

# DISSERTATION

Untersuchung der pulmonalen Genexpression auf Einzelzellebene in der  
(Pneumokokken)-Pneumonie

Investigation of pulmonary gene expression at the single cell level in  
(pneumococcal) pneumonia

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Peter Pennitz

Erstbetreuung: Univ.-Prof. Dr. med. Martin Witzernath

Datum der Promotion: 29. November 2024



## Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

1. Goekeri C, **Pennitz P**, Groenewald W, Behrendt U, Kirsten H, Zobel CM, Berger S, Heinz GA, Mashreghi MF, Wienhold SM, Dietert K, Dorhoi A, Gruber AD, Scholz M, Rohde G, Suttorp N, CAPNETZ Study Group, Witzentrath M<sup>#</sup>, Nouailles G<sup>#</sup>. MicroRNA-223 Dampens Pulmonary Inflammation during Pneumococcal Pneumonia. *Cells*. 2023;12(6):959. doi: 10.3390/cells12060959. #: geteilte Letztautorenschaft.
2. **Pennitz P\***, Goekeri C\*, Trimpert J, Wyler E, Ebenig A, Weissfuss C, Mühlebach MD, Witzentrath M, Nouailles G. Protocol for dissociation of murine and hamster derived lung tissue for single-cell transcriptome analysis. *STAR Protoc*. 2022;4(1):101957. doi: 10.1016/j.xpro.2022.101957. \*: geteilte Erstautorenschaft.
3. **Pennitz P\***, Kirsten H\*, Friedrich VD, Wyler E, Goekeri C, Obermayer B, Heinz GA, Mashreghi MF, Büttner M, Trimpert J, Landthaler M, Suttorp N, Hocke AC, Hippenstiel S, Tönnies M, Scholz M, Kuebler WM, Witzentrath M, Hoenzke K, Nouailles G. A pulmonologist's guide to perform and analyse cross-species single-lung-cell transcriptomics. *Eur Respir Rev*. 2022;31(165):220056. doi: 10.1183/16000617.0056-2022. \*: geteilte Erstautorenschaft



# Inhaltsverzeichnis

<b>Vorwort</b> .....	<b>iii</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
Abbildungsverzeichnis .....	IV
Tabellenverzeichnis .....	V
<b>1. Abkürzungen</b> .....	<b>VII</b>
<b>2. Abstract (Deutsch)</b> .....	<b>XI</b>
<b>3. Abstract (English)</b> .....	<b>XII</b>
<b>4. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
4.1. Ambulant erworbene Pneumonie.....	1
4.1.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	3
4.1.2. Klinik, Diagnostik, Therapie und Komplikationen der CAP.....	3
4.2. Die Lunge.....	5
4.2.1. Zellulärer Aufbau der Lunge .....	5
4.2.2. Immunantwort auf respiratorische Pathogene.....	6
4.2.3. Zytokine .....	8
4.2.4. Pathophysiologie der Pneumonie.....	10
4.3. Einzelzell-Sequenzierung.....	11
4.3.1. Grundlagen .....	11
4.3.2. Organverdau.....	13
4.3.3. Einzelzell-Transkriptomanalysen in der Pneumologie.....	15
<b>5. Zielsetzung und Fragestellung</b> .....	<b>17</b>
<b>6. Material und Methodik</b> .....	<b>19</b>
6.1. Materialien.....	19
6.1.1. Verbrauchsmaterialien.....	19
6.1.2. Geräte und Instrumente.....	20
6.1.3. Reagenzien.....	21
6.1.4. Enzyme .....	22
6.1.5. Antikörper.....	23
6.1.7. Puffer und Medien .....	23
6.1.8. Kits .....	24
6.1.9. Narkose.....	24
6.1.10. Software.....	24
6.2. Methoden .....	26
6.2.1. Versuchstiere.....	26

6.2.2. Etablierung eines Einzelzell-Suspensionsprotokolls .....	26
6.2.2.1. Protokoll nach Angelidis <i>et al.</i> .....	27
6.2.2.2. Protokoll nach Goekeri <i>et al.</i> .....	28
6.2.2.3. Protokoll nach Nakano <i>et al.</i> .....	29
6.2.2.4. Magnetische Zell-Aufreinigung .....	30
6.2.3. Durchflusszytometrische Darstellung von Lungenzellen .....	30
6.2.3.1. Durchflusszytometrische Darstellung von Leukozyten.....	31
6.2.3.2. Durchflusszytometrische Darstellung von Epithel- und Endothelzellen .....	33
6.2.3.3. Zellzahlbestimmung.....	33
6.2.4. Infektion mit <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	35
6.2.5. Klinische Verlaufskontrolle.....	37
6.2.6. Analyse der Genexpression.....	39
6.2.6.1. Individuelle Markierung von mRNA-Molekülen einzelner Zellen.....	39
6.2.6.2. cDNA-Amplifikation.....	40
6.2.6.3. Erstellung von Genexpressionsbibliotheken .....	41
6.2.7. Sequenzierung von Genexpressionsbibliotheken .....	42
6.2.8. Statistische Auswertung.....	43
6.2.8.1. Durchflusszytometrie-Daten .....	43
6.2.8.2. Auswertung der Sequenzierungsdaten .....	44

## **7. Ergebnisse .....47**

7.1. Etablierung des Einzelzell-Isolationsprotokolls aus murinem Lungengewebe .....	47
7.1.1. Die anteilig beste Repräsentation von Leukozyten, Endothelzellen und Epithelzellen wurde mit dem Protokoll nach Goekeri <i>et al.</i> erzielt. ....	47
7.1.2. Die drei Einzelzell-Isolationsprotokolle erzielten hohe Vereinzlungsraten. ....	48
7.1.3. Das Protokoll nach Angelidis <i>et al.</i> ermöglichte die höchste prozentuale Viabilität innerhalb der gemessenen Zellpopulationen.....	49
7.1.4. Magnetische Zell-Aufreinigung kann die Viabilität bei gleichbleibender Populationsverteilung erhöhen. ....	51
7.2. Lungenzell-Isolation aus infizierten Versuchstieren zur Einzelzell-Sequenzierung .....	52
7.2.1. Intranasale Infektion mit <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	52
7.2.2. Magnetische Zell-Aufreinigung steigerte den Anteil lebender Epithelzellen.....	53
7.2.3. Angestrebte Qualitätskriterien für Einzelzell-Suspensionen konnten erreicht werden. ....	54
7.2.4. Heterogene Zellpopulationen der Lunge konnten durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. ....	55
7.3. Erstellung und Sequenzierung von Einzelzell-Genexpressionsbibliotheken .....	60
7.3.1. Die Genexpressionsbibliotheken aller Versuchsgruppen erfüllten die erforderlichen Qualitätsstandards. ....	60
7.3.2. Die zelluläre Komplexität der Lunge konnte mit 28 <i>Clustern</i> dargestellt werden. ....	61

7.3.3. Die prozentualen Anteile der Zellpopulationen in den Sequenzierungsdaten deckten sich mit den durchflusszytometrisch ermittelten Frequenzen. ....	66
7.3.4. Eine überschießende Expression von „Zellstress-Genen“ konnte vermieden werden. ....	69
7.4. Analysen der differentiellen Genexpression und Zell-Zell-Kommunikation .....	71
7.4.1. Das Expressionsmuster isolierter Lungenzellpopulationen unterschied sich 24 Stunden nach Infektion signifikant von dem der Kontrollgruppe. ....	71
7.4.2 Fibroblasten zeigten eine starke transkriptionale Aktivität nach <i>S. pn</i> Infektion. ....	73
7.4.3. <i>Cxcl10</i> und <i>Cxcl2</i> waren die am stärksten hochregulierten Zytokin-Gene nach <i>S. pn</i> Infektion. ....	76
7.4.4. Die Infektion mit <i>S. pn</i> führte bei M $\Phi$ zu einer Hochregulierung von Genen des Interferon-Signalwegs. ....	78
7.4.5. Zelluläre Interaktionen scheinen durch inflammatorische Geschehnisse gestört zu werden. ....	81
<b>8. Diskussion .....</b>	<b>87</b>
8.1. Anforderungen an ein Einzelzell-Isolationsprotoll der murinen Lunge .....	87
8.2. Wahrung der Aussagekraft des Transkriptoms.....	90
8.3. Einordnung inflammatorischer Geschehnisse auf Expressionsebene .....	91
8.4. Limitationen .....	93
8.5. Ausblick .....	95
<b>9. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>99</b>
<b>10. Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>123</b>
<b>11. Anteilserklärung an erfolgten Publikationen .....</b>	<b>124</b>
<b>12. Lebenslauf .....</b>	<b>126</b>
<b>13. Publikationsliste.....</b>	<b>127</b>
<b>14. Danksagung.....</b>	<b>132</b>
<b>15. Bescheinigung Statistik.....</b>	<b>133</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Todesursachen weltweit und in Europa .....	2
Abbildung 2: Zellisolation aus murinen Lungen .....	27
Abbildung 3: Exemplarische Differenzierung und Quantifizierung von Lungenzellpopulationen .....	32
Abbildung 4: Exemplarische Differenzierung und Quantifizierung isolierter Leukozyten mittels Durchflusszytometrie .....	34
Abbildung 5: Exemplarische Differenzierung und Quantifizierung isolierter Epithel- sowie Endothelzellen mittels Durchflusszytometrie .....	35
Abbildung 6: Wachstumskurven <i>S. pn</i> und <i>S. pn</i> $\Delta$ ply .....	37
Abbildung 7: Versuchsaufbau der Genexpressionsanalyse isolierter Lungenzellen .....	40
Abbildung 8: Angewandte Qualitätsfilter für Einzelzell-Sequenzierungsdaten .....	46
Abbildung 9: Anteil an Leukozyten, Epithelzellen und Endothelzellen in Einzelzell- Suspension und Gesamtzahl lebender Zellen .....	48
Abbildung 10: Singularität von Leukozyten, Epithelzellen und Endothelzellen .....	49
Abbildung 11: Viabilität von Leukozyten, Epithelzellen und Endothelzellen.....	50
Abbildung 12: Magnetische Zell-Aufreinigung.....	52
Abbildung 13: Vitalparameter der Versuchstiere nach Infektion .....	53
Abbildung 14: Viabilität isolierter Lungen-Zellen vor und nach MACS <i>Dead Cell</i> <i>Removal</i> .....	54
Abbildung 15: Qualitätskontrolle der Einzelzell-Suspensionen zur Genexpressionsanalyse.....	55
Abbildung 16: Isolierte Zellpopulationen in den Einzelzell-Suspensionen .....	57
Abbildung 17: Viabilität und Singularität isolierter hämatopoetischer Zellpopulationen	58
Abbildung 18: Viabilität und Singularität isolierter nicht-hämatopoetischer Zellpopulationen .....	59
Abbildung 19: Fragmentgröße amplifizierter cDNA und Genexpressionsbibliotheken..	61
Abbildung 20: Übersicht sequenzierter Lungenzellen .....	63
Abbildung 21: Exemplarische Darstellung von Marker-Genen.....	64
Abbildung 22: Expressionsstärke des Gens <i>Sftpc</i> .....	65
Abbildung 23: Höchst exprimierte Gene der isolierten Lungenzellpopulationen .....	66
Abbildung 24: Prozentuale Zellverteilung bei Durchflusszytometrie und Sc-RNA-Seq.	68
Abbildung 25: Expression definierter „Stress-Gene“ des Sc-RNA-Seq Datensatzes....	71



Abbildung 26: Differenzielle Genexpression 24 Stunden nach Infektion .....	72
Abbildung 27: Inflammatorische Mediatoren im Fibroblasten Kompartiment .....	76
Abbildung 28: Expressionsmuster von Zytokin-Genen 24 h nach <i>S. pn</i> Infektion.....	77
Abbildung 29: Interferon-stimulierte-Gene.....	79
Abbildung 30: Potenzielle Pneumonie Mediator Gene .....	80
Abbildung 31: Übersicht von Rezeptor-Ligand-Interaktionen.....	82
Abbildung 32: Zytokin-abhängige Zell-Zell-Interaktionen.....	85

### **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Überblick über die verwendeten enzymatischen Verdauösungen.....	30
Tabelle 2: Handlungsanweisung zur klinischen Beurteilung infizierter Tiere .....	38
Tabelle 3: Anpassungen an den verwendeten Thermocycler: Jena Analytics Biometra TRIO 48.....	43
Tabelle 4: Sequenzierungsdaten .....	61



## 1. Abkürzungen

A	<i>Area</i> (in der Durchflusszytometrie-Analyse: Fläche unter der Kurve)
a	Anti
AM	Alveolarmakrophagen
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (dt.: Varianzanalyse)
ARDS	<i>Acute respiratory distress syndrome</i> (dt.: akutes Lungenversagen)
BSA	Bovines Serumalbumin
CAP	<i>Community acquired pneumonia</i> (dt.: ambulant erworbene Pneumonie)
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> (dt.: Unterscheidungsgruppen)
cDNA	<i>Complementary DNA</i> (dt.: komplementäre DNA)
COVID-19	<i>Coronavirus disease 2019</i> (dt.: Coronavirus-Krankheit-2019)
CRP	C-reaktives Protein
D39 WT	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Serotyp 2 Wildtyp
D39 $\Delta$ ply	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Serotyp 2 Pneumolysin-defizienter Mutant
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (dt.: Desoxyribonukleinsäure)
dt.	Deutsch
DZ	Dendritische Zellen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EG	Eosinophile Granulozyten
engl.	Englisch
EZ	Endothelzellen
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i> (dt.: Durchflusszytometrie)
FC	<i>Fold Change</i> (dt.: Expressionsverhältnis)
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (dt.: fetales Kälberserum)
FSC	<i>Forward Scatter</i> (dt.: Vorwärtsstreulicht)
FVD	<i>Fixable viability dye</i> (Durchflusszytometrie-Marker zur Viabilitätsbestimmung)
<i>g</i>	Einheit der mittleren Erdbeschleunigung (bei Zentrifugen)
G	Gauge (als Größeneinheit für Kanülen)
GEM	<i>Gel Beads in Emulsion</i> (dt.: Einzelzell Emulsionströpfchen)
H	<i>Height</i> (in der Durchflusszytometrie-Analyse: Höhe des Impulses)

HAP	<i>Hospital acquired pneumonia</i> (dt.: im Krankenhaus erworbene Pneumonie)
Hg	<i>Hydrargyrum</i> (dt.: Quecksilber)
IFN	Interferon
IL	Interleukin
ILC	<i>Innate lymphoid cells</i> (dt.: angeborene lymphatische Immunzellen)
iM	Interstitielle Makrophagen
iMM	Inflammatorische Monozyten/Makrophagen
iMM Ly6C <sup>hi</sup>	Inflammatorische Monozyten/Makrophagen mit hoher Fluoreszenz des Oberflächenmarkers Ly6C (engl.: Ly6C <i>high</i> )
iMM Ly6C <sup>lo</sup>	Inflammatorische Monozyten/Makrophagen mit niedriger Fluoreszenz des Oberflächenmarkers Ly6C (engl.: Ly6C <i>low</i> )
KBE	Koloniebildende Einheit
KM	Körpermasse
LAGeSo	Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin
LM	<i>Lower Marker</i> (dt.: unterer Marker)
MACS	<i>Magnetic cell separation</i> (dt.: magnetische Zellseparation)
MDR	<i>Multi-drug-resistant</i> (dt.: multiresistent)
miR	MicroRNA
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i> (dt.: Boten-Ribonukleinsäure)
NGS	<i>Next-Generation-Sequencing</i> (dt.: Sequenzierung der nächsten Generation)
NK	Natürliche Killerzellen
OD	Optische Dichte
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (dt.: phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (dt.: Polymerase-Kettenreaktion)
PCT	Procalcitonin
PFA	Paraformaldehyd
RFU	<i>Relative Fluorescence Units</i> (dt.: relative Fluoreszenzeinheiten)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (dt.: Ribonukleinsäure)
RNA-Seq	RNA Sequenzierung
RPMI	Roswell Park Memorial Institute-1640 Zellkulturmedium
RT	Raumtemperatur
<i>S. pn</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>

<i>S. pn</i> $\Delta$ ply	Pneumolysin-defizienter <i>Streptococcus pneumoniae</i> Mutant
SARS-CoV-2	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2</i> (dt.: SARS-Coronavirus Typ 2)
Sc-RNA-Seq	<i>Single-Cell-RNA-Sequencing</i> (dt.: Einzelzell-Sequenzierung)
SD	<i>Standard Deviation</i> (dt.: Standardabweichung)
SSC	<i>Side Scatter</i> (dt.: Seitwärtsstreulicht)
T <sub>H</sub>	T-Helferzellen
UM	<i>Upper Marker</i> (dt.: oberer Marker)
UMI	<i>Unique molecular identifiers</i> (dt.: eindeutige molekulare Identifikatoren)
WHO	<i>World health organization</i> (dt.: Weltgesundheitsorganisation)
WT	Wildtyp



## 2. Abstract (Deutsch)

**Hintergrund:** Die Lunge ist ein mikroanatomisch komplexes Organ, in dem über 40 verschiedene Zellpopulationen zu dem Erhalt der physiologischen Organfunktion beitragen. Während einer akuten bakteriellen Infektion wie der ambulant erworbenen Pneumonie (engl.: *community acquired pneumonia*, CAP) migrieren weitere Leukozytenpopulationen in die Lunge. Die bakterielle CAP stellt sowohl in Europa als auch weltweit eine häufige und potenziell letale Erkrankung dar, was ein besseres Verständnis der Pathophysiologie mit allen beteiligten Zelltypen erstrebenswert macht.

In dieser Arbeit sollte ein Protokoll etabliert und validiert werden, das Einzelzell-Transkriptomanalysen im infektiologischen Kontext ermöglicht, sowie erhaltene Datensätze exploratorisch analysiert werden.

