der Entwicklung des Differenzierungs-Reporter-Assay und des Seneszenz-Assay sowie der Testung von Wirkstoffen konnten mittels begleitender biochemischer und physiologischer Testverfahren (z.B. LDH-Messung, MTT-Assay) toxikologische Effekte ausgeschlossen bzw. bei hoher Dosierung der Wirkstoffe aufgezeigt werden.

AP7 - Seneszenz-Assay und Messung von Entzündungsmediatoren

Im laufenden Projekt wurde ein Seneszenz-Assay im 96-Well-Format unter anderem mittels Doxorubicin-induzierter Seneszenz, den Senolytika Quercetin und Dasatinib, der Messung der Seneszenz-assoziierten Beta-Galaktosidase und Einzelzellanalysen (nicht Teil dieses Vorhabens) entwickelt. Die durchgeführten Experimente zeigten, dass Doxorubicin Seneszenz in Organoiden induziert und dass die pharmakologische Intervention mittels Senolytika seneszenten Zellen in den Organoiden verringert und der Seneszenz-Assay zur Testung von Wirkstoffen geeignet ist (Abbildung 4). Die Messung von Entzündungsmediatoren und der Viabilität zeigte, inwiefern die ausgewählten Wirkstoffe Entzündungsprozesse beeinflussen und toxisch sind.

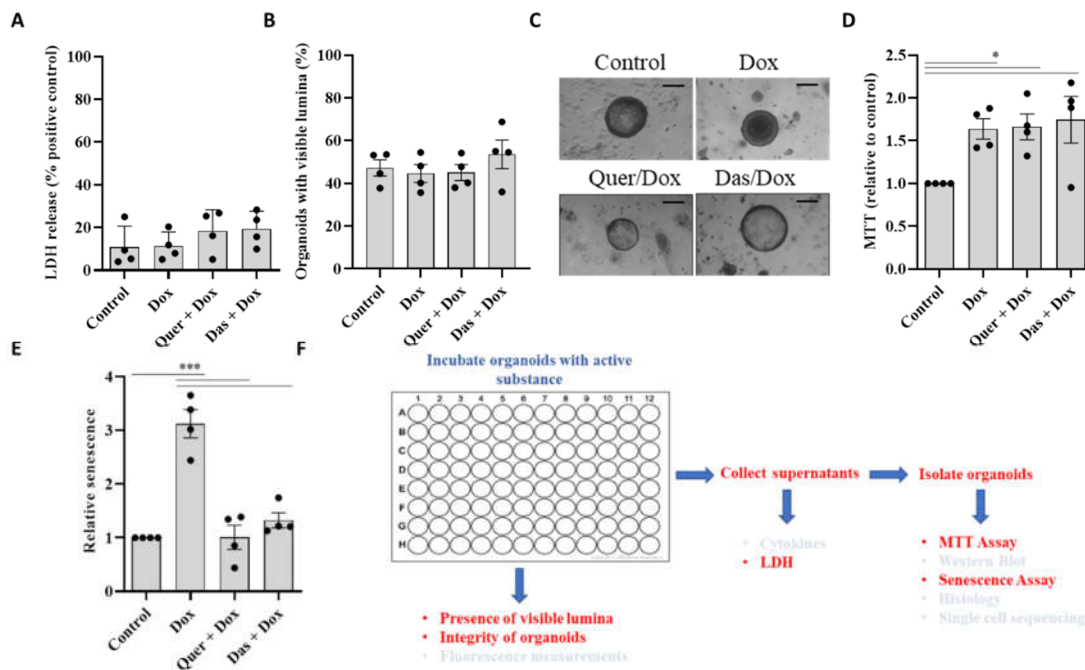


Abbildung 4: Quercetin und Dasatinib wirken der Doxorubicin-induzierten Seneszenz entgegen. (A) Abgabe von LDH. (B) Anteil der Organoide mit sichtbarem Lumen. (C) Repräsentative Phasenkontrastbilder von Organoiden. (D) MTT-Assay. (E) SA- β -gal-Aktivität. (F) Schema der 3D-Lungenorganoid-Plattform für präklinische Tests von Wirkstoffen. In der 96-Well-Plattform können verschiedene Endpunkte in einem Versuchsdurchlauf gemessen werden. Fluoreszenzmessungen und mikroskopische Bilder können direkt in der Platte aufgenommen werden. Verschiedene Faktoren wie Zytokine können in den Überständen gemessen werden. Zahlreiche Methoden wie biochemische Assays und Einzelzellsequenzierung können mit isolierten Organoiden.

