

Translationale Medizin

Einzelzellanalysen von Lungenorganoiden in der translationalen Forschung

FELIX RITZMANN¹, DANIELA YILDIZ², CHRISTOPH BEISSWENGER¹

¹ PNEUMOLOGIE, ALLERGOLOGIE, BEATMUNGS- UND UMWELTMEDIZIN, UNIVERSITÄT DES SAARLANDES, HOMBURG

² PRÄKLINISCHES ZENTRUM FÜR MOLEKULARE SIGNALVERARBEITUNG, UNIVERSITÄT DES SAARLANDES, SAARBRÜCKEN

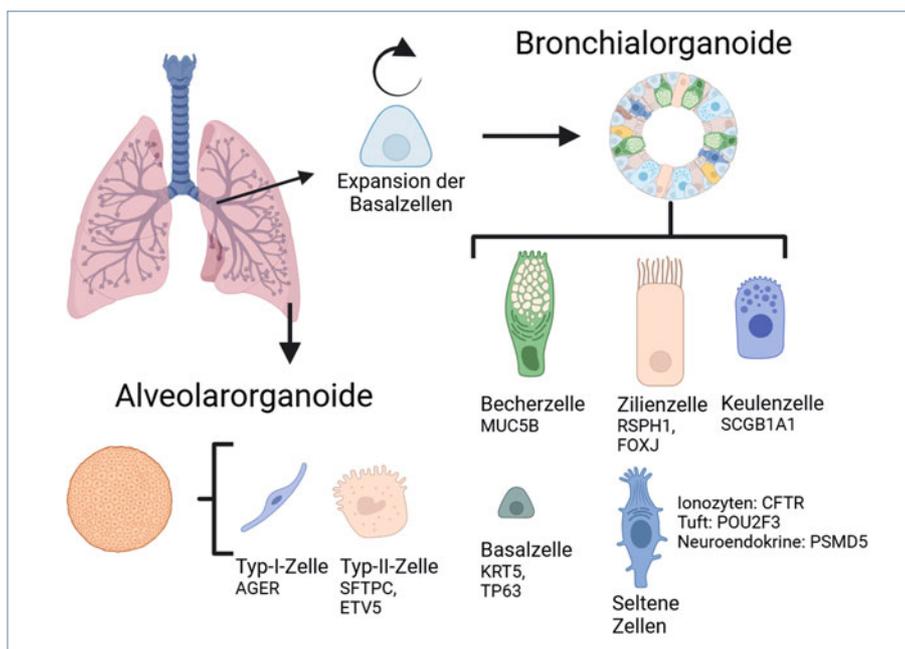
Lung organoids are 3D, self-organizing structures derived from epithelial progenitor cells that replicate key aspects of the human lung. They serve as models for research and drug discovery. Modern methods such as single-cell RNA sequencing elucidate cell differentiation pathways and cellular mechanisms. Comparing results with patient data enhances the relevance of the findings. Organoids provide an ethical alternative to animal experiments and are increasingly replacing animal studies.

DOI: 10.1007/s12268-025-2510-0
© The Author(s) 2025

Das humane Atemwegsepithel erstreckt sich von den oberen Atemwegen bis zu den respiratorischen Bronchiolen. Es besteht aus einem pseudomehrschichtigen Flimmerepithel, dessen Dicke zunehmend abnimmt, je weiter man in die unteren Atemwege vor-

dringt. Hauptbestandteile des Atemwegsepithels sind Basalzellen, Zilienzellen, mukussekernierende Becherzellen und Keulenzellen sowie seltenere Zellen wie Ionozyten. In den Alveolen wird das Alveolarepithel durch Pneumozyten des Typs I und II gebildet. Die sehr dünnen Typ-I-Zellen, die weniger als 1 µm messen, ermöglichen einen effektiven Gasaustausch mit den umgebenden Kapillaren. Typ-II-Zellen besitzen hingegen Stammzelleigenschaften und sind für die Sekretion von Surfactant und anderen Proteinen verantwortlich, die für die Funktionalität der Lunge essenziell sind.