**Methodik:** Drei Zellisolationsprotokolle wurden evaluiert, um Einzelzell-Suspensionen mit hoher Viabilität und Singularität aus murinem Lungengewebe von mit *Streptococcus pneumoniae* Serotyp 2 (*S. pn*), der Pneumolysin-defizienten Pneumokokken-Mutante (*S. pn*  $\Delta$ ply) oder mit Lösungsmittel (Kontrollgruppe) infizierten Versuchstieren zu isolieren. Nachfolgend wurde eine magnetische Zell-Aufreinigung durchgeführt, Genexpressionsbibliotheken erstellt und diese sequenziert. Die Datenauswertung erfolgte durch Software des Herstellers sowie R und entsprechende Pakete.

**Ergebnisse:** Das erhaltene Transkriptom von 10.933 Zellen konnte Leukozyten, Epithelzellen, Endothelzellen und mesenchymalen Zellen zugeordnet werden, eine übermäßige Expression an Stressgenen wurde vermieden. Fibroblasten zeigten eine starke Reaktion durch die Regulation der Gene *Lcn2* und *Gsn* nach Infektion mit *S. pn*. Makrophagen exprimierten nach Infektion, in Abhängigkeit vom Virulenzfaktor Pneumolysin, ein Muster an Genen des Interferon-Signalwegs. Granulozyten zeigten insbesondere eine *Cxcl2* Hochregulierung sowie eine verminderte Expression von *Ccl3*, *Cxcl3* und *Il1rn* durch Pneumolysin. Schließlich war die Anzahl an Zell-Interaktionen verschiedener Zelltypen durch inflammatorische Geschehnisse reduziert.

**Schlussfolgerung:** Die Möglichkeit, unterschiedliche Zellpopulationen auf Einzelzellebene zu untersuchen, erweitert insbesondere in der Lunge als heterogenem Organ das Verständnis von pathophysiologischen Geschehnissen. Wenn die Ergebnisse mit anderen Methoden vergleichbarer Auflösung wie der Proteomik, Sekretom-Analysen oder *Spatial transcriptomics* validiert werden, kann dies den Weg zu neuen Therapieansätzen ebnen.

### 3. Abstract (English)

**Background:** The lung is a micro-anatomically complex organ harboring more than 40 different cell populations essential for maintaining physiological organ function. During an acute bacterial infection, such as community acquired pneumonia (CAP), leukocyte populations migrate to the lung further expanding the cellular landscape. Bacterial CAP is a common and potentially lethal disease both in Europe and worldwide, and therefore a better understanding of the pathophysiology and cell types involved is crucial. The aim of this study was to establish and validate a protocol that is applicable for single-cell transcriptome analysis in infectious disease research and to perform exploratory analysis on the generated data sets.

**Methods:** Three cell isolation protocols were evaluated to ensure technical and qualitative requirements of isolating single cell suspensions with high viability and singularity using murine lung tissue. Mice were infected with *Streptococcus pneumoniae* serotype 2 (*S. pn*), the pneumolysin-deficient pneumococcal mutant (*S. pn*  $\Delta$ ply) or solvent (control group), followed by magnetic cell sorting, gene expression library construction and sequencing. Data analysis was performed using the manufacturer's software and R, including add-on packages for single-cell analysis.

**Results:** The resulting transcriptome of 10,933 cells could be assigned to leukocytes, epithelial cells, endothelial cells, and mesenchymal cells while excessive expression of stress genes was avoided. Fibroblasts showed a strong response to infection with *S. pn* through regulation of the genes *Lcn2* and *Gsn*. Macrophages expressed a pattern of interferon pathway genes after infection, dependent on the presence of the virulence factor pneumolysin. Granulocytes exhibited upregulation of *Cxcl2* and downregulation of *Ccl3*, *Cxcl3* and *Il1rn* by pneumolysin. Finally, the number of cell-cell interactions of different origin was reduced by inflammatory events.

**Conclusion:** The possibility of studying different cell populations at a single-cell level may contribute to a better understanding of pulmonary pathophysiological events, especially considering the very heterogeneous nature of the lungs. Thus, single-cell RNA-sequencing could pave the way to new therapeutic approaches, particularly if results are validated with other methods of comparable resolution such as proteomics, secretomics or spatial transcriptomics.



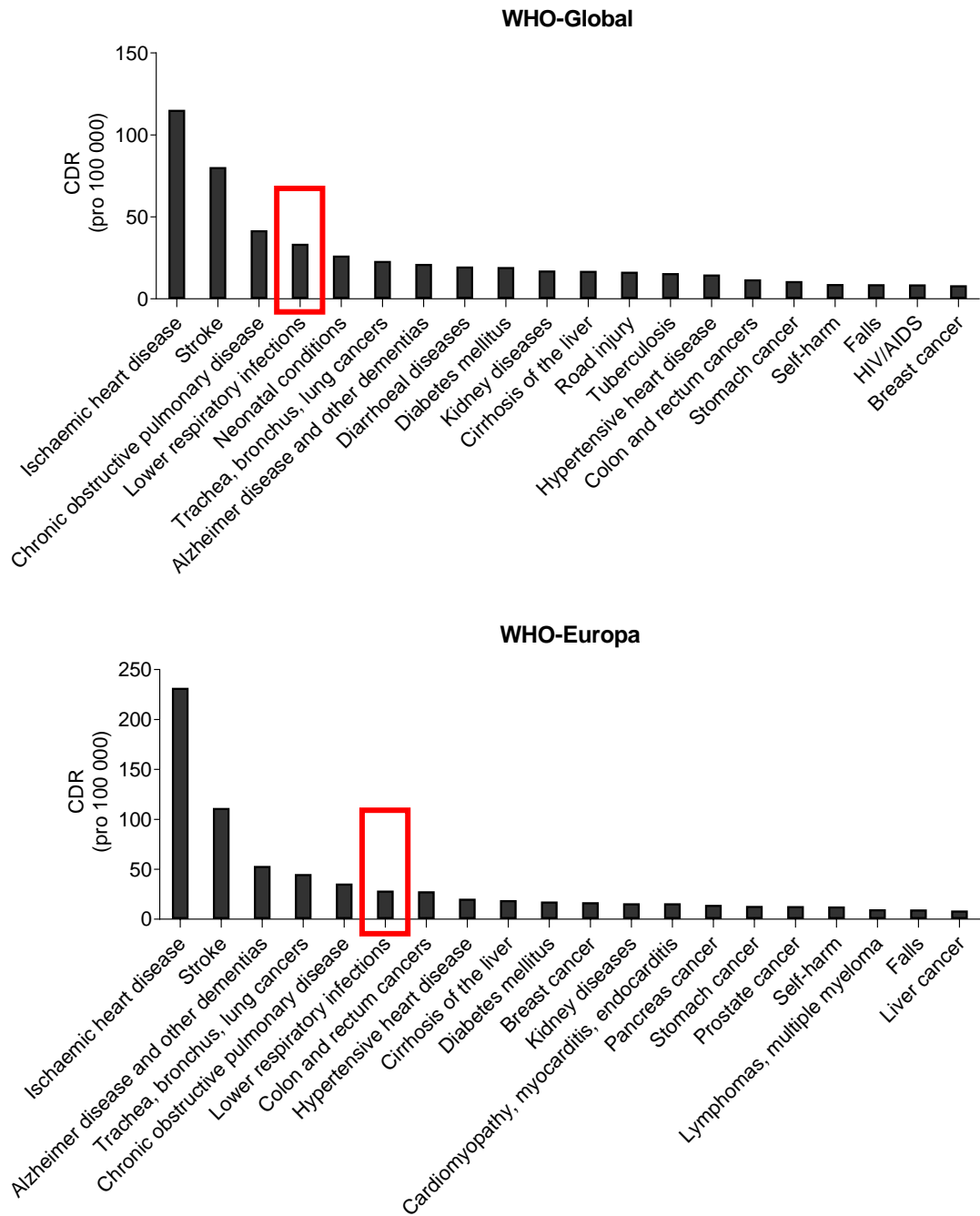
## 4. Einleitung

### 4.1. Ambulant erworbene Pneumonie

Die Pneumonie (Lungenentzündung) ist eine entzündliche Erkrankung der unteren Atemwege (engl.: *lower respiratory infection*). Sie kann durch verschiedene Ursachen hervorgerufen werden, dazu zählen Bakterien, Viren, Pilze sowie inhalative Noxen [1, 2]. Weltweit bilden Pneumonien die vierthäufigste Todesursache nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Schlaganfällen und chronisch obstruktiven Atemwegserkrankungen (Abbildung 1) [3]. Besonders gefährdet sind Kleinkinder und Senioren über 65 Jahre. Nach Daten der Weltgesundheitsorganisation (engl.: *World Health Organization*, WHO) ist die Pneumonie Ursache für 15 % aller Todesfälle bei Kindern unter 5 Jahren, im Jahr 2017 entsprach dies 808.694 Verstorbenen [4].

Erwerben Personen die Pneumonie außerhalb des Krankenhauses und unabhängig einer schwerwiegenden Immunsuppression, so spricht man von einer ambulant erworbenen Pneumonie (engl.: *community acquired pneumonia*, CAP) [5, 6]. Findet die Ausbildung der Pneumonie später als 48 Stunden nach Krankenhausaufnahme oder bis zu 3 Monate nach vorherigem Krankenhausaufenthalt statt, so spricht man von einer Krankenhaus-erworbenen Pneumonie (engl.: *hospital acquired pneumonia*, HAP) [7].

Je nach Quelle werden in Deutschland pro Jahr 400.000 bis über 700.000 CAP Fälle dokumentiert [8, 9]. Von diesen mussten sich im Jahr 2014 260.000 Erkrankte einer stationären Behandlung unterziehen, wobei die Letalität bei Hospitalisation trotz leitliniengerechter Antibiotikatherapie mit 13 – 15 % noch immer unbefriedigend hoch ist [6, 9-11]. Des Weiteren stellt die CAP in Europa mit jährlich über 10 Milliarden Euro an Behandlungskosten die Gesundheitssysteme vor große ökonomische Herausforderungen [12]. Laut einer 2018 veröffentlichten US-amerikanischen Querschnittsstudie älteren Erkrankten waren die jährlichen Behandlungskosten von CAP höher als bei Diabetes mellitus, Myokardinfarkt oder Schlaganfall. Auch die durchschnittliche Dauer der stationären Behandlung war mit 5,2 +/- 3,8 Tagen höher als bei Diabetes mellitus und Myokardinfarkt [13].



**Abbildung 1: Todesursachen weltweit und in Europa**

Top 20 der häufigsten Todesursachen weltweit und in der WHO-Region Europa, basierend auf den Daten des „Global Health Estimates“ der Weltgesundheitsorganisation (engl.: *World Health Organization, WHO*) [3]. Todesfälle (*Crude death rates; CDR*) pro 100.000 Einwohner. Daten verfügbar unter: [https://www.who.int/docs/default-source/gho-documents/global-health-estimates/ghe2019\\_cod\\_whoregion\\_2000\\_20195a48bd71-f222-4b00-90e6-b5078fbfc4db.xlsx?sfvrsn=4aed7378\\_7/](https://www.who.int/docs/default-source/gho-documents/global-health-estimates/ghe2019_cod_whoregion_2000_20195a48bd71-f222-4b00-90e6-b5078fbfc4db.xlsx?sfvrsn=4aed7378_7/) letzter Zugriff: 03.11.2021, 19:09.

#### 4.1.1. *Streptococcus pneumoniae*

Das grampositive Bakterium *Streptococcus pneumoniae* (*S. pn*), in der eingedeutschten Mehrzahl auch bekannt als Pneumokokken, stellt die häufigste Ursache der bakteriellen ambulant erworbenen Pneumonie dar [14]. Pneumokokken sind auch für Krankheitsbilder wie Otitis Media, Meningitis, Sinusitis, Bronchitis und septische Geschehnisse verantwortlich [15-17]. Einerseits ist *S. pn* der vierthäufigste Erreger für letale Infektionskrankheiten weltweit, andererseits physiologisch als Teil der natürlichen Flora des oberen Respirationstraktes präsent [15, 18].

Wichtige Virulenzfaktoren des *S. pn* sind die Kapsel aus Polysacchariden, die vor Phagozytose durch Zellen des angeborenen Immunsystems schützt, sowie das Cholesterin-abhängige Toxin Pneumolysin, welches an Zellmembranen der Wirtszellen bindet und diese über Porenbildung lysiert [19, 20]. Diese Poren werden über den Einbau von Pneumolysin Monomeren an Cholesterin-reichen Domänen der Zellmembran gebildet, wobei die endgültige Pore aus bis zu 50 Untereinheiten entsteht und durch Einstrom von Calciumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) die Zellhomöostase dysreguliert [21, 22]. Pneumolysin trägt unter anderem auch über proapoptotische und proinflammatorische Mechanismen zur Verminderung der Integrität der alveolokapillären Barriere und somit zur Entstehung einer akuten Lungenschädigung bei [23, 24]. *In vivo* Experimente konnten zeigen, dass Wildtyp Pneumokokken Herzmuskelschäden mit erhöhten Troponin I und T Werten verursachen, dies jedoch bei Infektion mit einer Pneumolysin-defizienten Mutante ausblieb [25].

*S. pn* zählt bislang nicht zu den multiresistenten (engl.: *multi-drug-resistant*, MDR) Keimen. Laut WHO-Report von 2021 treten jedoch Penicillin-resistente *S. pn* Stämme mittlerweile in allen Regionen der Welt auf [26].

#### 4.1.2. Klinik, Diagnostik, Therapie und Komplikationen der CAP

Typische klinische Symptome der CAP sind Husten mit oder ohne Auswurf, Dyspnoe, atemabhängige thorakale Schmerzen, Fieber oder Hypothermie, allgemeines Krankheitsgefühl und „grippale“ Symptome sowie insbesondere bei älteren Erkrankten neurologische Symptome wie Desorientiertheit [6]. Zur Diagnosestellung muss in einem bildgebenden radiologischen Verfahren ein neu aufgetretenes Infiltrat der Lunge nachgewiesen werden. Dieses dient auch zum Ausschluss wichtiger Differenzialdiagnosen wie Lungentuberkulose oder maligner Lungenerkrankungen [6]. Die Bestimmung eines Entzündungsparameters wie C-reaktives Protein (CRP) oder Procalcitonin (PCT) im Serum bei

## Einleitung

Aufnahme und im Verlauf nach 3 bis 4 Tagen unterstützt die Evaluation des Therapieerfolgs [27].

Eine gängige Methode zur Abschätzung des Schweregrades des Krankheitsverlaufes stellt der CRB-65 Score dar. Dieser beinhaltet 4 Parameter: Atemfrequenz  $\geq 30$  pro Minute, diastolischer Blutdruck  $\leq 60$  mm Hg oder systolischer Blutdruck  $< 90$  mm Hg, Bewusstseinstörung, Alter  $\geq 65$  Jahre. Die zutreffenden Kriterien ermöglichen eine Vorhersage der Letalitätsraten von 2 % bei 0 erfüllten Kriterien, 13 % bei 1 oder 2 erfüllten Kriterien und 34 % bei 3 oder 4 erfüllten Kriterien [10]. Außerdem wird nach der Punktzahl eine Empfehlung ausgesprochen, ob der Erkrankte ambulant behandelt werden kann oder stationär aufgenommen werden sollte [28].

Seit Ende der 1930er Jahre konnte die Mortalität einer Pneumonie durch den Einsatz von Antibiotika deutlich reduziert werden, sie bilden bis heute den Goldstandard in der Therapie [29]. Die empfohlene antibiotische Therapie der ambulant erworbenen Pneumonie richtet sich nach Schweregrad und bestehenden Komorbiditäten. Bei Erkrankten mit leichter Pneumonie ohne Komorbidität wäre die Therapie der Wahl eine initial kalkulierte Monotherapie mit einem hochdosierten Aminopenicillinpräparat. Alternativ kann ein Tetracyclin wie Doxycyclin, ein Makrolid wie Azithromycin bzw. Clarithromycin oder ein Fluorochinolon wie Moxifloxacin bzw. Levofloxacin verabreicht werden. Möglichkeiten zur Anpassung der Therapie an Komorbiditäten oder Schweregrad sind: Ergänzung des Aminopenicillinpräparats durch ein Betalaktamaseinhibitorpräparat, Ersatz des Aminopenicillinpräparats durch ein Cephalosporin der Klasse 2 oder 3a, gegebenenfalls in Kombination mit einem Makrolid, bzw. die Durchführung einer kalkulierten intravenösen Kombinationstherapie mit einem Betalaktam-Antibiotikum mit breitem Spektrum wie Piperacillin in Kombination mit Tazobactam und zusätzlicher Gabe eines Makrolids [6].

Die antimikrobielle Therapie sollte möglichst rasch nach Diagnosestellung begonnen werden, bei hospitalisierten Erkrankten wird dies innerhalb der ersten acht Stunden empfohlen [27]. Trotz moderner antimikrobieller Therapie kann die ambulant erworbene Pneumonie zu schweren Komplikationen wie einem parapneumonischen Erguss, Pleuraempyem, Lungenabszess, Koagulopathie, Sepsis, akutem Lungenversagen (engl.: *acute respiratory distress syndrome*, ARDS) und Multi-Organ-Versagen führen [6, 30]. Als Prävention empfiehlt die ständige Impfkommission (STIKO) für Kinder im ersten Lebensjahr zwei Impfstoffdosen mit einem Pneumokokken-Konjugatimpfstoff im Abstand von 8 Wo-

chen als Grundimmunisierung sowie eine weitere Dosis sechs Monate später. Bei Personen ab 60 Jahren wird als Standardimpfung die einmalige Immunisierung mit dem 23-valenten Polysaccharid-Impfstoff (Pneumovax 23) angeraten [31].