Einzelzellanalysen wiesen in den Organoiden die das typische Atemwegsepithel aufbauenden Zellen nach (Basal-, sekretorische-, Becher-, deuterosomale- und Zilienzellen). Zudem konnte ein Cluster mit Seneszenz-artigen Zellen identifiziert werden. Der Anteil dieses Clusters war nach Gabe von Quercetin signifikant vermindert (Abbildung 5). Die Behandlung mit Doxorubicin führte hingegen zu einer gesteigerten Expression von Entgiftungsgenen in Becherzellen.

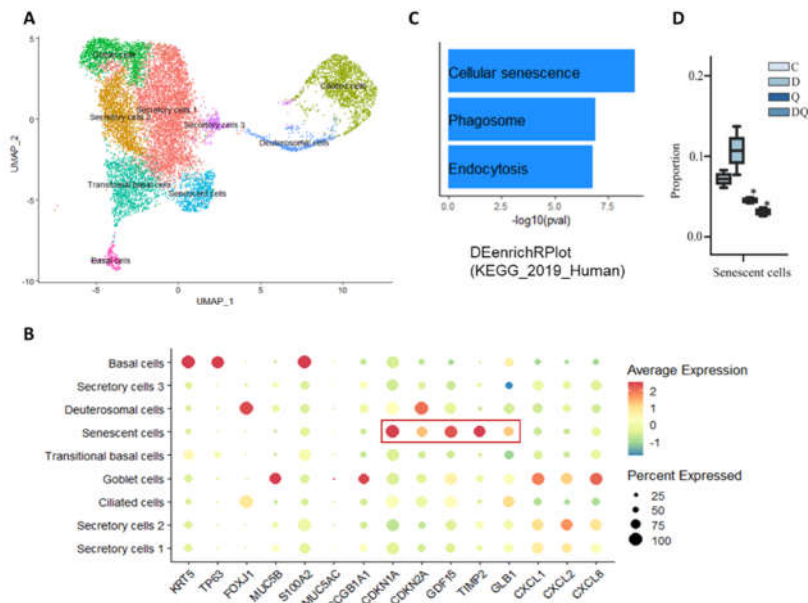


Abbildung 5: scRNA-seq-Analyse zeigt unterschiedliche Epithelzellpopulationen. A) UMAP-Visualisierung der wichtigsten Epithelzelltypen. B) Punktdiagramm für Marker von Epithelzellen. C) Balkendiagramm für KEGG-Wege in Doxorubicin-behandelten Organoiden. D) Anteil des seneszenten Zellclusters an allen Clustern.

Diese Ergebnisse wurden publiziert:

Brand M, Ritzmann F, Kattler K, Milasius D, Yao Y, Herr C, Kirsch SH, Müller R, Yildiz D, Bals R, Beisswenger C. Biochemical and transcriptomic evaluation of a 3D lung organoid platform for pre-clinical testing of active substances targeting senescence. *Respir Res.* 2024 Jan 3;25(1):3.

AP9 - Toxikologische Voruntersuchungen

Um eine Verfälschung der Messergebnisse durch Einflüsse auf die Viabilität und Vitalität der Zellen ausschließen zu können, wurden die primär isolierten Atemwegsepithelzellen nach lentiviraler Transduktion folgendermaßen untersucht (MTT-Assay; LDH-Aktivität) Nachweis apoptotischer/nekrotischer Zellen. Selbige Untersuchungen wurden für die Substanzen der Naturstoffbank durchgeführt und die LD50-Werte vorgenommen.

AP10 Testung von Wirkstoffen (Verbundpartner 1 und 2)

Es wurden Wirkstoffe hinsichtlich Toxizität und Entzündung mittels molekularbiologischer und biochemischer Testverfahren geprüft (Beispiel Abbildung 6). Anknüpfend werden im Anschluss an dieses Vorhaben interessante Kandidaten weiter charakterisiert. Die Ergebnisse werden von Projektpartner 2 zeitnah verwertet oder publiziert.