In den letzten Jahren wurden verschiedene Organoid-Modelle entwickelt, die wertvolle Einblicke in die Grundlagenforschung, personalisierte Medizin und die Entwicklung neuer Therapien ermöglichen. Organoide imitieren zentrale Eigenschaften der 3D-Architektur, Zellzusammensetzung und Funktion von Organen, während sie zugleich als zugängliche und vereinfachte Zellkulturmodelle dienen. Der Begriff „Lungenorganoid“ bezeichnet selbstorganisierende Strukturen, die aus Vorläuferzellen des Lungenepithels hervorgehen und in 3D-Kulturen mit oder ohne mesenchymale Zellen differenziert werden. So lassen sich beispielsweise Basalzellen der Atemwege innerhalb von 30 Tagen zu Bronchosphären differenzieren, die aus Basalzellen, Becherzellen, Keulenzellen und Zilienzellen bestehen. Ebenso können humane Lungen-Typ-II-Vorläuferzellen isoliert und zu 3D-Organoiden differenziert werden, die sowohl Typ-II- als auch Typ-I-Zellen enthalten. Solche Modelle ermöglichen es, spezifische Krankheitsprozesse nachzustellen (Abb. 1).



Bronchialorganoid

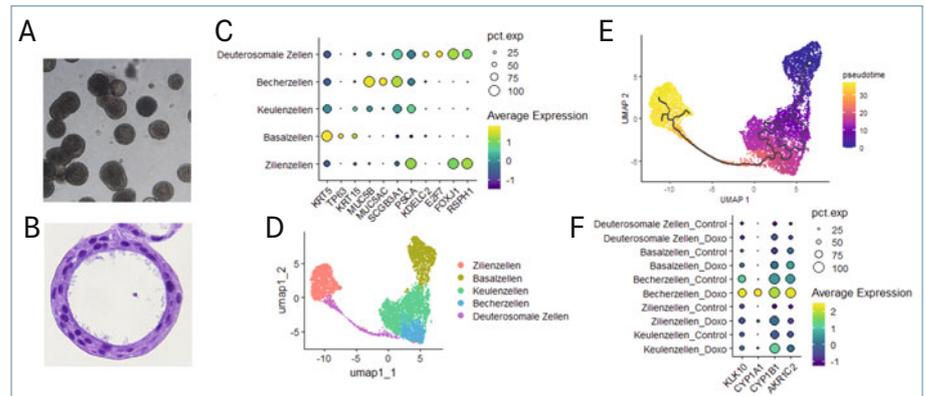
Einzelzellanalysen (scRNA-seq) stellen eine hoch aussagekräftige Methode in der Zellbiologie dar. scRNA-seq-Analysen ermöglichen die Untersuchung der Genexpression auf der Ebene einzelner Zellen. Dadurch können Zelltypen, zelluläre Mechanismen und Signalwege, Zell-Zell-Interaktionen und vieles mehr hochauflösend identifiziert und charak-

▲ Abb. 1: Bronchialorganoiden werden aus Basalzellen differenziert, die aus Bronchien gewonnen werden. In den differenzierten Bronchialorganoiden können die typischen Atemwegszellen unterschieden werden. Alveolarorganoiden werden aus aufgereinigten Typ-II-Zellen differenziert. Es werden allgemein akzeptierte Zellmarker gezeigt. Created in BioRender. Beisswenger C (2025), <https://BioRender.com/e44c175>.

terisiert werden. Mittels scRNA-seq-Analysen unter Verwendung bioinformatischer Methoden wie Trajectory-Analysen lassen sich die Entwicklungswege einzelner Zellen entlang eines Differenzierungsprozesses abbilden. Sie helfen zu verstehen, wie sich eine Zelle von einem Ausgangszustand (z. B. einer Vorläuferzelle) über verschiedene Zwischenstufen in spezialisierte Zelltypen entwickelt. Für das Atemwegsepithel wurde nachgewiesen, dass Basalzellen als Stammzellen nicht nur Becher-, Keulen- und Zilienzellen, sondern auch seltene Zelltypen wie Ionozyten hervorbringen können. Dabei können sich Zilienzellen auch über sekretorische Zellen differenzieren [1].