## 4.2. Die Lunge

### 4.2.1. Zellulärer Aufbau der Lunge

Die Lunge besteht aus zwei Lungenflügeln, die sich in zwei (links) bzw. drei Lungenlappen (rechts) unterteilen lassen. Diese gliedern sich jeweils in 10 Lungensegmente, wobei das Segment VII (*Segmentum basale mediale*) der linken Lunge aufgrund seiner geringen Größe oft mit dem Segment VIII (*Segmentum basale anterius*) zusammengefasst wird [32, 33]. Die beiden Lungenflügel sind durch ihre Hauptbronchien mit der Trachea verbunden. Ab dieser Bifurkation teilt sich der Bronchialbaum 22 weitere Male, den Endpunkt stellen etwa 300 µm große luftgefüllte Bläschen (Alveolen) dar, in denen der Gasaustausch stattfindet [34, 35]. Insgesamt wurden bisher über 40 verschiedene Zellpopulationen, essenziell für Aufbau und Funktion der Lunge, beschrieben [36]. Man kann diese in vier Kategorien ordnen: Leukozyten, sowohl permanent in der Lunge residierende und situationsabhängig hinzugezogene, Epithelzellen, die Bronchien und Alveolen auskleiden, Endothelzellen, die Gefäßlumina auskleiden, sowie mesenchymale Zellen, die den strukturellen Aufbau der Lunge ermöglichen. Die wichtigsten Vertreter sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden. Zellen des Blutsystems, die die Kapillarräume in der Regel nicht verlassen, wie Erythrozyten und Thrombozyten, werden nicht weiter angeführt.

Alveolarepithelzellen sind auch unter dem Namen Pneumozyten bekannt. Man unterscheidet Typ I Alveolarepithelzellen, die 90 % der Fläche der Alveolen auskleiden, von Typ II Alveolarepithelzellen, die Surfactant produzieren, um die Oberflächenspannung in den Alveolen zu reduzieren. Typ I Alveolarepithelzellen teilen sich eine gemeinsame Basalmembran mit kapillaren Endothelzellen, über die ein effektiver Gasaustausch stattfindet und die gleichzeitig die Blut-Luft-Schranke bildet [35]. Die bekanntesten Vertreter von ortsansässigen Leukozyten sind die Alveolarmakrophagen, die als erste Immunzellen inhalativen Noxen oder Mikroben gegenüberstehen. Im Normalzustand weisen sie eine hohe phagozytotische Aktivität auf, produzieren geringe Mengen an proinflammatorischen Zytokinen und wirken entzündungshemmend [37]. Auf drei Alveolen kommt ungefähr ein Alveolarmakrophage. Ob diese durch Alveolen patrouillieren, in einer verbleiben

## Einleitung

oder sogar an der Präsentation von phagozytiertem Material in Lymphknoten beteiligt sind, ist nicht abschließend geklärt [38]. Die Zellen des Bronchialepithels unterscheiden sich von denen der Alveolen. Es gibt vier Hauptvertreter der Bronchialepithelzellen: Zilien-tragende Zellen, Becherzellen, Clubzellen (auch Keulenzellen) und Basalzellen [39]. Seltener Zelltypen sind Bürstenzellen, neuroendokrine Zellen sowie kürzlich entdeckte Ionozyten [40, 41]. Becherzellen, Clubzellen sowie submuköse Drüsen, bestehend aus mukösen und serösen Azinuszellen, produzieren Mukus, der eine Schicht am Epithel bildet, um inhalede Partikel und Mikroorganismen zu binden [39, 42]. Dieser wird von Zilien-tragenden Zellen abtransportiert, man spricht von mukoziliärer Reinigung (engl.: *mucociliary clearance*) [43]. Clubzellen können außerdem zu Becherzellen differenzieren [42]. Die genaue Funktion der Mikrovilli tragenden Bürstenzellen bleibt unklar, es wird vermutet, dass sie als cholinerge Chemorezeptoren die Atmung regulieren [44]. In einigen Spezies, wie Ratten, Hamstern, Ochsenfröschen und der japanischen Vierstreifennatter, wurden Bürstenzellen elektronenmikroskopisch in Alveolen gefunden und dort als Typ III-Pneumozyten bezeichnet [45]. Basalzellen fungieren als multipotente Stammzellen und können zu oben genannten Bronchialepithelzelltypen differenzieren [45]. Neuroendokrine Zellen weisen eine Vielzahl an Aktivitäten auf. Sie dienen als Sauerstoffsensoren, regulieren den pulmonalen Blutfluss und Bronchialtonus, wirken modulierend auf das Immunsystem und besitzen Stammzeleigenschaften [46]. Zu den wichtigsten Vertretern der mesenchymalen Zellen gehören Fibroblasten, Perizyten und glatte Muskelzellen. Fibroblasten sind die Hauptproduzenten von extrazellulärer Matrix in der Lunge und essenziell für die Reparaturvorgänge nach Verletzungen [47]. Perizyten umhüllen die Endothelzellen an der Außenwand von Kapillaren, stabilisieren diese und regulieren Blutfluss sowie Permeabilität [48]. Für glatte Muskelzellen der Atemwege wurden neben ihren kontraktile Eigenschaften auch die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen und die Interaktion mit Leukozyten beschrieben. Dies ist vor allem bei Asthma klinisch relevant und zeigt generell die enge Verflechtung von Gewebezellen und Immunsystem [49].

### **4.2.2. Immunantwort auf respiratorische Pathogene**

Der gesunde menschliche Organismus verfügt über effektive Mechanismen zur Abwehr von Infektionserregern. Gegen eindringende Pathogene stehen als erste Schutzmechanismen anatomische und chemische Barrieren zur Verfügung. Während die Haut durch mehrreihiges verhorntes Plattenepithel gut geschützt ist, wird im Epithel der Atemwege Mukus produziert, der Mikroorganismen bindet und ein Anheften am Epithel verhindert.

Dieser Schleim wird durch Zilien-tragende Zellen kontinuierlich abtransportiert [50]. Zusätzlich werden antimikrobielle Peptide (engl.: *antimicrobial peptides*) wie  $\alpha$ - und  $\beta$ -Defensine sowie Cathelicidin produziert, um Bakterien abzutöten [51].

Überwinden Keime diese Barrieren, stehen die Zellen des angeborenen Immunsystems (auch: unspezifische Immunantwort, engl.: *innate immunity*), nämlich Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, angeborene lymphatische Immunzellen (engl.: *innate lymphoid cells*, ILC) inklusive der natürlichen Killerzellen (NK) und dendritische Zellen sowie das humorale Komplementsystem bereit, um eine weitere Verbreitung im Körper zu verhindern [50-52]. Die Aufgaben des Komplementsystems umfassen vorrangig die Opsonierung und Lyse von Bakterien durch den Einbau von Poren in die Zellmembran. Über einen von drei Aktivierungswegen erfolgt die Bildung des Membranangriffskomplexes aus den Komplementfaktoren C5b, C6, C7, C8 und mehreren C9-Proteinen, die sich zur eigentlichen Pore zusammensetzen [53]. Werden genügend Poren auf einer Zielzelle gebildet, kommt es durch Calciumeinfluss zum Zelltod [54]. Neben dieser direkten Wirkung sorgt die Bindung von C3b und C4b an der Oberfläche des Pathogens für die Erkennung durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten, was als Opsonierung bezeichnet wird. Zusätzlich interagieren C3a, C4a und C5a als Anaphylatoxine mit der zellulären Immunantwort, insbesondere mit Granulozyten, Monozyten/Makrophagen und Mastzellen [55]. Einige Zellen besitzen die Fähigkeit, Krankheitserreger zu phagozytieren (Makrophagen, Monozyten, neutrophile Granulozyten) und werden auch als Phagozyten bezeichnet. Eosinophile und basophile Granulozyten spielen vor allem bei der Abwehr von nicht phagozytierbaren Parasiten wie Würmern eine Rolle, sind allerdings auch an der Entstehung von Allergien beteiligt. Granulozyten, Monozyten und Makrophagen stammen von den myeloischen Vorläuferzellen ab [56]. ILC sind kürzlich entdeckte Zellen der angeborenen Immunantwort, welche von der lymphatischen Vorläuferzelle abstammen. Man unterscheidet drei Hauptkategorien der *innate lymphoid cells*: ILC1, ILC2, ILC3. Natürliche Killerzellen, die auch von der lymphatischen Vorläuferzelle abstammen, werden zu der ILC1-Gruppe gezählt. Sie erfüllen Aufgaben, die denen der T-Zellen der adaptiven Immunantwort ähneln, und spannen so eine Brücke zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem [57]. Auch die antigenpräsentierenden dendritischen Zellen werden der angeborenen Immunantwort zugeteilt und stammen von hämatopoetischen Vorläuferzellen ab [58]. Sie fungieren durch die Präsentation von phagozytierten Antigenen an T-Zellen als Vermittler zum adaptiven Immunsystem [59].

## Einleitung

Die adaptive (auch erworbene) Immunantwort besteht aus B- und T-Lymphozyten sowie den gebildeten hochspezifischen Antikörpern. Die Benennung der Zellen wird gelegentlich mit dem Ort ihrer Reifung im Thymus bzw. dem Knochenmark (engl.: *bone marrow*) angegeben, wobei B-Zellen ihren Namen ursprünglich nach der *Bursa Fabricii* in Vögeln tragen [60]. T-Zellen werden nach Unterscheidungsgruppen (engl.: *Cluster of Differentiation*, CD) in CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen (T<sub>H</sub>) und CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen, die insbesondere für die Abtötung von virusinfizierten Zellen zuständig sind, unterteilt. T-Helferzellen unterstützen B-Zellen bei der Bildung von Antikörpern, verstärken die Reaktionen von zytotoxischen T-Zellen und regulieren Makrophagen, die Immunreaktion sowie das immunologische Gedächtnis. Ist ihre Anzahl reduziert, beispielsweise bei HIV-Erkrankten, erhöht sich die Anfälligkeit gegenüber Infektionskrankheiten stark. Die wichtigsten Vertreter der CD4<sup>+</sup> Subfamilie sind T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2-, T<sub>H</sub>17- und regulatorische T-Zellen (Treg) [61]. NKT-Zellen und  $\gamma\delta$  T-Zellen können entweder CD4 oder CD8 positiv sein, allerdings auch keinen der beiden Rezeptoren tragen wie bei  $\gamma\delta$  T-Zellen in 70 % der Fälle [62]. Diese Zellen werden auch als nichtkonventionelle T-Zellen bezeichnet.

B-Zellen und ausdifferenzierte Plasmazellen sind für die Produktion von hochspezifischen Antikörpern zuständig. Jede B-Zelle produziert Antikörper, die spezifisch ein Antigen erkennen und exprimiert diese auch an der Zelloberfläche, wo sie B-Zell-Rezeptoren genannt werden. Es gibt fünf verschiedene Klassen von Immunglobulinen: Immunglobulin M (IgM), Immunglobulin D (IgD), Immunglobulin G (IgG), Immunglobulin A (IgA) und Immunglobulin E (IgE) [50]. In der frühen Phase der Immunantwort werden IgM-Antikörper gebildet, später kann es während der Keimzentrumsreaktion zu einem Isotypwechsel, zu einem für die jeweilige Immunantwort am besten geeigneten Immunglobulin, kommen [63]. Im Zuge der adaptiven Immunantwort kommt es zur Ausbildung von B- und T-Gedächtniszellen gegen spezifische Antigene, die im Falle einer erneuten Exposition mit dem Antigen eine schnellere Immunantwort ermöglichen [64, 65].

### 4.2.3. Zytokine

Zytokine sind Signalmoleküle, die von Zellen sekretiert werden und ihre Wirkung über Rezeptoren entfalten. Dies geschieht entweder durch Interaktion mit bereits an der Zelloberfläche vorhandenen Rezeptoren oder durch die Erhöhung ihrer Anzahl [66]. Zytokine können ihre Wirkung autokrin oder parakrin entfalten und es ist nicht unüblich, dass das



gleiche Zytokin an verschiedenen Zelltypen wirkt bzw. von unterschiedlichen Zellen ausgeschüttet wird [67]. Die Effekte, die ein Zytokin nach Bindung am Rezeptor auslöst, können äußerst vielseitig sein, andererseits können verschiedene Zytokine teilweise überlappende Reaktionen auslösen. Bekannte Zytokin-Subgruppen sind Interleukine (IL), Chemokine, Interferone (IFN), Koloniestimulierende Faktoren und Tumornekrosefaktoren [68]. Zytokine dienen der zellulären Kommunikation, sind an der Regulation physiologischer Prozesse beteiligt und kontrollieren zum Beispiel in der Lunge, die einer Vielzahl von Noxen ausgesetzt ist, die Initiierung und Koordination einer inflammatorischen Antwort [66].

Interferone sind Zytokine und essenziell in der Abwehr viraler Infektionen. Außerdem erfüllen sie modulierende Aufgaben in der angeborenen und erworbenen Immunantwort [69]. Es gibt drei Typen von Interferonen. Die größte Gruppe sind die Typ I-Interferone. Zu ihnen zählen  $IFN\alpha$  und  $IFN\beta$  sowie  $IFN\omega$ ,  $IFN\kappa$ ,  $IFN\epsilon$ ,  $IFN\zeta$ ,  $IFN\delta$ ,  $IFN\tau$ .  $IFN\gamma$  ist ein Typ II-Interferon, Typ III-Interferone sind IFNL1 ( $IFN-\lambda 1$ , IL-29), IFNL2 ( $IFN-\lambda 2$ , IL-28A) sowie IFNL3 ( $IFN-\lambda 3$ , IL-28B). Kürzlich wurde IFNL4 beschrieben, das ebenfalls in die Gruppe der Typ III-Interferone fällt [70]. In einigen Studien wird eine differenzierte und nicht vollständig verstandene Rolle von Typ I-Interferonen bei bakteriellen Infektionen beschrieben. Diese kann positive Effekte, beispielsweise bei Streptokokken, Legionellen oder *Helicobacter pylori* Infektionen aufweisen, aber auch nachteilig für den Krankheitsverlauf sein, wie bei Tuberkulose, *Staphylococcus aureus* oder Salmonellen Infektionen [71].

Werden Typ I-Interferone ausgeschüttet, lösen sie über IFN- $\alpha$  Rezeptor 1 (IFNAR1) und 2 (IFNAR2) eine Signalkaskade in der Zelle aus. Dieser Signalweg führt über die Januskinase (JAK) und Proteine der *Signal Transducers and Activators of Transcription* Familie (STAT-Proteine), kurz als JAK-STAT-Signalweg bezeichnet, zur transkriptionellen Regulierung von Interferon-stimulierten Genen (*Interferon-Stimulated Genes*, ISG). Dies geschieht über die Aktivierung von JAKs, die IFN-Rezeptorketten phosphorylieren, was zur Neupositionierung oder Bindung von STAT-Proteinen führt. Infolgedessen werden STAT1 und STAT2 phosphoryliert, vom Rezeptor freigesetzt und bilden ein Heterodimer. Durch Interaktion mit dem IFN-Regulationsfaktor (IRF) 9 wird der ISG-Faktor-3-Komplex (ISGF3) gebildet. Dieser wandert in den Zellkern und ermöglicht die Transkription von ISGs durch Bindung an Interferon-stimulierte Antwortelemente (*Interferon-Stimulated Response Elements*, ISREs) [70].

## Einleitung

Eines von über 300 Interferon-stimulierten Genen ist ISG15, ein Ubiquitin-ähnliches Protein. Ubiquitin modifiziert Proteine, was als Ubiquitinierung bekannt ist. Bei der Konjugation von Proteinen durch ISG15 spricht man aufgrund der Ähnlichkeit des Vorgangs von *ISGylation* [72]. Es gehört zu den sowohl am stärksten als auch am schnellsten ausgeschütteten Interferon-abhängigen Effektoren, besitzt Zytokin-artige Eigenschaften und wird neben Typ I-Interferonen auch direkt durch pathogene Stimuli wie bakterielle und virale Infektionen, genotoxische Stressoren, Retinsäuren sowie Lipopolysaccharide exprimiert. Bisher wurde eine direkte Hemmung von viraler Replikation durch ISG15 beschrieben sowie die Beteiligung an der Regulation der Interferonantwort durch Interaktion mit der *Ubl carboxy-terminal hydrolase 18* (USP18), einem wichtigen negativen Rückkopplungsmechanismus der Typ I-Interferon-Antwort am Interferon-Rezeptor IFNAR2. Somit kommt es durch Abwesenheit von ISG15 zu einer verlängerten Interferon-Antwort [73]. Unerwarteterweise wurde festgestellt, dass Erkrankte mit ISG15-Mangel keine erhöhte Anfälligkeit für eine Virusinfektion, aber für mykobakterielle Erkrankungen zeigten [74]. In einigen untersuchten bakteriellen Infektionen scheint ISG15 eine immunmodulatorische Rolle zu spielen. Ob ein direkter Einfluss auf bakterielle Replikation besteht, konnte bisher nicht geklärt werden [73].