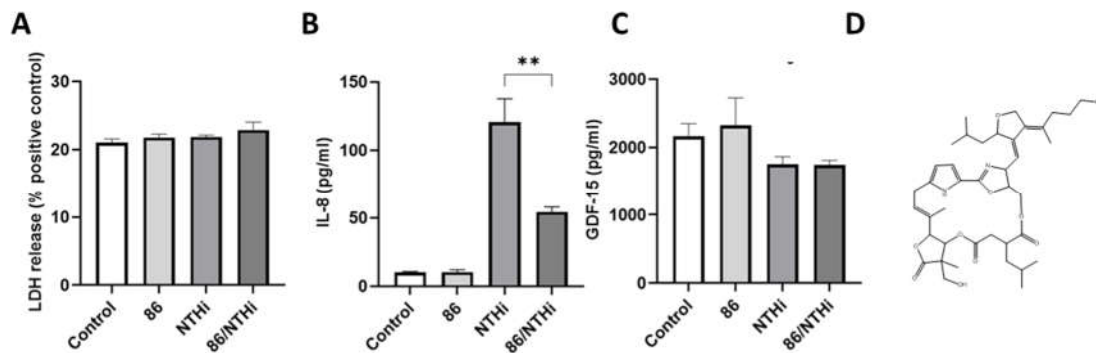


Abbildung 6: Beispiel eines Wirkstoffs, der Entzündung hemmt, ohne toxisch zu wirken. Abgabe von A) LDH, B) des inflammatorischen Zytokins IL-8 und C) des Stressfaktors GDF-15. D) Strukturformel.

AP11 - Epigenetische Charakterisierung der patienten-bezogenen Kulturen für die personalisierte Medizin

Es wurden epigenetische Analysen mit Organoiden differenziert aus Stammzellen von Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen durchgeführt. Gene, die mit Ziliogenese im Zusammenhang stehen wie WRAP78 zeigten sich differentiell methyliert (Abbildung 7). Parallele mRNA-Analysen zeigen, dass diese Gene auch differenziell exprimiert werden.

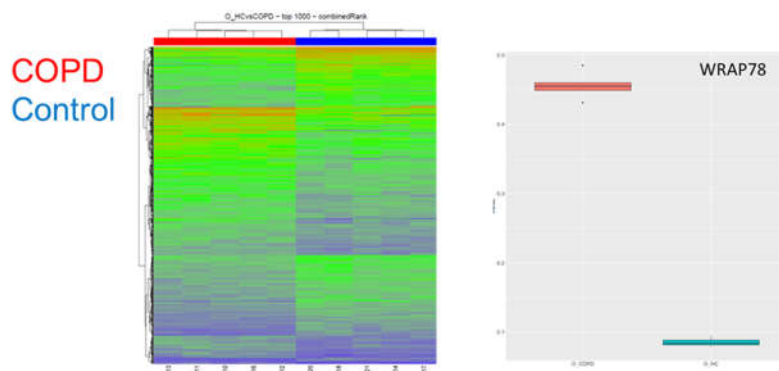


Abbildung 7: Epigenetische Analysen zeigten, dass Gene, die mit der Ziliogenese im Zusammenhang stehen, bei Organoiden aus COPD-Patienten differentiell methyliert sind. A) Heatmap. B) Methylierung von WRAP78.

Eine Publikation bzw. die Verwertung der Ergebnisse werden zünftig angestrebt.

Fazit:

Es konnte eine 3D-Lungenorganoid-Plattform für präklinische Tests von Wirkstoffen etabliert werden. In der 96-Well-Plattform lassen sich verschiedene Endpunkte innerhalb eines einzigen Versuchszyklus erfassen. Fluoreszenzmessungen und mikroskopische Aufnahmen können direkt in der Platte durchgeführt werden, während Faktoren wie Zytokine in den

Überständen analysiert werden können. Zudem ermöglichen zahlreiche Methoden, darunter biochemische Assays und Einzelzellsequenzierungen, weiterführende Untersuchungen an isolierten Organoiden. Die Entwicklung von Vektoren mit zwei Markergenen stellte sich jedoch als wenig zielführend dar, da diese Vektoren trotz minimaler Backbone-Größe für die effiziente Verpackung in lentivirale Partikel zu groß waren und zwingendermaßen ein Sortierungsschritt erforderlich war. Daher wurde dieser Ansatz nicht weiterverfolgt. Die Ergebnisse der epigenetischen Analysen werden in an das Vorhaben anschließenden Projekten weiterbearbeitet bzw. vollendet und möglichst zeitnah publiziert oder wirtschaftlich verwertet. Die Verwendung Matrigel-freier Organoide im Differenzierungs-Reporter-Assays stellt einen großen Fortschritt im Sinne des 3R da.