In verschiedenen Studien haben wir Bronchialorganoide aus Basalzellen differenziert. Diese Organoide bilden Sphären mit einem Hohlraum und weisen Zilien auf (**Abb. 2A** und **B**). Mithilfe von scRNA-seq-Analysen lassen sich in diesen Organoiden die wichtigsten Zelltypen des Atemwegsepithels identifizieren. Dazu wird die Expression zelltypspezifischer Gene untersucht, wie beispielsweise *FOXJ1* für Zilienzellen oder *MUC5B* für Becherzellen (**Abb. 2C** und **D**). Trajectory-Analysen zeigen, dass sich Basalzellen auch in diesem Organoid-Modell über sekretorische und deuteromale Zwischenstufen zu Zilienzellen differenzieren (**Abb. 2E**). Werden diese Organoide mit Zellgiften wie Doxorubicin behandelt, zeigen Becherzellen eine erhöhte Expression von Genen, die an der Entgiftung beteiligt sind (**Abb. 2F**). Dies unterstreicht die Vorteile von Lungen-Organoiden gegenüber konventionellen 2D-Kulturen, in denen zelltypspezifische Effekte nicht erkennbar sind.

In unseren Projekten nutzen wir das Potenzial von Bronchialorganoiden als vielseitiges Modell zur Untersuchung krankheitsrelevanter Prozesse und therapeutischer Ansätze. Wir konnten zeigen, dass bakterielle Bestandteile wie Flagellin aus *Pseudomonas aeruginosa* – einem problematischen Erreger bei der Mukoviszidose – Zilienverlust, übermäßige Schleimbildung und eine Becherzellmetaplasie auslösen [2]. Darüber hinaus haben wir die Wirkung von Protease-Inhibitoren auf die Infektion und Replikation von SARS-CoV-2 getestet [3]. Die Senolytika Quercetin und Dasatinib wirkten im Bronchialorganoid-Modell der durch Doxorubicin induzierten Zellalterung entgegen, ohne toxische Effekte zu verursachen. Dies wurde u. a. durch die Seneszenz-assoziierte β -Galactosidase-Aktivität nachgewie-



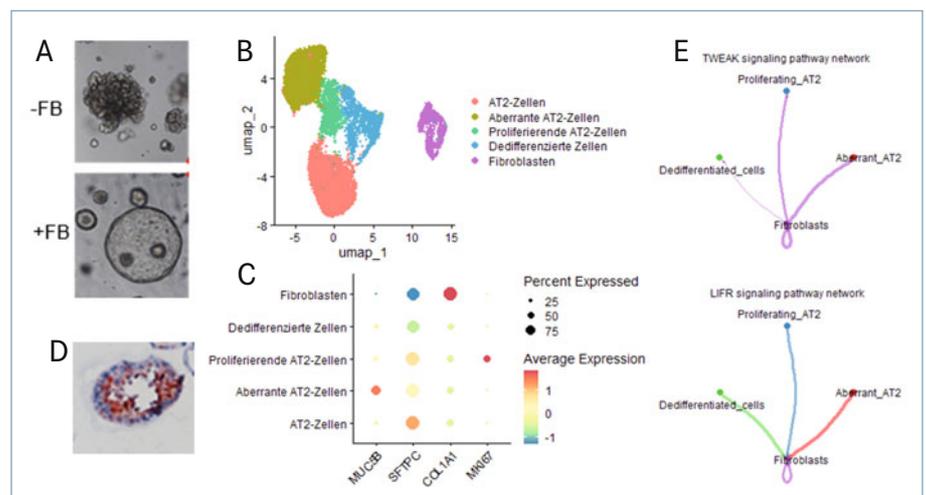
▲ **Abb. 2:** Bronchialorganoide wurden aus Basalzellen des Atemwegsepithels differenziert und mittels Einzelzellsequenzierung analysiert. **A**, Phasenkontrastbild von Organoiden. **B**, H&E-Färbung eines Organoids mit sichtbaren Zilien. **C**, Dotplot mit Zellmarkern (pct exp: Anteil der Zellen, die das Gen exprimieren; Average Expression: die Farben zeigen die Durchschnittliche Expression des Gens). **D**, UMAP (*Uniform Manifold Approximation and Projection*) mit Zelltypen. **E**, Die Trajectory-Analysen zeigt den Differenzierungsweg der Basalzellen ausgehend von den Basalzellen über sekretorische und deuteromale Zellen hin zu Zilienzellen. **F**, Dotplot für Entgiftungsgene exprimiert in Organoiden, die mit dem Zellgift Doxorubicin (Doxo) oder Kontrollmedium (Control) behandelt wurden.