### 4.2.4. Pathophysiologie der Pneumonie

In der Pathophysiologie der schweren ambulant erworbenen Pneumonie ist die Interaktion beteiligter Zelltypen von entscheidender Bedeutung. Pulmonalen Epithelzellen kommt bei einer akuten bakteriellen Infektion eine Schlüsselrolle zu. Werden Pathogene über Mustererkennungsrezeptoren (engl.: *Pattern Recognition Receptors*, PRRs), wie *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) oder *NOD-like*-Rezeptoren (NLR), erkannt, kommt es durch Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen zur Rekrutierung von Leukozyten [75-77]. Die sonst dichten Schlussleisten (engl.: *Tight Junction*) zwischen Epithelzellen sowie zwischen Endothelzellen können für die Migration von Makrophagen und Granulozyten in den Alveolarraum geöffnet werden. Durch anhaltende Zytokin-Ausschüttung und ein entstehendes Ungleichgewicht zwischen inflammatorischen und regulatorischen Signalen kann es zu einer schädlichen überschießenden Immunreaktion kommen. Diese stellt eine Ursache für die hohe Sterblichkeit trotz wirksamer antibiotischer Therapie dar [78]. Es folgt ein unkontrollierter Einstrom von Leukozyten, welcher neben der direkten Schädigung

gung durch die Pathogene zusätzlich die alveolokapilläre Barriere schwächt. Physiologisch bildet letztere eine mechanische Barriere, an der sowohl kapilläre Endothelzellen als auch alveoläre Epithelzellen beteiligt sind. Sie trennt luftgefüllte Alveolen von Blutgefäßen und ermöglicht gleichzeitig den effektiven Gasaustausch [79]. Der Verlust der pulmonalen Barrierefunktion führt über die Ansammlung von proteinreicher Flüssigkeit zur Ausbildung eines Lungenödems und fördert gleichzeitig die Ausbreitung der Inflammation über die Blutbahn in die Peripherie, was eine lebensbedrohliche Sepsis zur Folge haben kann [75, 78]. Eine Sepsis wiederum führt zu einer deutlichen Abnahme des kapillären Blutflusses und Störung der endothelialen vaskulären Barriere, was zu mikrovaskulärer Durchlässigkeit und Multiorganversagen führen kann [48].

### 4.3. Einzelzell-Sequenzierung

#### 4.3.1. Grundlagen

Mit dem Namen Einzelzell-Sequenzierung (engl.: *Single-Cell-RNA-Sequencing*, Sc-RNA-Seq) wird eine Methode der Sequenzierung von isolierten Boten-Ribonukleinsäuren (engl.: *messenger ribonucleic acids*, mRNA) individueller Zellen bezeichnet. Dies soll die Abbildung einer umfassenden Momentaufnahme der transkriptionellen zellulären Aktivität ermöglichen und wird auch als Transkriptomik bezeichnet.

Sc-RNA-Seq wurde 2013 zur „*Method of the Year*“ von *Nature Methods* gekürt und täglich erhöht sich die Anzahl publizierter Fachartikel über dieses Verfahren [80]. Die entscheidende Technologie, die Sc-RNA-Seq in seiner heutigen Form ermöglicht, ist als Sequenzierung der nächsten Generation (engl.: *Next-Generation-Sequencing*, NGS; auch „*Massively Parallel Sequencing*“, „*Second Generation Sequencing*“ oder „*Deep Sequencing*“) bekannt und wurde 2007 zur „*Method of the Year*“ ernannt [81]. Dadurch wurde es möglich, große Mengen an Desoxyribonukleinsäuren (engl.: *desoxyribonucleic acids*, DNA) zur selben Zeit parallel zu sequenzieren und tausende Gene gleichzeitig zu analysieren. Die Methodik der RNA Sequenzierung (RNA-Seq, auch bekannt als *RNA Bulk Analysis*, wenn viele Zellen eines Gewebes zusammen gemessen werden) nutzt dieses Verfahren zur Quantifizierung der vorliegenden Menge der RNA und löste die DNA-Chip-Technologie (engl.: *Microarray*) in vielen Forschungsbereichen ab [82].

Sc-RNA-Seq kann als Weiterentwicklung der *RNA Bulk Analysis* gesehen werden, da es die Zuordnung von sequenzierten Genen zur Ursprungszelle ermöglicht. Bei der klassischen RNA Sequenzierung ist diese rückwirkende Zuordnung nicht möglich, weshalb die

## Einleitung

Expressionsbibliotheken das durchschnittliche Expressionsmuster vertretener Zellen darstellen [83]. Vor allem für komplexe Organe mit vielen unterschiedlichen Zelltypen oder Tumoranalysen ist die Sc-RNA-Seq-Methode überlegen [84]. In den letzten 10 Jahren wurden verschiedene Ansätze der Einzelzell-Sequenzierung etabliert und die Anzahl an analysierbaren Zellen konnte um ein Vielfaches gesteigert werden. Das erste *Single Cell Sequencing*-System auf Basis des NGS wurde 2009 vorgestellt [85]. In frühen Publikationen wurden einige wenige Zellen analysiert. Konnte 2013 das Transkriptom von 18 Zellen gleichzeitig analysiert werden, sind heutzutage, mit dem System von 10x Genomics, bis zu 8 Proben mit je 10.000 Zellen im klassischen Kit oder bis zu 16 Proben mit je 20.000 Zellen im *High Throughput Kit* möglich [86, 87]. Eine entscheidende Weiterentwicklung stellte 2014 die Einführung von eindeutigen molekularen Identifikatoren (engl.: *Unique molecular identifiers*, UMI) dar [88, 89]. Heutzutage sind vor allem sogenannte Tröpfchen-basierte Hochdurchsatz (engl.: *droplet-based high-throughput*) Sc-RNA-Seq Systeme, wie inDrop, Drop-seq und 10x Genomics Chromium, weit verbreitet, mit denen tausende Zellen je Probe verarbeitet werden können. Bei diesen Systemen werden den mRNA-Molekülen einer Zelle individuelle zellspezifische Barcodes sowie UMI angehängt, um sie nachträglich unabhängig von technischen Vervielfältigungsschritten auszählen zu können. Eine vorhergehende Sortierung, beispielsweise durch fluoreszenzaktivierte durchflusszytometrische Zellsortierung (engl.: *fluorescence-activated cell sorting*, FACS), ist möglich, allerdings nicht zwingend notwendig. Alle diese Systeme bieten zufriedenstellende Resultate, Unterschiede zeigen sich jedoch im Preis und in der Genauigkeit. 10x Genomics Chromium bietet die höchste molekulare Sensitivität und weniger technisches Rauschen als die Konkurrenten, ist allerdings ein vergleichsweise teures Verfahren mit etwa 0,50 \$ pro Zelle im Vergleich zu 0,10 \$ pro Zelle bei Drop-seq und 0,25 \$ pro Zelle bei inDrop [90]. Der bekannteste alternative Ansatz zu Tröpfchen-basierten Systemen ist das Platten-basierte System Smart Seq 2, das eine deutlich höhere Sequenzierungstiefe sowie geringere Multiplettenraten und Umgebungs-RNA aufweist. Nachteile sind jedoch die kleinere Zahl an gleichzeitig zu analysierenden Zellen sowie die stark erhöhten Kosten pro analysierter Zelle [91].

In dieser Arbeit wurde die Erstellung von Genexpressionsbibliotheken (engl.: *gene expression libraries*) nach Verfahren des Herstellers 10x Genomics durchgeführt. Die individuelle Markierung der mRNA-Moleküle wird durch die Bildung von Einzelzell Emulsionströpfchen (engl.: *Gel Beads in Emulsion*, GEM) im *Chromium Controller* des Herstel-

lers ermöglicht. Dabei werden ein markierter *Gel Bead* mit einer einzelnen Zelle und Enzymen in einem Öltropfen eingeschlossen. Dies geschieht nach dem Prinzip der Grenzverdünnung (engl.: *Limiting Dilution*), sodass 90 bis 99 % der erzeugten GEM keine Zelle enthalten, während die restlichen größtenteils mit einer einzelnen Zelle beladen werden. In seltenen Fällen wird ein GEM mit zwei oder mehr Zellen gebildet. Hierbei wird von Multipletten gesprochen. Eine Voraussage über die Anzahl an Multipletten ermöglicht eine Tabelle im Handbuch des Herstellers, bei 10.000 Zellen werden knapp 8 % erwartet <sup>a</sup>. Im GEM werden das *Gel Bead* aufgelöst und *Primer* freigesetzt sowie die enthaltene Zelle lysiert. Die *Primer*, bestehend aus Illumina *TruSeq Read 1*, *10x Barcode*, UMI und einer *poly (dT)*-Sequenz, ermöglichen zusammen mit Reverse Transkriptase-Enzymen die Synthese von individuell markierter komplementärer Desoxyribonukleinsäure (engl.: *complementary DAN*, cDNA) aus polyadenylierter mRNA. Die erhaltene cDNA wird nachfolgend aufgereinigt und amplifiziert. Es folgt eine enzymatische Fragmentierung und Selektion nach optimaler Länge. Nachfolgend werden weitere *Primer* zur Sequenzierung im *Next Generation Sequencing*-Verfahren nach Illumina-Protokoll (auch bekannt als *Sequencing by Synthesis*; SBS) angehängt. Dies umfasst die P5- und P7-Region, einen Probenindex und *TruSeq Read 2*. Die generierten Genexpressionsbibliotheken entsprechen dem Standard-Illumina-Konstrukt, das mit der P5-Region beginnt und der P7-Region endet <sup>a</sup>.

#### 4.3.2. Organverdau

Der wichtigste und zugleich kritischste Punkt des Sc-RNA-Seq ist die Erstellung von Einzelzell-Suspensionen zur Abbildung der gewünschten Zellen. Ist dies für Zellen des Blutes oder Knochenmarks verhältnismäßig gut und zellschonend realisierbar, müssen für solide Organe enzymatische Verdauungen verwendet werden, um Zellen aus ihrem strukturellen Umfeld zu lösen. Diese Enzyme sind in der Regel bei 37 °C aktiv, was allerdings den Nachteil einer möglichen Verfälschung des Transkriptionsprofils durch stressinduzierte Neutranskription mit sich bringt [92]. Einige der häufigsten verwendeten Enzyme sollen im Folgenden kurz angeführt werden.

---

<sup>a</sup> Handbuch des Herstellers:  
[https://assets.ctfassets.net/an68im79xiti/1eX2FPdpeCgnCJtw4fj9Hx/7cb84edaa9eca04b607f9193162994de/CG000204\\_ChromiumNextGEMSingleCell3\\_v3.1\\_Rev\\_D.pdf](https://assets.ctfassets.net/an68im79xiti/1eX2FPdpeCgnCJtw4fj9Hx/7cb84edaa9eca04b607f9193162994de/CG000204_ChromiumNextGEMSingleCell3_v3.1_Rev_D.pdf), letzter Zugriff: 31.10.2021, 16:56.

## Einleitung

Neuerdings gibt es den alternativen Ansatz eines sogenannten „kalten Verdaus“ bei 4 °C unter Verwendung der Protease des Bakteriums *Bacillus licheniformis*. Hierdurch soll eine Reduktion an Zellstress bei der Isolation ermöglicht werden [92].

Eine andere Alternative stellt die Zugabe von Substanzen dar, die eine Neutranskription verhindern, wodurch altbewährte Enzyme zur Zellisolation verwendet werden können, beispielsweise des Zytostatikums Actinomycin D [93, 94]. Bei der Erstellung von Genexpressionsbibliotheken aus Zellkernen wurden RNA-Stabilisierungsmittel wie *RNAlater* oder *RNAprotect* verwendet, um einen Verlust an Transkripten während der enzymatischen Verdauung zu vermeiden [95, 96]. Bei der Erstellung von Suspensionen aus Zellkernen oder Methanol-fixierten Zellen empfiehlt der Hersteller 10x Genomics die Zugabe von RNase-Inhibitoren, um einen vorzeitigen Abbau der Ribonukleinsäuren und eine damit einhergehende Verfälschung des Transkriptoms zu verhindern [97].

### Häufig verwendete Enzyme

Dispase: Die Dispase ist eine neutrale Metalloprotease des Bakteriums *Paenibacillus polymyxa* [98]. Das Enzym weist ein breites pH-Optimum auf und obwohl es eine Zink-Metalloprotease ist, lösen Mangan-Ionen eine größere aktivierende und stabilisierende Wirkung aus. Durch das Ersetzen des Zinks durch Mangan kann die Aktivität um 50 % gesteigert werden [99].

DNase: Die Desoxyribonuklease I (DNase I) aus dem Rinderpankreas ist eine Endonuklease und wird durch zweiwertige Kationen aktiviert. Die maximale Aktivierung erfordert das Vorhandensein von Magnesiumionen ( $Mg^{2+}$ ) und zusätzlichen  $Ca^{2+}$ . Die Spezifität der Enzymreaktion wird durch verfügbare  $Mg^{2+}$  und Manganionen ( $Mn^{2+}$ ) bestimmt<sup>b</sup> [100].

Kollagenase: Bakterielle Kollagenasen weisen eine breitere Substratspezifität auf und können sowohl native als auch denaturierte Kollagene abbauen. Das am besten erforschte Kollagenasen-produzierende Bakterium ist *Clostridium histolyticum* [101]. Sieben unterschiedliche Kollagenasen konnten aus diesem Bakterium aufgereinigt werden, die sich am Ort der Spaltung der Triplehelix des Kollagens unterscheiden [102].

Elastase: Die Elastase ist eine Serinprotease mit breiter Substratspezifität [103]. Sie spaltet bevorzugt Aminosäureresten mit kleinen hydrophoben Seitenketten wie z. B. Glycin, Valin, Leucin, Isoleucin und Alanin, wodurch natives Elastin verdaut werden kann. Auch

---

<sup>b</sup> Handbuch des Herstellers:

[https://www.itwreagents.com/download\\_file/product\\_infos/A3778/en/A3778\\_en.pdf](https://www.itwreagents.com/download_file/product_infos/A3778/en/A3778_en.pdf), letzter Zugriff: 31.10.2021, 16:53

diverse andere Proteine können durch die Elastase verdaut werden, Kollagen allerdings nicht [104].

Liberase: Liberase TM ist eine Enzymmischung des Herstellers Sigma-Aldrich und enthält hoch aufgereinigte Kollagenase I und Kollagenase II. Diese beiden Kollagenase-Isomere werden in einem bestimmten Verhältnis zueinander und einer mittleren Konzentration der nicht aus Clostridien gewonnenen neutralen Protease Thermolysin gemischt. Laut Herstellerangaben haben Liberase-Enzymmischungen deutlich höhere spezifische Aktivitäten als herkömmliche Kollagenasen, wodurch mit geringeren Konzentrationen gearbeitet werden kann [105].

### 4.3.3. Einzelzell-Transkriptomanalysen in der Pneumologie

Auch in der Pneumologie wurden in den letzten Jahren zahlreiche Studien mit der Methodik des Sc-RNA-Seq publiziert, bis Ende 2019 waren es über 40 [106]. Die ersten umfangreichen Arbeiten wurden u. a. durch globale Initiativen wie *Human Cell Atlas* bzw. *CZ Biohub* ermöglicht, wo beispielsweise mit dem Tabula-Muris-Projekt mit über 100.000 analysierten Zellen aus 20 Organen ein Gesamtprofil der naiven Maus als Versuchstier generiert wurde [107-110]. Unter anderem konnte die Anwendbarkeit der Methode für die Zellen der Lunge gezeigt werden. Einschränkungen können allerdings bei neutrophilen Granulozyten auftreten, die verglichen mit anderen Leukozyten einen geringeren RNA-Gehalt aufweisen [111]. Der Hersteller 10x Genomics warnt, dass die zusätzlich starke RNase-Aktivität von Granulozyten im allgemeinen zu weniger verwertbaren Transkripten führen kann [112].

2018 konnte der bis dato unbekannte Zelltyp Ionozyten identifiziert werden, die einen Großteil der CFTR Chlorid-Kanäle produzieren. Diese sind besonders im Krankheitsbild der Zystischen Fibrose (Mukoviszidose) relevant [40]. Weitere Arbeiten zur zellulären Vielfalt untersuchten ILC-Vorläuferzellen und charakterisierten ILC-2-Unterfamilien oder beleuchteten die Differenzierung von pulmonalen mesenchymalen Gewebezellen [113, 114].

In einer weiteren Arbeit wurde die homöostatische Gewebe-Transkription von Raredon *et al.* in mehreren Säugetierspezies sowie im Menschen untersucht. So wurden anhand häufig verwendeter Modellorganismen Gemeinsamkeiten und Unterschiede dargelegt, wie zum Beispiel die gewebs-homöostatische Funktion der Typ I Alveolarepithelzellen [115].

## Einleitung

Auch für die Identifikation neuer therapeutischer Ansatzpunkte eignet sich Sc-RNA-Seq, beispielsweise bei malignen Erkrankungen [116-118]. Eine herausfordernde strukturelle Erkrankung ist die idiopathische Lungenfibrose. In der Publikation von Reyfman *et al.* wurde mittels Sc-RNA-Seq ein umfassender Atlas dieses Krankheitsbilds generiert, um grundlegende Informationen bereitzustellen, die zur Verbesserung personalisierter Therapien für Erkrankte führen könnten [119].

Durch die weltweite Ausbreitung des *severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2* (SARS-Corona-2-Virus, SARS-CoV-2) und die entstandene pandemische Situation erfuhr die Methode eine nie dagewesene Beliebtheit und die Sequenzierungen wurden in außergewöhnlich großem Umfang durchgeführt [110]. Beispielweise wurde eine Untersuchung der angeborenen Immunantwort in 780.000 Blutzellen von 130 Erkrankten durchgeführt [120]. Insbesondere bei der Klärung von Eintrittspforten des Virus in die Zellen des respiratorischen Traktes wurde die Einzelzell-Sequenzierung erfolgreich eingesetzt [121]. Durch den Umfang an publizierten Fachartikeln wurde eine Reihe neuer und innovativer Analyseverfahren vorgestellt, wie beispielsweise von Chua *et al.* [122]. In der Publikation, die über 160.000 Zellen von 19 Erkrankten mit schwerem und mittlerem Coronavirus-Krankheit-2019 (engl.: *coronavirus disease 2019*, COVID-19) Verlauf (nach WHO-Kriterien) untersuchte, wurde mit CellPhoneDB ein Analyse-Tool zur Interpretation von möglichen stattgefundenen Zell-Zell Interaktionen auf Basis von Rezeptor-Ligand-Paaren vorgestellt [123]. Zusätzlich wurden *Pseudo-time-trajectory*-Analysen mit dem Monocle2 Algorithmus vorgestellt, wodurch die Umwandlung von Basalzellen zu Zilien-tragenden Zellen gezeigt werden konnte [124]. Eine zweite Publikation zu COVID-19 von Su *et al.* konnte das vielversprechende Potential von *Multi-Omics*-Datensätzen für die infektiologische Forschung darlegen. Durch die Integration von Daten, gewonnen durch Einzelzell-Transkriptomanalysen in Kombination mit B- und T-Zellrezeptor- sowie Oberflächenmarker-Informationen, sowie Einzelzell-Sekretomik, Proteomik und Metabolomik Untersuchungen konnte ein ganzheitliches Bild der Immunantwort über unterschiedliche Zellpopulationen hinweg als Basis für therapeutische Ansatzpunkte erstellt werden [125].