2 Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Der Kostenplan für das gesamte Projekt konnte eingehalten werden. Die Laufzeit des Projekts wurde kostenneutral auf den 31.12.2024 verlängert.

Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises umfassen Personalmittel, Medien für die Zellkultur, Arrays für die epigenetischen Analysen, Antikörper für die Histologie, LDH- und MTT-Assays begleitend für die Zellkultur, molekularbiologische Reagenzien für die Erstellung der lentiviralen Vektoren.

3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Ohne die Zuwendung wären beide Projektpartner nicht in der Lage gewesen, das Vorhaben zu bearbeiten und die erzielten Ergebnisse zu realisieren. Nur durch die Förderung konnten die Reporter-Assays entwickelt und evaluiert werden. Die Ergebnisse konnten publiziert werden, und die Antragsteller befinden sich im Austausch mit Firmen zwecks weiterer Verwertung des Modells.

Die Forschungsarbeiten wurden weitgehend gemäß der ursprünglichen Projektplanung und den dafür vorgesehenen Zuwendungen durchgeführt, mit lediglich wenigen ergebnisbedingten Anpassungen. Die im Arbeitsplan festgelegten wissenschaftlichen Fragestellungen konnten weitgehend erfolgreich untersucht und abgeschlossen werden. Das primäre Verwertungsziel – eine frei zugängliche Präsentation der Ergebnisse für die Forschungsgemeinschaft – wurde durch Open-Access-Publikationen erreicht. Die angewendeten Methoden werden bereits bzw. nach weiterer Verwertung auf der Webseite 3r-plattform-saar.de dargestellt. Die Antragsteller befinden sich im Austausch mit Firmen zwecks weiterer Verwertung der erarbeiteten Modelle.

4 Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die wissenschaftliche Verwertung der Ergebnisse erfolgte durch Publikationen in anerkanntes internationales Journal und auf nationalen und internationalen Konferenzen. Im Rahmen des

Projekts erlangte Ergebnisse, wie die epigenetischen Analysen, werden zeitnah verwertet und publiziert. Die erarbeiteten Modelle sind essenziell für laufende Projekte, unter anderem des Anfang 2025 gestarteten DFG-Projekts *DKK3 as master regulator of pulmonary regeneration* (bearbeitet in Innere Medizin V, UDS; Projektnummer 544291623) und einer Anschubfinanzierung der Universität des Saarlandes. Des Weiteren erfolgt die Verwendung der Systeme in Repurposing-Vorhaben. Die Basis-Vektoren sind Bestandteil von Projekten in einer SFB-Verbundinitiative der Universität des Saarlandes.

Die Veröffentlichung in internationalen Journals und in Vorträgen trägt zur Steigerung der Sichtbarkeit der Ergebnisse bei. Die Modelle sind zentral in verschiedenen studentischen Projekt- und Abschlussarbeiten sowie Dissertationen. Sofern keine anderen Verwendungen entgegenstehen, werden die Modelle auf der Webseite 3r-plattform-saar.de präsentiert.

5 Fortschritt anderer Stellen auf dem Gebiet während des Vorhabens

In einer kürzlich erschienen Arbeit haben Orr et al. die in einen lentiviralen Reporter-gen-Ansatz publiziert, in dem primäre humane Basalzellen mit Biolumineszenz-Reporterkonstrukten transduziert werden und so die epitheliale Differenzierung der Atemwege im Organoid-Modell überwacht wird (doi.org/10.1152/ajplung.00047.2024). Drei Konstrukte wurden entwickelt, die von Promotorsequenzen der Gene TP63, MUC5AC und FOXJ1 angetrieben werden, um die Häufigkeit von Basalzellen, mukosekretorischen Zellen bzw. Flimmerzellen quantitativ zu bestimmen. Dieses Modell hat zu dem in diesem Vorhaben entwickelten Modellen folgende (gravierende) Nachteile: 1) Für die Organoide wurde Matrigel aus Tumorbelastrten Mäusen verwendet. Dies ist im Sinne des 3R, wenn immer möglich, zu unterlassen. 2) Es wurden keine pharmakologischen Interventionen vorgenommen. 3) Das Modell wurde nicht mittels OMICS wie Einzelzellsequenzierung charakterisiert.