sen. Einzelzellsequenzierungen bestätigten zudem, dass Quercetin den Anteil seneszenten Zellen nach Doxorubicin-Stimulation reduziert [4].

Alveolarorganoide

Eine gestörte Interaktion zwischen Pneumozysten und Fibroblasten spielt eine entscheidende Rolle in der Pathogenese und dem Fortschreiten von Lungenerkrankungen wie der idiopathischen Lungenerkrankung. MUC5B-

Promotervarianten stellen einen dominanten Risikofaktor für die Entwicklung der idiopathischen Lungenerkrankung (IPF) dar. Wir haben die Interaktion zwischen primären Fibroblasten und aus menschlichen Lungen isolierten Typ-II-Zellen mithilfe eines Organoid-Modells untersucht. Dabei wurden die Typ-II-Zellen aus menschlichen Lungen isoliert und über einen Zeitraum von 21 Tagen entweder in Anwesenheit primärer Fibroblasten oder in einem Kontrollmedium als Alveolarorganoide



▲ **Abb. 3:** Typ-II-Zellen wurden aus menschlichen Lungen isoliert und als Alveolarorganoide in Ab- und Anwesenheit von Fibroblasten (FB) für 21 Tage kultiviert. **A**, Phasenkontrastbild von Organoiden. **B**, UMAP mit Zelltypen. **C**, Dotplot mit Zellmarkern. **D**, histologische Färbung für MUC5B (braun gefärbt) eines mit Fibroblasten kultivierten Organoids. **E**, Die Cell-Chat-Analyse zeigt, dass Fibroblasten den TWEAK-Signalweg in den verschiedenen Pneumozysten-Populationen (proliferating AT2, dedifferentiated AT2, aberrant AT2) aktivieren. Der LIFR-Signalweg wird in Fibroblasten autokrin und über die verschiedenen Pneumozysten-Populationen aktiviert. Die Farben stehen für den Zelltyp, der das Signal sendet.

de kultiviert. In Anwesenheit von Fibroblasten kam es zu einem zystischen Wachstum, während Kontroll-Organotide ein traubenförmiges Wachstum aufwiesen (**Abb. 3A**). Einzelzellanalysen, histologische Untersuchungen und qRT-PCR zeigten, dass Fibroblasten mit hoher Expression von Fibrosemarkern IL-6-STAT3-Signalwege in AT2-Zellen regulieren. Diese Wechselwirkung förderte das zystische Organoid-Wachstum der AT2-Zellen mit ausgeprägter MUC5B-Expression (**Abb. 3A–D**). Zudem haben wir auch MUC5B in Verbindung mit AT2-Zellen in Proben von IPF-Patienten nachgewiesen, was auf eine Rolle des von Pneumozyten exprimierten MUC5B in der Pathogenese der IPF hindeutet [5].

CellChat ist eine Software, mithilfe derer die Interaktionen zwischen verschiedenen Zelltypen analysiert und visualisiert werden können. Es ermöglicht, wichtige Ligand-Rezeptor-Paare und Signalwege zu identifizieren, was entscheidende Einblicke in zugrunde liegenden Mechanismen von Gewebemöostase, Regeneration und Krankheit liefert. Unsere Analysen ergaben, dass Fibroblasten TNFSF12 (TWEAK), HGF und PTN exprimieren, während in den Pneumozyten eine entsprechende Rezeptivität für diese Liganden vorhergesagt wurde (**Abb. 3E**). TWEAK, ein Typ-II-Transmembranprotein aus der TNF-Superfamilie, moduliert dabei verschiedene zelluläre Prozesse, insbesondere Entzündung, Zellüberleben und Proliferation. In unseren Analysen ergab sich zudem in den Fibroblasten eine autokrine und parakrine Induktion von LIF/LIFR-Signalwegen, was die IL-6-Expression vermittelt [5].