## **5. Zielsetzung und Fragestellung**

Ziel dieser Arbeit war es, ein Einzelzell-Isolationsprotokoll zu entwickeln und zu validieren, welches alle erforderlichen technischen und biologischen Qualitätskriterien erfüllt, um im infektiologischen Kontext für Genexpressionsanalysen von infiziertem Lungengewebe verwendet werden zu können. Die entscheidende Herausforderung hierbei ist, dass die zugrundeliegende Einzelzell-Suspension neben einer authentischen Darstellung relevanter Zelltypen der Lunge eine hohe Viabilität, eine geringe Stressantwort der Zellen und eine geringe Ausbildung von Zell-Multipletten aufweisen muss. Das vielversprechendste Einzelzell-Isolationsprotokoll sollte anschließend zur Einzelzell-Sequenzierung herangezogen und der erhaltene Datensatz exploratorisch auf die anti-mikrobielle Immunantwort auf Einzelzellebene untersucht werden, um Genexpressions-Signaturen unterschiedlicher hämatopoetischer und nicht-hämatopoetischer Zellkompartimente zu identifizieren. Hierdurch sollten Erkenntnisse gewonnen werden, die zu einem umfassenderen Verständnis der pathophysiologischen Grundlagen der bakteriellen Pneumonie beitragen und die Grundlage für weitere Einzelzell-Analysen im infektiologischen Kontext bilden.



## 6. Material und Methodik

### 6.1. Materialien

#### 6.1.1. Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
bakteriologische Petrischalen	Corning (USA)
Columbia Agarplatten mit 5 % Schafblut	BD Biosciences (Heidelberg)
<i>DNA LoBind Tubes 1,5 ml PCR clean</i>	Eppendorf (Hamburg)
<i>DNA LoBind Tubes 2,0 ml PCR clean</i>	Eppendorf (Hamburg)
Handschuhe	B. Braun (Melsungen)
Impfschlingen (1/10 µl)	Sarstedt (Nümbrecht)
Kanüle 18 G	B. Braun (Melsungen)
Kanüle 20 G	B. Braun (Melsungen)
Kanüle 26 G	B. Braun (Melsungen)
Kanüle 27 G	BD (Heidelberg)
Kryo-Röhrchen (1 ml)	Thermo Fisher Scientific (USA)
Küvetten	Sarstedt (Nümbrecht)
<i>PCR Tube Strips 0,2 ml</i>	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitze (0,1-10 µl)	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitze (0,5-20 µl)	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitze (1000 µl)	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitze (200 µl)	Sarstedt (Nümbrecht)
<i>Qubit™ Flex Assay Tube Strips</i>	Thermo Fisher Scientific (USA)
Reagenzgefäß (0,5/1,5/2,0 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Zentrifugenröhrchen (15/50 ml)	Corning (USA)
Reagenzien Reservoir 25 ml geteilt, steril	VistaLab Technologies (USA)
Rundboden-Polystyrol-Röhrchen 5 ml	Corning (USA)
Serologische Pipetten (2/5/10/25 ml)	Corning (USA)
Spritzen (1 ml)	B. Braun (Melsungen)
Spritzen (2/5/10 ml)	BD (Heidelberg)
Urinbecher (100 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Vakuum Filter System	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellfilter für magnetische Zellisolierung (30 µm)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)

Zellsiebe (40/70/100 µm)	Greiner Bio-One (Österreich)
--------------------------	------------------------------

### 6.1.2. Geräte und Instrumente

Produkt	Spezifikation	Hersteller
Analysewaage	Sartorius, MC 5(-OCE)	Sartorius AG (Göttingen)
Autoklav	Tuttnauer Systec 2540 EL	Systec GmbH (Wettenberg)
Brutschrank	Heraeus Typ BB 6220 O2	Kendro Laboratory Products (Osterode)
<i>Chromium Controller</i>		10x Genomics (USA)
Durchflusszytometer	BD FACSCanto II™	BD (Heidelberg)
<i>Fragment Analyzer</i>		Advanced Analytical Technologies, Inc. (USA)
Galaxy Mini Zentrifuge		VWR International GmbH (Darmstadt)
Gefrierschrank -80 °C		Engmann Kühlsysteme (Mannheim)
Inkubator TH 30		Edmund Bühler (Bodelshausen)
Kühlschrank 4 °C / Gefrierschrank -20 °C	Liebherr Profi line	Engmann Kühlsysteme (Mannheim)
Magnet für magnetische Säulen	MidiMACS Separator	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Magnethalter	MACS MultiStand	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Magnetrührer	Thermo Scientific™ Variomag Mono Direkt	Thermo Fisher Scientific (USA)
Multikanal-Pipetten	10 µl / 100 µl / 300 µl	Eppendorf (Hamburg)
Sequenzierautomat	NextSeq500	Illumina (USA)
Photometer	Multiskan™ Mikrotiterplatten-Photometer	Thermo Fisher Scientific (USA)
Photometer	Scanning Spectrophotometer, Uvikon XL	BioTek Instruments (USA)
<i>Pipette boy</i>	Stripettor Ultra	Corning (USA)

Pipetten	10 µl / 100 µl / 200 µl / 1000 µl	Eppendorf (Hamburg)
Präparationsbesteck		Fine Science Tools GmbH (Heidelberg)
Qubit Flex Fluorometer		Thermo Fisher Scientific (USA)
Rotlichtlampe	Bosotherm 4000	Bosch + Sohn GmbH (Jungin- gen)
Säulen für magnetische Zellisolierung	MS Columns	Miltenyi Biotec (Bergisch Glad- bach)
Sicherheitswerkbank	Hera Safe Typ HS 12	Kendro Laboratory Products (Osterode)
Thermometer	BAT-12 MicroprobeTher- mometer	Physitemp Instruments, Inc. (USA)
Vortex-Schüttler	Vortex-Genie 2® Model G-560E	Scientific Industries, Inc. (USA)
Wasserbad	SW23 Schüttelwasserbad	Julabo GmbH (Seelbach)
Zählkammer	Neubauer-Zählkammer bright-line	LO-Laboroptik GmbH (Fried- richsdorf)
Zentrifuge	Biofuge fresco	Kendro Laboratory Products (Hanau)

### 6.1.3. Reagenzien

Produkt	Hersteller
10 % Tween 20	Bio-Rad (USA)
<i>Absolute Ethanol</i> (200 proof)	Thermo Fisher Scientific (USA)
Actinomycin D	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
<i>Buffer EB (Elution buffer)</i>	Qiagen GmbH (Hilden)
<i>CountBright™ Absolute Counting Be- ads</i>	Thermo Fisher Scientific (USA)
Dulbecco's Phosphatgepufferte Salz- lösung (1 × PBS)	Thermo Fisher Scientific (USA)
<i>Dynabeads™ MyOne™ SILANE</i>	10x Genomics (USA)

## Material und Methodik

EDTA	Thermo Fisher Scientific (USA)
Erythromycin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
<i>FACSFlow™</i>	BD (Heidelberg)
<i>FACS™ Shutdown Solution</i>	BD (Heidelberg)
Formaldehyd-Lösung, gepuffert (4 %)	AppliChem (Darmstadt)
Glycerin ≥ 99,7 %, p.a., Ultra Qualität, synthetisch, wasserfrei	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Isotonische Kochsalzlösung 0,9 %	Fresenius Kabi (Langenhagen)
Methanol >99,5 %	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
<i>Nuclease- Free Water (Not DEPC Treated)</i>	Ambion (USA)
Formaldehyd, methanolfrei	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
<i>RBC Lysis Buffer 10X</i>	Santa Cruz Biotechnology (USA)
RNaseZap™	Thermo Fisher Scientific (USA)
RPMI-1640 Medium	Merck (Darmstadt)
<i>SPRIselect</i>	Beckman Coulter (USA)
<i>TE Buffer</i>	Thermo Fisher Scientific (USA)
Thilo Tears Augengel	Alcon Pharma GmbH (Freiburg im Breisgau)
<i>TRizol™ Reagent</i>	Thermo Fisher Scientific (USA)
Trypanblau	Biochrom (Berlin)
<i>UltraPure™ LMP Agarose</i>	Thermo Fisher Scientific (USA)

### 6.1.4. Enzyme

Produkt	Hersteller
Dispase	Corning (USA)
DNase I	AppliChem (Darmstadt)
Elastase	SERVA (Heidelberg)
Kollagenase C1-28	Merck (Darmstadt)
Kollagenase CLS II	Biochrom (Berlin)
Liberase TM	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

**6.1.5. Antikörper**

Antikörper	Klon	Fluorochrom	Konzentration	Hersteller
aCD16/32	2.4G2	-	0,5 mg/ml	BD (Heidelberg)
CD11b	M1/70	PE-Cy7	0,2 mg/ml	eBioscience (Frankfurt)
CD11c	HL3	APC	0,2 mg/ml	BD (Heidelberg)
CD24	M1/69	BV510	0,2 mg/ml	BD (Heidelberg)
CD31	MEC13.3	PerCP-Cy5.5	0,2 mg/ml	BioLegend (USA)
CD45	30-F11	FITC	0,5 mg/ml	BD (Heidelberg)
CD90.2	30-H12	PB	0,5 mg/ml	BioLegend (USA)
CD326	G8.8	PE	0,2 mg/ml	BioLegend (USA)
F4/80	BM8	PE	0,2 mg/ml	eBioscience (Frankfurt)
FVD		eFluor™ 780		eBioscience (Frankfurt)
Ly6C	HK1.4	BV510	0,1 mg/ml	BioLegend (USA)
Ly6G	1A8	PerCP-Cy5.5	0,2 mg/ml	BD (Heidelberg)
MHCII	M5/114.15.2	APC	0,2 mg/ml	eBioscience (Frankfurt)
Siglec F	E50-2440	BV421	0,5 mg/ml	BD (Heidelberg)
T1a/Pdpn	8.1.1	PE-Cy7	0,2 mg/ml	BioLegend (USA)

a: Anti, APC: Allophycocyanin, BV: Brilliant Violet, CD: Unterscheidungsgruppen, Cy: Cyanine, FITC: Fluorescein, PB: Pacific Blue, PE: Phycoerythrin, PerCP: Peridinin-Chlorophyll.

**6.1.7. Puffer und Medien**

Puffer	Zusammensetzung	Hersteller
Nährmedium	Destilliertes Wasser	-
	0,5 % Hefeextrakt	BD (Heidelberg)
	3 % Todd Hewitt Bouillon	BD (Heidelberg)
Gefriermedium	20 % Glycerin	Merck (Darmstadt)
	80 % Nährmedium	-
Einzelzell-Isolationspuffer	PBS	Thermo Fisher Scientific (USA)
	BSA 0,5 %	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
	Actinomycin D 2 µg/ml	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Erylyse Puffer	10 % 10 × Erylyse Puffer 90 % destilliertes Wasser	Santa Cruz Biotechnology (USA)

## Material und Methodik

MACS Puffer	20 × <i>Binding Buffer</i> <i>Nuklease Free Water</i> Actinomycin D	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach), Ambion (USA) Sigma Aldrich (Taufkirchen)
-------------	---	---

### 6.1.8. Kits

Bezeichnung	Hersteller
<i>Chromium Accessory Kit</i>	10x Genomics (USA)
<i>Chromium i7 Multiplex Kit</i>	10x Genomics (USA)
<i>Chromium Next GEM Chip G Single Cell Kit</i>	10x Genomics (USA)
<i>Chromium Next GEM Single Cell 3' Gel Bead Kit v3.1</i>	10x Genomics (USA)
<i>Chromium Next GEM Single Cell 3' GEM Kit v3.1</i>	10x Genomics (USA)
<i>Chromium Next GEM Single Cell 3' Library Kit v3.1</i>	10x Genomics (USA)
<i>Chromium Next GEM Training Kit</i>	10x Genomics (USA)
DNF-474 HS NGS 1-6000bp	Agilent (USA)
<i>MACS Dead Cell Removal Kit</i>	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
<i>NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (150 Cycles)</i>	Illumina (USA)
<i>Qubit™ dsDNA HS Assay Kit</i>	Thermo Fisher Scientific (USA)

### 6.1.9. Narkose

Produkt	Hersteller
NaCl 0,9 %	B. Braun (Melsungen)
Ketamin (100 mg/ml)	Bela-pharm (Vechta)
Xylazin 2 %	CP-Pharma (Burgdorf)

### 6.1.10. Software

Bezeichnung	Hersteller/ Entwickler
BB Browser	Bio Turing (USA)
Cell Ranger Software	10x Genomics (USA)
EndNote 20	Clarivate Analytics Clarivate Analytics (USA)



FACS Diva	BD (Heidelberg)
GraphPad Prism, Version 9	Graphpad Software (USA)
Inkscape	Inkscape Community
Loupe Browser	10x Genomics (USA)
Office 365	Microsoft (USA)
R	R Core Team (Österreich)
R Package: ggplot	Tidyverse
R Package: Seurat	Santija Lab
R Package: Single Cell Experiment	Bioconductor
R Studio	R Studio Inc. (USA)
Windows 10	Microsoft (USA)

## 6.2. Methoden

### 6.2.1. Versuchstiere

Zur Etablierung eines geeigneten Zellisolationsprotokolls der Einzelzell-Sequenzierung wurden weibliche 12 bis 20 Wochen alte C57BL/6J-Mäuse der Forschungseinrichtungen für experimentelle Medizin (FEM) der Charité verwendet. Die Experimente zur Untersuchung der pulmonalen Genexpression bei Pneumokokken-Pneumonie wurden mit weiblichen, acht bis zehn Wochen alten C57BL/6J-Mäusen der Forschungseinrichtungen für experimentelle Medizin (FEM) der Charité bzw. des Züchters Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) durchgeführt.

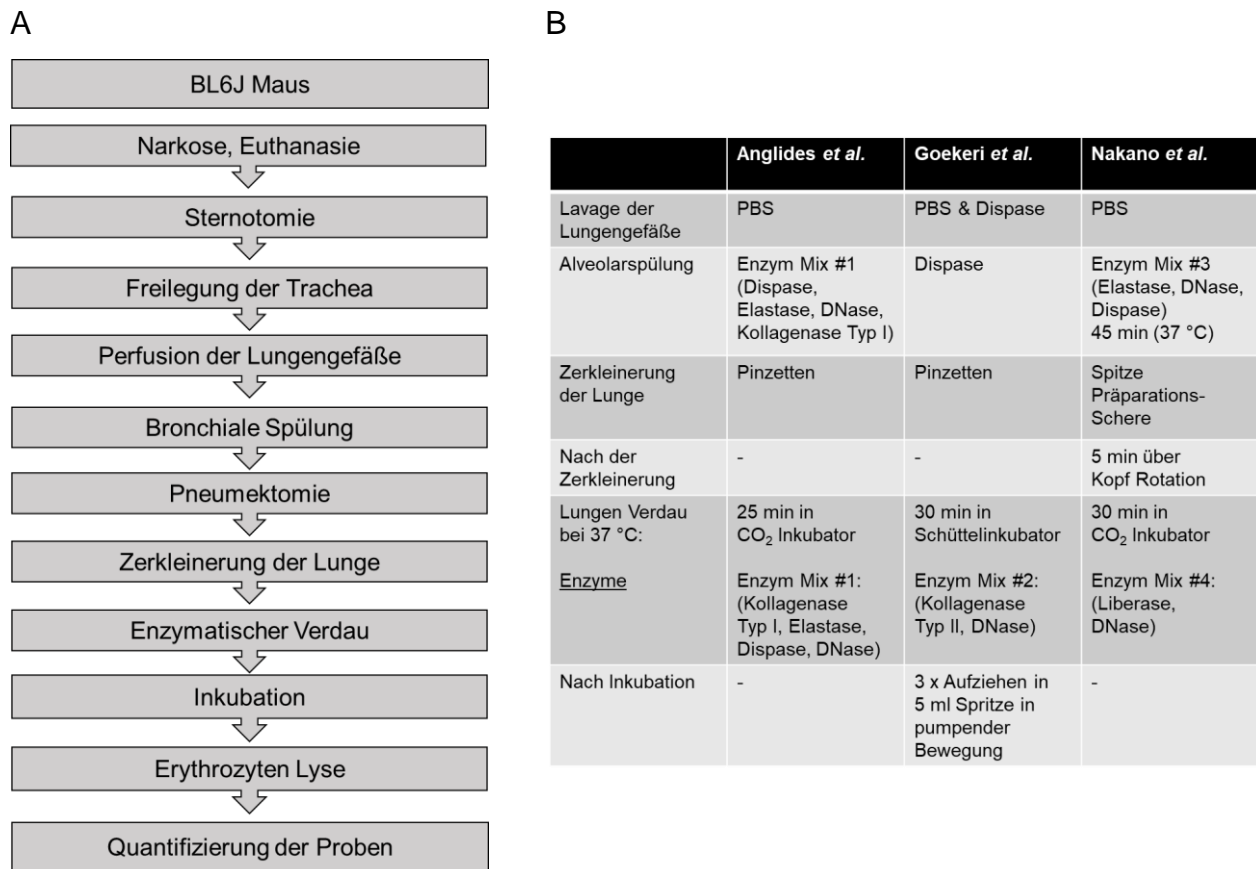
Die Versuchstiere wurden im Tierstall unter pathogenfreien Bedingungen mit zwölfstündig wechselnder Hell-Dunkel-Periode gehalten. Futter und Trinkwasser standen jederzeit *ad libitum* zur Verfügung, in einem Käfig waren maximal vier Tiere zusammen untergebracht. Alle Tierversuche wurden von der zuständigen Behörde, dem Landesamtes für Gesundheit und Soziales Berlin (LAGeSo), genehmigt und alle Vorgaben der Charité – Universitätsmedizin Berlin sowie des LAGeSo wurden eingehalten.