6 Veröffentlichungen

6.1 Erstellte Veröffentlichungen und Vorträge

- Brand M, Guedes MS, Ritzmann F, Risch T, Kempen K, Kamyschnikow A, Herr C, Langer F, Bals R, Beisswenger C, Yildiz D: A lentiviral reporter platform for live imaging & drug screening in matrigel-free apical-out airway organoids. Eingereicht bei ALTEX.
- Brand M, Ritzmann F, Kattler K, Milasius D, Yao Y, Herr C, Kirsch SH, Müller R, Yildiz D, Bals R, Beisswenger C: Biochemical and transcriptomic evaluation of a 3D lung

organoid platform for pre-clinical testing of active substances targeting senescence
Respir Res. 2024 Jan 3;25(1):3. doi: 10.1186/s12931-023-02636-7.

- Yao Y, Ritzmann F, Mieth S, Kattler-Lackes K, Colakoglu B, Herr C, Kamyschnikow A, Brand M, Garn H, Yildiz D, Langer F, Bals R, Beisswenger C: Co-culture of human AT2 cells with fibroblasts reveals a MUC5B phenotype: insights from an organoid model. Mol Med. 2024 Nov 23;30(1):227. doi: 10.1186/s10020-024-00990-w.

6.2 Poster und Vorträge (Auswahl)

- Mariana Guedes: “A novel lentiviral reporter platform for screening 3D human lung organoids” - 3rd 3R Symposium: Animal-free Methods in Pharmaceutical research, Saarbrücken (2024, Vortrag)
- Mariana Guedes: “Establishing a lentiviral reporter platform for screening 3D human lung organoids: a proof-of-concept approach” – EPAA and YSTA awardee. EUSAAT, Linz (2024, Vortrag)
- Mariana Guedes: “Establishing a lentiviral reporter platform for screening 3D human lung organoids: a proof-of-concept approach” - travel grant awardee. PCRM Summer immersion on innovative approaches in science. Washington DC; USA (2024, Poster)
- Mariana Guedes: “A lentiviral reporter system for live imaging of cell differentiation & mucus production in human lung organoids” - 2023 MPS World Summit, Berlin. (2023, Poster)
- Christoph Beisswenger: 3D lung-organoid platform for the identification of pharmaceutical compounds targeting senescence and inflammation – European Respiratory Society research seminar “Innovative 3D models for understanding mechanisms underlying lung diseases: powerful tools for translational research”, Lissabon (2022, Vortrag)
- Daniela Yildiz: 3D lung-organoid reporter platform for testing of pharmaceutical compounds via high-throughput screening – DGPT Summit 2023
- Christoph Beisswenger: IL-13 drives a mucin phenotype: insights from a human apical out airway organoid model – ERS CONGRESS, Wien (2024)
- Michelle Brand: Biochemical and transcriptomic evaluation of a 3D lung organoid platform for pre-clinical testing of active substances targeting senescence - ISAM Congress, Saarbrücken (2024, Poster).
- Michelle Brand: 3D lung-organoid platform for the identification of pharmaceutical compounds targeting senescence and inflammation. EUSAAT, Linz (2022, Poster)

6.2 Auflistung der im Rahmen des Projekts betreuten studentischen Arbeiten

- Mariana Soares Guedes: „*HTS-Lenti: A high-throughput imaging platform for drug screening in airway organoids – lentiviral reporters as predictive readouts.*“, Promotionsarbeit Dr. rer. nat.
- Michelle Brand: „Biochemische und transkriptomische Bewertung einer 3D-Lungenorganoid-Plattform für präklinische Testung von Wirkstoffen“, Promotionsarbeit Dr. rer. nat.
- Patrick Kempen: „Test von alternativen Medien zur Differenzierung von Matrige-freien Apical Out Organoiden“, Dr. med.
- Natalia Smigielska: „Virales Reporter-System für Alterungs-assoziierte Faktoren des Lungenepithels“ (master thesis, 2024)