Organotide-Modelle als Ersatz zum Tierversuch

Mausmodelle sind in der Lungenforschung weit verbreitet, stehen aber oft im Widerspruch zu den 3R-Prinzipien (*Replace, Reduce, Refine*). Ihre begrenzte Übertragbarkeit auf den Menschen – bedingt durch Unterschiede in Lungenphysiologie, Immunsystem, Stoffwechsel und mehr – sowie der hohe Tierverbrauch widersprechen dem Ziel, Tierleid zu minimieren. Alternative, tierversuchsfreie Methoden sind daher essenziell

für ethisch vertretbare und translätierbare Forschung. Komplexe 3D-Lungenorganotide sind eine vielversprechende Alternative in der Lungenforschung, da sie die menschliche Lungenphysiologie und zelluläre Zusammensetzung realistisch nachbilden. Sie ermöglichen die Untersuchung zellulärer und molekularer Prozesse von Lungenerkrankungen und bieten durch die Verwendung von Omics-Technologien – wie Einzelzellanalysen, Proteomics, Epigenomics und Metabolomics – detaillierte Einblicke in pathologische Mechanismen. Der Abgleich mit Patienten-Omics-Daten erhöht die Relevanz der Ergebnisse für den menschlichen Organismus. Zudem lassen sich Krankheitsverläufe und Therapieansätze in einem kontrollierten Umfeld simulieren, wodurch der Bedarf an Tierversuchen reduziert und ethische sowie methodische Bedenken umgangen werden. ■

Literatur

[1] Montoro DT, Haber AL, Biton M et al. (2018) A revised airway epithelial hierarchy includes CFTR-expressing ionocytes. *Nature* 560: 319–324

- [2] Sprott RF, Ritzmann F, Langer F et al. (2020) Flagellin shifts 3D bronchospheres towards mucus hyperproduction. *Respir Res* 21: 222
- [3] Ritzmann F, Chitrala P, Kruger N et al. (2021) Therapeutic Application of Alpha-1 Antitrypsin in COVID-19. *Am J Respir Crit Care Med* 204: 224–227
- [4] Brand M, Ritzmann F, Kattler K et al. (2024) Biochemical and transcriptomic evaluation of a 3D lung organoid platform for pre-clinical testing of active substances targeting senescence. *Respir Res* 25: 3
- [5] Yao Y, Ritzmann F, Miethe S et al. (2024) Co-culture of human AT2 cells with fibroblasts reveals a MUC5B phenotype: insights from an organoid model. *Mol Med* 30: 227

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Christoph Beißwenger
 Klinik für Innere Medizin V
 Universitätsklinikum des Saarlandes
 Kirrberger Straße 100
 D-66421 Homburg
christoph.beisswenger@uks.eu
www.uni-saarland.de/lehrstuhl/bals/forschung.html

AUTORINNEN UND AUTOREN



Felix Ritzmann

2010–2016 Studium der Angewandten Biologie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) mit anschließender Promotion bis 2021 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. R. Bals an der Universität des Saarlandes. 2021–2024 PostDoc am Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland. Seit 2024 PostDoc in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. R. Bals an der Universität des Saarlandes.



Daniela Yildiz

Jahrgang 1982. Biologiestudium in Aachen. 2009 Promotion. 2009–2018 PostDoc und Arbeitsgruppenleiterin am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der RWTH Aachen. 2018–2024 Juniorprofessorin am Zentrum für Human- und Molekularbiologie (ZHMB) der Universität des Saarlandes. Seit 2024 Lehrstuhlinhaberin für Molekulare Pharmakologie, Medizinische Fakultät, Universität des Saarlandes.



Christoph Beißwenger

Biologiestudium in Marburg. 2005 Promotion. Seit April 2010 Gruppenleiter an der Universität Saarlandes. 2014 Habilitation in Immunologie und experimentelle Pneumologie. 2020 Verleihung der außerplanmäßigen Professur durch die Universität des Saarlandes.