Bei der Durchführung der Infektion bzw. Scheininfektion wurden die Versuchstiere mittels intraperitonealer Injektion von Ketamin (93,5 mg/kg Körpermasse, KM) und Xylazin (15 mg/kg KM) anästhesiert (Methodik der Infektion ab „6.2.4. Infektion mit *Streptococcus pneumoniae*“). Zur Organentnahme in der akuten Phase der Inflammation, 24 Stunden nach Infektion, wurden die Versuchstiere mittels intraperitonealer Injektion eines Narkosegemischs, bestehend aus Ketamin (200 mg/kg KM) und Xylazin (20 mg/kg KM), in steriler, isotoner Kochsalzlösung anästhesiert und die Tiefe der Narkose wurde durch Ausbleiben des Zwischenzehenreflexes kontrolliert. Nachdem das Präparationsgebiet großzügig mit Ethanol desinfiziert wurde, erfolgte die Öffnung der Bauchhöhle und Euthanasie des Versuchstieres durch Durchtrennung der *Vena Cava* mit dadurch einsetzendem Kreislaufversagen.

### 6.2.2. Etablierung eines Einzelzell-Suspensionsprotokolls

Um die hohen Qualitätskriterien eines Zellisolationsprotokolls, geeignet für eine Einzelzell-Transkriptomanalyse, zu erfüllen, wurden drei Protokolle aus Literatur, von eng kooperierenden Arbeitsgruppen sowie ein laborinternes etabliertes Zell-Isolationsprotokoll miteinander verglichen (Unterpunkte 6.2.2.1. bis 6.2.2.3.) [126-128]. Abbildung 2 gibt einen Überblick über die Arbeitsschritte zur Herstellung von Einzelzell-Suspensionen aus

murinem Lungengewebe. Die Phänotypisierung isolierter Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie (BD FACSCanto™ II).



**Abbildung 2: Zellisolation aus murinen Lungen**

Lungenzellen wurden anhand dreier unterschiedlicher Isolationsprotokolle durch enzymatischen Verdau isoliert. **A:** Übersicht über die Arbeitsschritte der Zell-Isolation; **B:** Zusammenfassung verwendeter Enzyme und Inkubationszeiten der Protokolle. PBS: phosphatgepufferte Kochsalzlösung. Originalpublikationen der angeführten Protokolle: Angelidis *et al.* [126], Goekeri *et al.* [127], Nakano *et al.* [128].

**6.2.2.1. Protokoll nach Angelidis *et al.***

Das erste Protokoll (Angelidis *et al.*) wurde unserer Arbeitsgruppe von der AG Schiller des Helmholtz Zentrums in München zur Verfügung gestellt [126].

Nach Eröffnung des Thorax mittels medianer Sternotomie wurden die Lungengefäße über die rechte Herzkammer mit 5 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (engl.: *phosphate buffered saline*, PBS) gespült, um die Anzahl an Zellen aus der Blutbahn im Lungengewebe zu minimieren. Mittels 18 G Nadel und 2 ml Spritze wurden 2 ml des Enzym Mix #1 (Kollagenase Typ I CLS I 2 mg/ml, Elastase 1 mg/ml, Dispase 50 Caseinolytic Units/ml sowie DNase 30 µg/ml in PBS + 10 % fetales Kälberserum, FCS; Tabelle 1) über

die Trachea in den Alveolarraum eingebracht. Die Lunge wurde entnommen, in eine Petrischale mit 4 ml des Enzym Mix #1 transferiert, in kleine Stücke zerteilt und für 25 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in einem Brutschrank (Heraeus Instruments) inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die verdauten Lungenstücke mit 10 ml Puffer (PBS + 10 % FCS) gewaschen und durch ein 70 µm EASYstrainer™ Zellsieb in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen (BD Falcon) gefiltert. Die verdauten Lungenstücke wurden mit dem Stempel einer 5 ml Spritze sachte über dem Zellsieb ausgestrichen, um ein Maximum an Lungenzellen zu erhalten, und bei 300 × g für 5 min zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 2 ml Erythrozyten Lyse Puffer resuspendiert, um verbliebene Erythrozyten zu beseitigen. Nach einminütiger Inkubation wurden 10 ml Puffer (PBS + 10 % FCS) zugefügt und die Probe wurde erneut zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstands wurde das Zellpellet in 1 ml Puffer resuspendiert.

### **6.2.2.2. Protokoll nach Goekeri *et al.***

Das zweite Protokoll (Goekeri *et al.*) beruhte auf der Zusammenführung mehrerer etablierter Isolationsprotokolle unserer Arbeitsgruppe, ursprünglich etabliert für die Isolation von Endothelzellen aus Lungengewebe [110, 127, 129].

Der Thorax wurde durch eine mediane Sternotomie eröffnet und die Lungengefäße wurden über die rechte Herzkammer mit 5 ml PBS und direkt im Anschluss mit 2 ml Dispase perfundiert. Der Alveolarraum wurde über die Trachea mit 700 µl Dispase benetzt, eingebracht durch eine 18 G Nadel und eine 1 ml Spritze. Um die Protease im Alveolarraum zu halten, folgte die Applikation von 500 µl einprozentiger Agarose in PBS. Nach 5 min Inkubation wurde die Lunge entnommen, zweifach in kaltes PBS getaucht und in eine Petrischale mit 2 ml des Enzym Mix #2 (DNase 1 mg/ml und Kollagenase Typ II CLS II 750 Units/ml in PBS + 0,5 % Bovines Serumalbumin, BSA; Tabelle 1) überführt. Durch repetitives Beklopfen mit 2 Pinzetten wurde die Lunge zerkleinert und für 30 min in einen Schüttelinkubator (TH 30 Inkubationshaube kombiniert mit Universalschüttler SM 30 Edmund Bühler GmbH) bei 37 °C sowie 125 Umdrehungen pro Minute gelegt. Die erhaltene Lungen-Suspension wurde mittels 5 ml Spritze und 18 G Nadel dreimal in einer gleichmäßig pumpenden Bewegung aufgezogen und wieder in die Petrischale appliziert. Anschließend wurde die Suspension durch ein 70 µm EASYstrainer™ Zellsieb gefiltert, mit Puffer (PBS + 0,5 % BSA) gewaschen und dem Zellpellet nach dem Zentrifugieren bei

300 × g 2 ml Erythrozyten Lyse Puffer zugesetzt, um verbleibende Erythrozyten zu beseitigen. Danach wurde die Probe erneut mit Puffer (PBS + 0,5 % BSA) gewaschen, zentrifugiert und mittels Zellsieb gefiltert.

### 6.2.2.3. Protokoll nach Nakano *et al.*

Das dritte Protokoll (Nakano *et al.*) beruht auf der Veröffentlichung „*Isolation and Purification of Epithelial and Endothelial Cells from Mouse Lungs*“ von Nakano *et al.* [128].

Nach Eröffnung des Thorax durch mediane Sternotomie wurden die Lungengefäße über die rechte Herzkammer mit 5 ml kaltem PBS gespült und der Thymus, das Herz sowie das Diaphragma reseziert. Mit einer 1 ml Spritze und einer 18 G Nadel wurde der Alveolarraum mit 1 ml des Enzym Mix #3 (Elastase 4 U/ml, Dispase 1 U/ml sowie DNase 200 µg/ml in Roswell Park Memorial Institute-1640 Zellkulturmedium, RPMI; Tabelle 1) lavagiert. Danach wurde erneut 1 ml des oben genannten Enzym Mix appliziert und die Trachea mittels Metallclip verschlossen. Die Lunge wurde mitsamt Trachea und Metallclip entnommen, in eine Petrischale mit 2 ml des oben genannten Enzym Mix #3 gelegt und für 45 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in einem Brutschrank (Heraeus Instruments) inkubiert. Nach Inkubation wurde die Trachea entfernt, die Lunge in eine neue Petrischale mit 1 ml RPMI Medium transferiert, mittels Präparationsschere in unter 1 mm große Stücke geschnitten und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen (BD Falcon) überführt. Die Petrischale wurde mit 10 ml RPMI gewaschen, den Lungenstücken im Reaktionsgefäß zugefügt und das Reaktionsgefäß für 5 min über Kopf rotiert (*Roto-Shake Genie*, Scientific Industries). Anschließend wurde die Suspension durch ein 70 µm EASYstrainer™ Zellsieb gefiltert. Das Zellsieb wurde mit dem verbleibenden Lungengewebe in eine neue Petrischale mit 5 ml Enzym Mix #4 (Liberase 25 µg/ml sowie DNase 200 µg/ml in RPMI; Tabelle 1) überführt und für 30 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in einem Brutschrank (Heraeus Instruments) inkubiert. Die gefilterte Zellsuspension wurde währenddessen auf Eis gelagert. Nach der Inkubation wurde der Filter auf das Reaktionsgefäß gelegt und mit 10 ml Puffer (PBS + 0,5 % BSA und 2 mM Ethylendiamintetraessigsäure, EDTA) gespült. Dem Zellpellet wurde nach dem Zentrifugieren bei 500 × g 2 ml Erythrozyten Lyse Puffer zugesetzt, um verbleibende Erythrozyten zu beseitigen und die Zellsuspension erneut mit Puffer (PBS + 0,5 % BSA und 2 mM EDTA) gewaschen, zentrifugiert und gefiltert.

**Tabelle 1: Überblick über die verwendeten enzymatischen Verdauösungen**

Enzym Mix #1	Enzym Mix #2	Enzym Mix #3	Enzym Mix #4
DNase (30 µg/ml)	DNase (1 mg/ml)	DNase (200 µg/ml)	DNase (200 µg/ml)
Kollagenase Typ I CLS I (2 mg/ml)	Kollagenase Typ II CLS II (750 Units/ml)	-	Liberase (25 µg/ml)
Dispase (50 <i>Caseinolytic Units/ml</i> )	-	Dispase (1 U/ml)	-
Elastase (1 mg/ml)	-	Elastase (4 U/ml)	-
in PBS + 10 % FCS	in PBS + 0,5 % BSA	in RPMI	in RPMI

PBS: phosphatgepufferte Kochsalzlösung, FCS: fetales Kälberserum, BSA: bovines Serumalbumin, RPMI: Roswell Park Memorial Institute-1640 Zellkulturmedium

#### 6.2.2.4. Magnetische Zell-Aufreinigung

Erhaltene Einzelzell-Suspensionen wurden einer magnetischen Zell-Aufreinigung (engl.: *Magnetic Activated Cell Sorting*, MACS) unterzogen, um den Anteil toter Zellen weiter zu minimieren. Hierfür wurden  $1 \times 10^7$  isolierte Lungenzellen bei  $300 \times g$  zentrifugiert, das erhaltene Zellpellet in 100 µl *Micro Beads* des Herstellers (*Dead Cell Removal Kit*, Miltenyi Biotec GmbH) resuspendiert und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 900 µl *1x Binding Buffer* wurde die Suspension über einen 30 µm *Pre Separation Filter* durch eine Magnetsäule (MS Column; alles Miltenyi Biotec GmbH) in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen (BD Falcon) geschleust, wodurch die toten Zellen in der Säule verblieben. Anschließend wurde die Magnetsäule mit 2 ml Pufferlösung gespült, um den Verlust an lebenden Zellen zu minimieren<sup>c</sup>.

#### 6.2.3. Durchflusszytometrische Darstellung von Lungenzellen

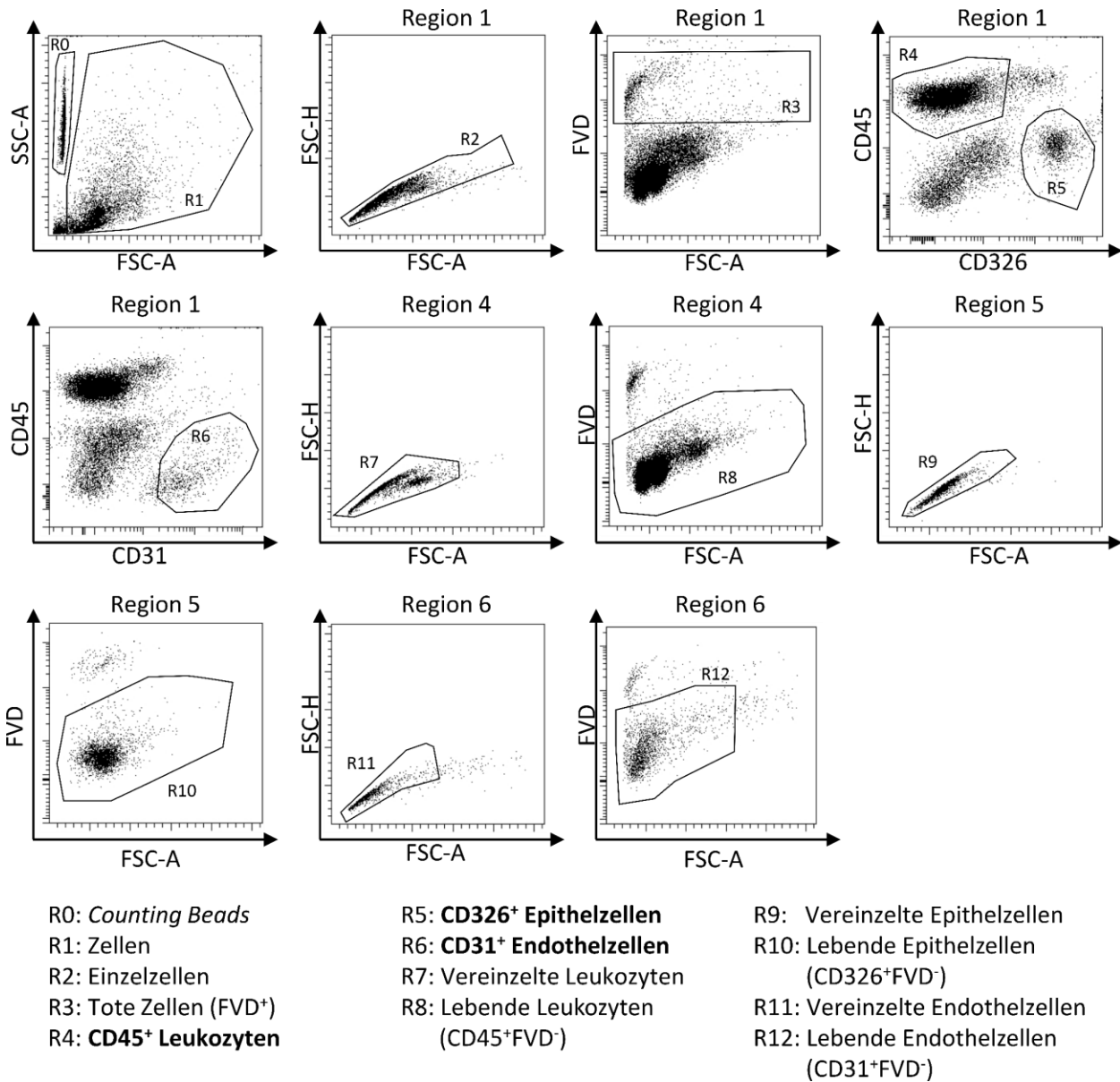
Leukozyten, Endothel- sowie Epithelzellen der Einzelzell-Suspensionen wurden als relevante Hauptbestandteile phänotypisiert, durchflusszytometrisch (BD FACSCanto™ II) gemessen und Viabilität sowie Vereinzelnung bestimmt [127]. Eine 100 µl Probe wurde in ein Rundboden-Polystyrolröhrchen (BD Biosciences, Heidelberg) überführt und mit 0,5 µl (1:200) anti-CD16/CD32 (Klon: 2.4G2, BD) auf Eis inkubiert, um eine unspezifische Antikörperbindung zu verhindern. Es folgte die Zugabe von 1,0 µl (1:100) anti-CD326 (Klon: G8.8, Biolegend), 0,3 µl (1:333) anti-CD31 (Klon: MEC13.3, Biolegend), 0,25 µl (1:400)

<sup>c</sup> Handbuch des Herstellers: <https://www.miltenyibiotec.com/upload/assets/IM0001218.PDF>, letzter Zugriff: 03.11.2021, 09:43.

anti-CD45 (Klon: 30-F11, BD) sowie 0,3  $\mu$ l (1:333) eines Durchflusszytometrie-Markers zur Viabilitätsbestimmung (*Fixable viability dye*, FVD, eBioscience) und eine Inkubation für 30 min in Dunkelheit bei 4 °C [127]. Die Probe wurde mit Puffer (PBS + 0,5 % BSA) aufgefüllt, bei 300  $\times$  g zentrifugiert, der Überstand verworfen, das gefärbte Zellpellet in 200  $\mu$ l Puffer resuspendiert und gemessen (Abbildung 3).

### 6.2.3.1. Durchflusszytometrische Darstellung von Leukozyten

Zur Darstellung ausgewählter Leukozyten-Subpopulationen wurde eine zusätzliche Färbung durchgeführt. Diese ermöglichte die Identifikation alveolärer Makrophagen, neutrophiler und eosinophiler Granulozyten, dendritischer Zellen sowie inflammatorischer Makrophagen beziehungsweise Monozyten (Abbildung 4). 100  $\mu$ l Einzelzell-Suspensionen wurden in ein Rundboden-Polystyrolröhrchen überführt und mit 0,5  $\mu$ l (1:200) anti-CD16/CD32 (Klon: 2.4G2, BD) auf Eis inkubiert, um einer unspezifischen Antikörperbindung vorzubeugen. Nachfolgend wurden 0,5  $\mu$ l (1:200) anti-CD11c (Klon: HL3, BD), 0,5  $\mu$ l (1:200) anti-CD11b (Klon: M1/70, eBioscience), 0,8  $\mu$ l (1:125) anti-F4/80 (Klon: BM8, eBioscience), 0,25  $\mu$ l (1:400) anti-CD45 (Klon: 30-F11, BD), 0,5  $\mu$ l (1:200) anti-Ly6G (Klon: 1A8, BD), 0,5  $\mu$ l (1:200) anti-Ly6C (Klon: HK1.4, Biolegend), 0,8  $\mu$ l (1:125) anti-Siglec F (Klon: E50-2440, BD) sowie 0,3  $\mu$ l (1:333) FVD (eBioscience) zugefügt und die Probe für 30 min bei 4 °C in Dunkelheit inkubiert. Durch Auffüllen mit Puffer (PBS + 0,5 % BSA) wurde die Probe gewaschen und bei 300  $\times$  g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands erfolgte die Resuspension in 0,5 ml 1 % Paraformaldehyd-Lösung (PFA) in PBS, um die Zellen bis zum Folgetag zu fixieren. Die Probe wurde mit Puffer aufgefüllt und zentrifugiert, der Überstand verworfen, in 200  $\mu$ l Puffer resuspendiert und gemessen.



**Abbildung 3: Exemplarische Differenzierung und Quantifizierung von Lungenzellpopulationen**

Durchflusszytometrische Charakterisierung von Leukozyten (CD45<sup>+</sup>), Endothelzellen (CD31<sup>+</sup>) und Epithelzellen (CD326<sup>+</sup>) einer murinen Einzelzell-Suspension. Zusätzlich zur Phänotypisierung wurden vorhandene Zellen durchflusszytometrisch gezählt (*CountBright™ Absolute Counting Beads*) und ihre Viabilität (FVD<sup>-</sup>) bestimmt. Exemplarisch sind Zellen von *S. pn*-infizierten Versuchstieren dargestellt. A: Fläche unter der Kurve, CD: Unterscheidungsgruppen, FSC: Vorwärtsstreuung, FVD: *Fixable Viability Dye* (Viabilitätsfarbstoff), H: Höhe des Impulses, R: Region, *S. pn*: *Streptococcus pneumoniae* Serotyp 2 Wildtyp, SSC: Seitwärtsstreuung. Teile der exemplarischen Differenzierung und Quantifizierung von Lungenzellpopulationen mittels Durchflusszytometrie der scheininfizierten Versuchgruppe (PBS Kontroll-Gruppe) wurden von Pennitz *et al.* publiziert [127].



### 6.2.3.2. Durchflusszytometrische Darstellung von Epithel- und Endothelzellen

Eine weitere Färbung wurde für die Charakterisierung der Epithel- und Endothelzellen durchgeführt (Abbildung 5). Hierbei wurde zu 100 µl Probe nach Blockierung unspezifischer Antikörperbindung mit 0,5 µl (1:200) anti-CD16/CD32 (Klon: 2.4G2, BD) ein Antikörper-Mix aus 0,25 µl (1:400) anti-CD45 (Klon: 30-F11, BD), 1,0 µl (1:100) anti-CD90.2 (Klon: 30-H12, Biolegend), 2,0 µl (1:50), anti-T1a/Pdpm (Klon: 8.1.1, Biolegend), 0,5 µl (1:200) anti-CD31 (Klon: MEC13.3, Biolegend), 1,0 µl (1:100) anti-CD326 (Klon: G8.8, Biolegend), 1,0 µl (1:100) anti-CD24 (Klon: M1/69, BD), 0,075 µl (1:1333) anti-MHCII (Klon: M5/114.15.2, eBioscience) und 0,3 µl (1:333) FVD (eBioscience) zugefügt und für 30 min bei 4 °C in Dunkelheit inkubiert. Die Probe wurde mit Puffer (PBS + 0,5 % BSA) aufgefüllt, bei 300 × g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das erhaltene Zellpellet wurde zur Fixierung bis zum nächsten Tag in 0,5 ml 1 % PFA Lösung resuspendiert, erneut durch Auffüllen mit Puffer und Zentrifugation bei 300 × g gewaschen. Danach wurde der Überstand verworfen, die Probe in 200 µl Puffer resuspendiert und gemessen.

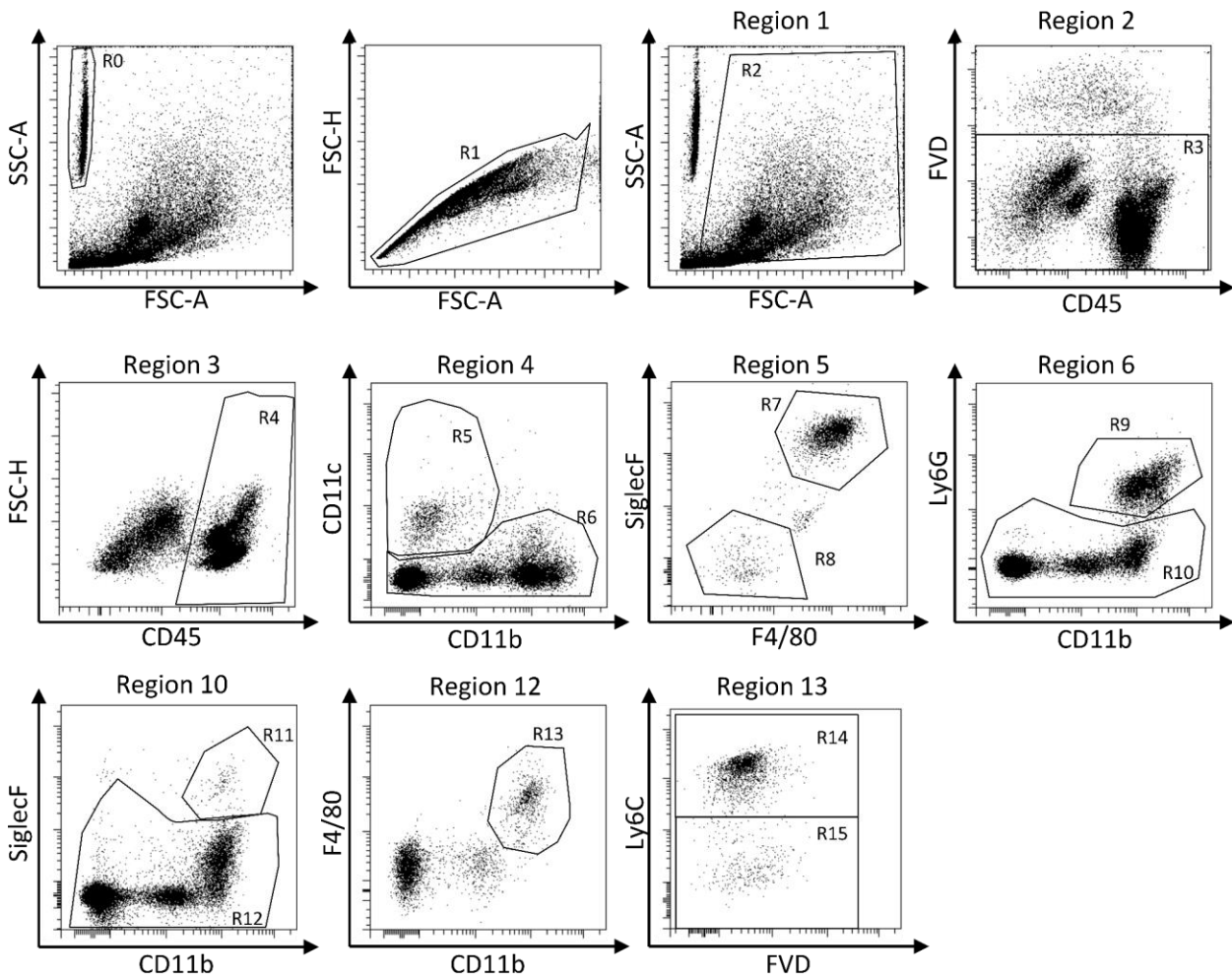
### 6.2.3.3. Zellzahlbestimmung

Die Quantifizierung der isolierten Lungenzellen erfolgte lichtmikroskopisch und durchflusszytometrisch [127]. Zur mikroskopischen Zellzahlbestimmung wurden 20 µl der Einzelzell-Suspension mit 180 µl Trypanblau-Lösung (Biochrom, 1:10 in PBS) verdünnt. 10 µl wurden auf eine Neubauerzählkammer (LO-Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf) pipettiert und auf vier Großquadraten ausgezählt. Unter Berücksichtigung der Probengröße und Verdünnung konnte daraus die Zellzahl mit nachfolgender Formel berechnet werden:

$$\text{Gesamt Zellzahl} = \frac{\text{gezählte Zellzahl}}{4} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10\,000 \times \text{Probenmenge in ml}$$

Für die durchflusszytometrische Quantifizierung wurden den Proben vor Messung 50 µl *CountBright™ Absolute Counting Beads* (Thermo Fisher Scientific) in 1:1 Verdünnung mit Puffer (PBS + 0,5 % BSA) zugesetzt. Durch die Anzahl an gemessenen *Beads* im Fenster R0 (Abbildung 3-5) konnte die absolute Zellzahl der Ausgangsprobe mittels folgender Formel berechnet werden:

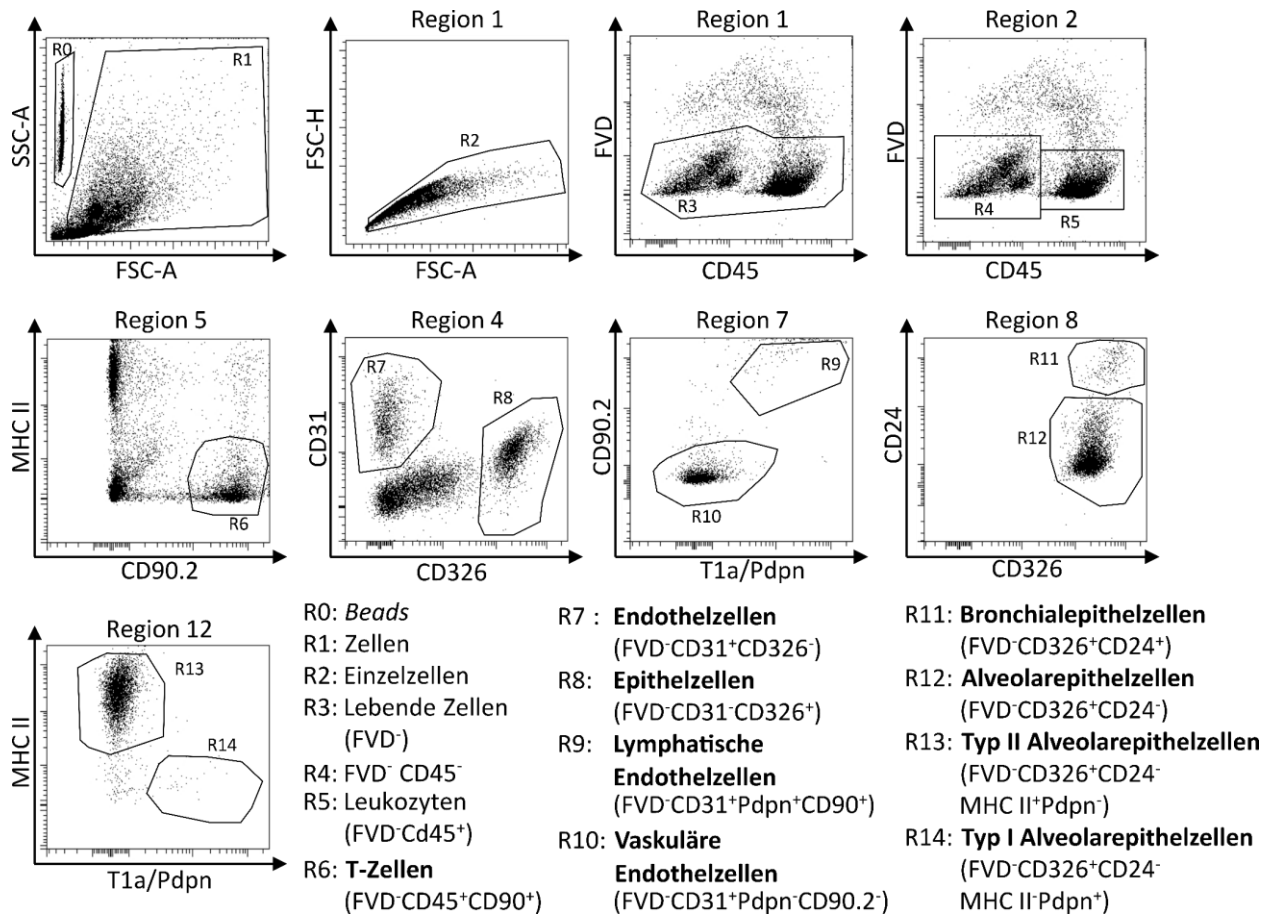
$$\text{Gesamt Zellzahl} = \text{Gemessene Zellen} \times \frac{\text{Zugesetzte Counting Beads}}{\text{Gemessene Counting Beads}} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$



- |   |  |   |
|---|--|---|
| R0: <i>Beads</i>  | R8: <b>Dendritische Zellen</b><br>(FVD <sup>-</sup> SiglecF <sup>-</sup> f4/80 <sup>+</sup> )  | R12: FVD <sup>-</sup> CD11c <sup>-</sup> Ly6G <sup>-</sup> SiglecF <sup>-</sup>   |
| R1: Einzelzellen  | R9: <b>Neutrophile Granulozyten</b><br>(FVD <sup>-</sup> Ly6G <sup>+</sup> CD11b <sup>hi</sup> )   | R13: <b>Inflammatorische Monozyten/<br/>Makrophagen</b><br>(FVD <sup>-</sup> CD11c <sup>-</sup> Ly6G <sup>-</sup> SiglecF <sup>-</sup><br>f4/80 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> ) |
| R2: Zellen ohne <i>Debris</i>   | R10: FVD <sup>-</sup> CD11c <sup>-</sup> Ly6G <sup>-</sup>   | R14: <b>iMM Ly6C<sup>hi</sup></b>   |
| R3: Lebende Zellen (FVD <sup>-</sup> )  | R11: <b>Eosinophile Granulozyten</b><br>(FVD <sup>-</sup> CD11c <sup>-</sup> Ly6G <sup>-</sup><br>SiglecF <sup>+</sup> CD11b <sup>hi</sup> ) | R15: <b>iMM Ly6C<sup>lo</sup></b>   |
| R4: Leukozyten<br>(FVD <sup>-</sup> CD45 <sup>+</sup> )                                       |  |   |
| R5: FVD <sup>-</sup> CD11c <sup>+</sup> Cd11b <sup>-</sup>                                    |  |   |
| R6: FVD <sup>-</sup> CD11c <sup>-</sup>   |  |   |
| R7: <b>Alveolarmakrophagen</b><br>(FVD <sup>-</sup> SiglecF <sup>+</sup> f4/80 <sup>+</sup> ) |  |   |

**Abbildung 4: Exemplarische Differenzierung und Quantifizierung isolierter Leukozyten mittels Durchflusszytometrie**

Charakterisierung von Leukozyten anhand von Oberflächenmarkern (CD11c, CD11b, F4/80, CD45, Ly6G, Ly6C, Siglec F), Zellen wurden phänotypisiert, durchflusszytometrisch gezählt (CountBright™ Absolute Counting Beads) und ihre Viabilität (FVD<sup>-</sup>) bestimmt. Exemplarisch sind Zellen von *S. pn*-infizierten Versuchstieren dargestellt. A: Fläche unter der Kurve, CD: Unterscheidungsgruppen, FSC: Vorwärtstreulicht, FVD: *Fixable Viability Dye* (Viabilitätsfarbstoff), H: Höhe des Impulses, iMM Ly6C<sup>hi</sup>: Inflammatorische Monozyten/ Makrophagen mit hoher Fluoreszenz des Oberflächenmarkers Ly6C, iMM Ly6C<sup>lo</sup>: Inflammatorische Monozyten/Makrophagen mit niedriger Fluoreszenz des Oberflächenmarkers Ly6C, R: Region, *S. pn*: *Streptococcus pneumoniae* Serotyp 2 Wildtyp, SSC: Seitwärtstreulicht.



**Abbildung 5: Exemplarische Differenzierung und Quantifizierung isolierter Epithel- sowie Endothelzellen mittels Durchflusszytometrie**

Charakterisierung von Epithel- und Endothelzellen anhand von Oberflächenmarkern (CD45, CD90.2, T1a/Pdpn, CD31, CD326, CD24, MHCII), Zellen wurden phänotypisiert, durchflusszytometrisch gezählt (CountBright™ Absolute Counting Beads) und ihre Viabilität (FVD<sup>-</sup>) bestimmt. Exemplarisch sind Zellen von *S. pn*-infizierten Versuchstieren dargestellt. A: Fläche unter der Kurve, CD: Unterscheidungsgruppen, FSC: Vorwärtsstreulicht, FVD: *Fixable Viability Dye* (Viabilitätsfarbstoff), H: Höhe des Impulses, R: Region, *S. pn*: *Streptococcus pneumoniae* Serotyp 2 Wildtyp, SSC: Seitwärtsstreulicht.

#### 6.2.4. Infektion mit *Streptococcus pneumoniae*

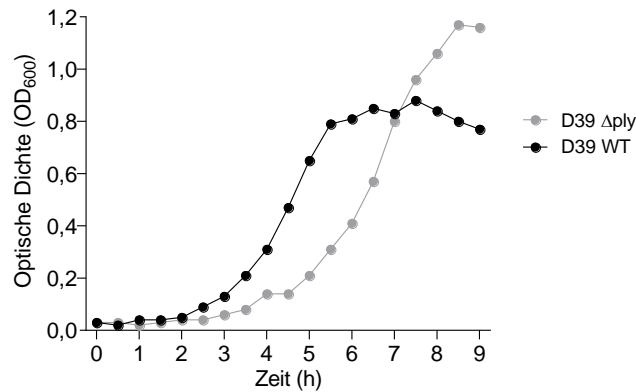
Die Infektion der Versuchstiere erfolgte mit *S. pn* des Stammes D39 (Serotyp 2) und der Pneumolysin-defizienten Mutante D39  $\Delta$ ply (*S. pn*  $\Delta$ ply). Am Vortag der Infektion erfolgte die Anzucht der Bakterien auf BD™ Columbia Agar mit 5 % Schafblut. Die Platten der Pneumolysin-defizienten D39  $\Delta$ ply Pneumokokken wurden vor Beimpfen mit Bakterien mit 50  $\mu$ l Erythromycin-Lösung (5  $\mu$ g/ml in H<sub>2</sub>O) benetzt. Nach neun Stunden Inkubation in einem Brutschrank (Heraeus Instruments) mit 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt bei 37 °C wurden 10 bis 15 gewachsene Einzelkolonien mit Hilfe eines sterilen Wattestäbchens in 20 ml eines Nährmediums (Todd Hewitt Bouillon mit 0,5 % Hefeextrakt, 10 % FCS) übertragen, bis

## Material und Methodik

eine optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge ( $OD_{600nm}$ ) von 0,03 – 0,04 erreicht wurde. Dem Nährmedium des Pneumolysin-defizienten Stammes wurden 100 ng Erythromycin zugesetzt.

Nachdem die Pneumokokken-Suspension über Nacht auf Eis gelagert wurde, erfolgte die Inkubation bei 37 °C im Wasserbad, bis die exponentielle Wachstumsphase bei einer  $OD_{600nm}$  von 0,3 – 0,4 erreicht wurde (Wachstumsverhalten von *S. pn* und *S. pn*  $\Delta$ ply; Abbildung 6). Anschließend wurde das Bakterienmedium bei 2000 × *g* für 10 min bei Raumtemperatur (RT) ohne Bremse zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 11 ml PBS resuspendiert. Es folgte die erneute Zentrifugation bei 2000 × *g* für 10 min bei RT ohne Bremse und die Bestimmung der  $OD_{600nm}$ . Nach Berechnung der Anzahl an koloniebildenden Einheiten (KBE), bei der eine  $OD_{600nm}$  von 1 der Konzentration  $1 \times 10^9$  entspricht, wurde die Pneumokokken-Suspension auf die gewünschte Infektionsdosis von  $5 \times 10^6$  KBE verdünnt. Zur Kontrolle wurden Agar-Platten (BD™ Columbia Agar mit 5 % Schafblut) in verschiedenen Verdünnungsstufen beimpft und nach Inkubation in einem Brutschrank (Heraeus Instruments) ausgezählt.

Vor der Infektion der Versuchstiere wurden die rektale Körpertemperatur und das Gewicht bestimmt und das Narkosegemisch wurde intraperitoneal injiziert. Der Eintritt einer tiefen Narkose wurde durch Ausbleiben des Zwischenzehenreflexes kontrolliert, erst dann erfolgte die intranasale Applikation der Infektionsdosis von  $5 \times 10^6$  KBE in 20  $\mu$ l PBS unter einer Steril-Bank (Kendro Laboratory Products). Nach Rückführung in die Käfige wurden die Versuchstiere zum Wärmeerhalt bis zum Erwachen mit einer Rotlichtlampe (Bosch + Sohn GmbH) beleuchtet. Bei der Kontrollgruppe wurde eine Scheininfektion mit 20  $\mu$ l PBS durchgeführt.



### Abbildung 6: Wachstumskurven *S. pn* und *S. pn* Δply

Exemplarische Darstellung des Wachstumsverhalten der Bakterienstämme *Streptococcus pneumoniae* D39 WT (Serotyp 2; *S. pn*) und der Pneumolysin-defizienten Mutante D39 Δply (*S. pn* Δply) in Flüssigkultur bei 37 °C.

#### 6.2.5. Klinische Verlaufskontrolle

Nach durchgeführter Infektion wurde der klinische Zustand der Versuchstiere zwei Mal täglich kontrolliert. Für Handlungsanweisungen beziehungsweise einen vorzeitigen Experimentabbruch stand folgende Tabelle zur Verfügung (Tabelle 2).

**Tabelle 2: Handlungsanweisung zur klinischen Beurteilung infizierter Tiere**

Tiernummer:		Datum/ Uhrzeit
Versuchsbeginn:		
Ausgangsgewicht:		
Tag seit Versuchsbeginn:		
Symptome	Kat.	
Keine Symptome		
Beobachtung in Ruhe im Käfig		
Tier isoliert sich	A	
Struppiges/ungepflegtes Fell	A	
Verhaltens-/und Haltungsauffälligkeiten	A	
Augen (krustige Belege, Augenausfluss)	B	
Atmung n/t/s *	/B/C	
Krämpfe, Torkeln, Apathie	C	
Schmerzen (gekrümmte Haltung oder Leib aufgezogen, Laufen auf Zehenspitzen, beim Anfassen)	C	
Beim Umsetzen		
Tier vermeidet Bewegung / Reaktionsminderung auf äußeren Reiz	A	
Fehlstellung der Zähne	A	
Äußere Veränderungen: Verletzungen Hautveränderungen (A)** / Abszesse, äußerlich sichtbare Infektionen, Ödeme, Automutilation (B)**	A / B	
Hautfalten bleiben stehen	B	
Leib hart und aufgetrieben	B	
Körpertemperatur-Bestimmung [°C]		
Hypothermie (Körperkerntemperatur < 35 °C)	B	
Körpermasse-Bestimmung [g]		
Körpermasseabnahme ab 10 %	A	
Körpermasseabnahme ab 20 %	B	
Körpermasseabnahme = 25 %	C	
Sonstiges:		
Unterschrift		

**Tötungskriterien:**

- A oder B** Tier weiter beobachten
- B** in Kombination mit Torkeln, Schmerzen oder Apathie:  
Tier unverzüglich schmerzlos töten
- C** Tier unverzüglich schmerzlos töten

\*: Atmung: n = normal; t = beschleunigt/flach (gilt als Kategorie B); s = schwerfällige/stark pumpe Atmung (gilt als Kategorie C)

\*\* : Kategorie und Beschreibung der Veränderung eintragen

### 6.2.6. Analyse der Genexpression

Zur Transkriptionsanalyse wurden in drei Teilschritten Genexpressionsbibliotheken der isolierten Lungenzellen nach Protokoll des Herstellers 10x Genomics erstellt<sup>d</sup>. An zwei Stellen des Protokolls wurden Anpassungen an den verwendeten *Thermocycler* (Bio-metra Trio 48, Jena Analytics) für die durchzuführenden Polymerase-Kettenreaktionen (engl.: *polymerase chain reaction*, PCR) vorgenommen (Unterpunkte 6.2.6.2. und 6.2.6.3., Tabelle 3). Die isolierten Einzelzell-Suspensionen wurden auf die empfohlene Ausgangskonzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen pro Milliliter Pufferlösung verdünnt. Unter Beachtung einer im Handbuch angegebenen Tabelle zu erwarteten Erfolgsraten und der Beratung des Herstellers wurden 8.000 Zellen je Probe als Ausgangsmenge gewählt mit dem Ziel 3.000 – 5.000 auswertbare Zell-Transkriptome zu erhalten<sup>d</sup>.

Bei der Durchführung des Protokolls wurden die Versuchsproben mehrfach in einem *PCR Tube Strip* (Eppendorf) mit magnetischen *Beads* inkubiert. Diese ermöglichten die Bindung von Nukleinsäuren. Das *PCR Tube Strip* wurde in einen Magnetständer des Herstellers (10x Genomics) eingebracht, wodurch sich die *Beads* mit ihrem gebundenen Material an der Wand des Reaktionsgefäßes sammelten und vom flüssigen Überstand trennten. Je nach Arbeitsschritt wurden die *Beads* mit ihrem gebundenen Material oder der Überstand weiterverwendet. Die Reaktionsgefäße konnten auf zwei Arten in den Magnetständer eingebracht werden - in einer höheren (*High Position*) und einer tieferen Position (*Low Position*).

#### 6.2.6.1. Individuelle Markierung von mRNA-Molekülen einzelner Zellen

Die individuelle Markierung der mRNA-Moleküle erfolgte im *Chromium Controller* des Herstellers 10x Genomics mit dem dazugehörigen *Chromium Next GEM Chip G* (10x Genomics). 8.000 Zellen je Versuchsprobe in 43,2 µl Suspension wurden 31,8 µl Enzym Mix (18,8 µl *RT Reagent B*, 2,4 µl *Template Switch Oligo*, 2 µl *Reducing Agent B* sowie 8,7 µl *RT Enzyme C*; alle 10x Genomics) zugefügt. Der Chip wurde wie folgt befüllt:

Zeile 1: 70 µl mit Enzymen versetzte Zellsuspension.

Zeile 2: 50 µl *Single Cell 3' v3.1 Gel Beads* (10x Genomics).

Zeile 3: 45 µl *Partitioning Oil* (10x Genomics).

---

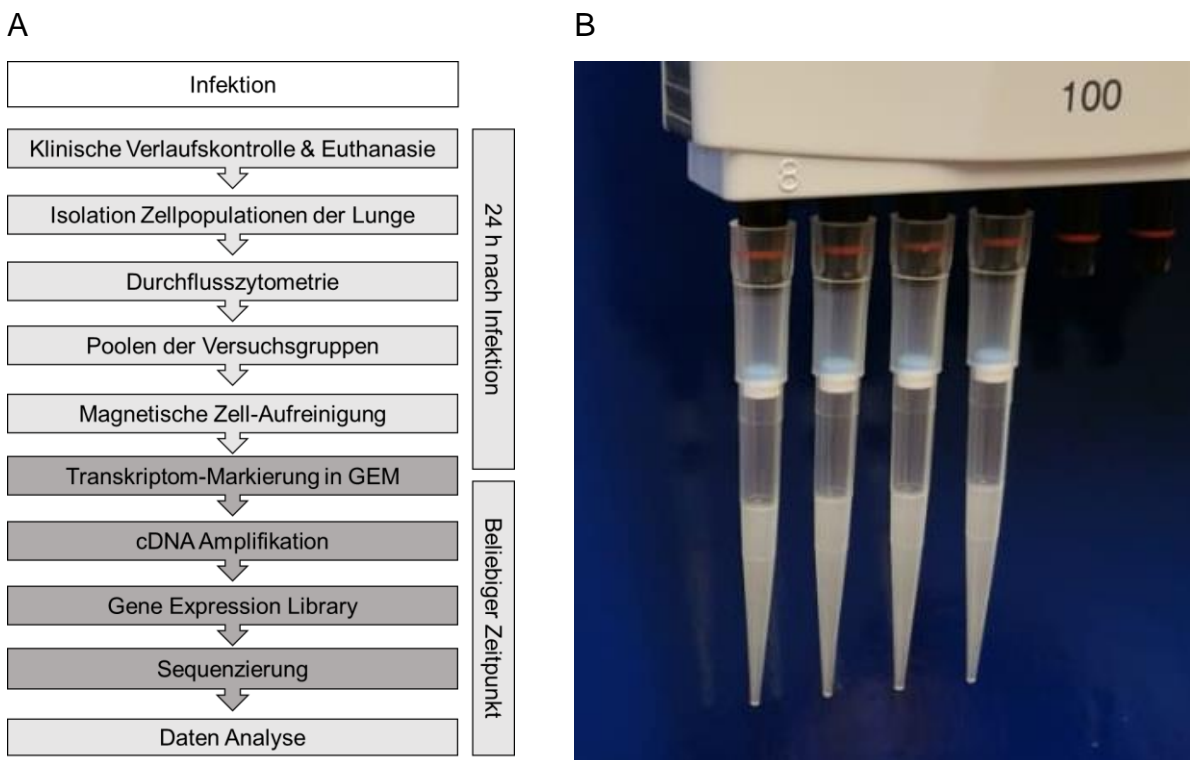
<sup>d</sup> Handbuch des Herstellers:

<https://assets.ctfas->

[sets.net/an68im79xiti/1eX2FPdpeCgnCJtw4fj9Hx/7cb84edaa9eca04b607f9193162994de/CG000204\\_ChromiumNextGEMSingleCell3\\_v3.1\\_Rev\\_D.pdf](https://assets.net/an68im79xiti/1eX2FPdpeCgnCJtw4fj9Hx/7cb84edaa9eca04b607f9193162994de/CG000204_ChromiumNextGEMSingleCell3_v3.1_Rev_D.pdf), letzter Zugriff: 31.10.2021, 16:56

## Material und Methodik

Nach Befüllung wurde der Chip mit einer speziellen Dichtung des Herstellers bedeckt, in den *Chromium Controller* gelegt und das Programm gestartet. In Zeile 3 des Chips wurden GEM gebildet, erkennbar als homogene, undurchsichtig gefärbte Flüssigkeit (Abbildung 7). 100 µl GEM wurden in einen *PCR Tube Strip* 0,2 ml (Eppendorf AG) pipettiert und in einem *Thermocycler* (*Mastercycler personal*, Eppendorf) für 45 min bei 53 °C, gefolgt von 5 min bei 85 °C inkubiert. Das *Gel Bead* wurde gelöst, die Zelle lysiert und der enthaltene *Primer* freigesetzt. Reverse Transkriptase-Reagenzien ermöglichten die Synthese individuell markierter cDNA in voller Länge. Es folgte die Lagerung bei 4 °C bis zum nächsten Tag.



### Abbildung 7: Versuchsaufbau der Genexpressionsanalyse isolierter Lungenzellen

**A:** Übersicht der Arbeitsschritte zur Erstellung und Sequenzierung von Einzelzell-Genexpressionsbibliotheken (*Genexpression Libraries*) aus isolierten Lungenzellen. **B:** Einzelzell Emulsions-tröpfchen (engl.: *Gel Beads in Emulsion*, GEM) zur individuellen Markierung des Zell-Transkriptoms.

#### 6.2.6.2. cDNA-Amplifikation

Im nächsten Schritt sollte die synthetisierte Erststrang-DNA durch magnetische *Silane Dynabeads* (10x Genomics) und einen speziellen Magnetständer des Herstellers separiert werden. Hierfür wurden die Proben erst mit 125 µl *Recovery Agent B* von überschüssigem Öl gereinigt und dann mit 200 µl *Dynabeads Cleanup Mix* (182 µl *Cleanup Buffer*,



5 µl *Reducing Agent B*, 5 µl Nuklease freiem Wasser und 8 µl magnetischen *Silane Dynabeads*) für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Es folgten zwei Reinigungsschritte mit 80 % Ethanol (Fisher Bioreagents *Absolute Ethanol 200 Proof* verdünnt mit Nuklease-freiem Wasser; Ambion) und Inkubation mit 35,5 µl *Elution Solution I* (98 µl *Buffer EB* Qiagen GmbH, 1 µl 10 % *Tween 20* Bio-Rad Laboratories, 1 µl *Reducing Agent B* 10x Genomics). Im Magnetständer des Herstellers wurden nun 35 µl des Überstands entnommen und mit 65 µl *cDNA Amplification Reaction Mix* (50 µl *Amp Mix* und 15 µl *cDNA Primer*; beides 10x Genomics) in einem *Thermocycler* (Biometra Trio 48, Jena Analytics, Tabelle 4) inkubiert.

Nach erfolgter Amplifikation erfolgte ein Selektionsschritt nach Basenpaarlänge durch Auftragen von 60 µl *Solid Phase Reversible Immobilization* Reagenz (*SPRIselect Reagent*, Beckman Coulter) und Verwurf des Überstands im Magnetständer gefolgt von zweimaligem Auftragen und Verwerfen von 80 % Ethanol. Es erfolgte die Inkubation mit 40,5 µl *Buffer EB* und Entnahme von 40 µl des klaren Überstands im Magnetständer. 1 µl wurde in 1:10-Verdünnung mit Nuklease-freiem Wasser zur Qualitätskontrolle im *Fragment Analyzer* (Advanced Analytical Technologies, Inc.) mit entsprechendem Kit (DNF-474 HS NGS 1-6000bp, Agilent) analysiert (Abbildung 19A). Der Rest wurde bei -20 °C bis zum Folgetag gelagert.

### 6.2.6.3. Erstellung von Genexpressionsbibliotheken

Zur Generierung fertiger Genexpressionsbibliotheken aus amplifizierter cDNA musste diese enzymatisch gespalten (fragmentiert) und anschließend nach Größe selektiert werden. Hierfür wurden 10 µl jeder Probe in mit 25 µl *Buffer EB* (Qiagen GmbH) und 15 µl *Fragmentation Mix* (5 µl *Fragmentation Buffer* und 10 µl *Fragmentation Enzyme*, beides 10x Genomics) in einem auf 4 °C gekühlten *Thermocycler* (Biometra Trio 48, Jena Analytics) für 5 min bei 32 °C, gefolgt von 30 min bei 65 °C inkubiert. Es folgte die Zugabe von 30 µl *SPRIselect Reagent* und Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur. Im Magnetständer wurden 75 µl des Überstands entnommen und weitere 10 µl *SPRIselect Reagent* aufgetragen. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 80 µl des Überstands im Magnetständer entnommen und verworfen. Das zurückbleibende *Beads-Pellet* wurde zweimal mit 125 µl 80 % Ethanol gereinigt, das Ethanol verworfen und 50,5 µl *Buffer EB* aufgetragen. Nach 2 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 50 µl des Überstands im Magnetständer entnommen und mit 50 µl *Adaptor Ligation Mix* (20 µl *Ligation Buffer*,

## Material und Methodik

10 µl DNA-Ligase und 20 µl *Adaptor Oligos*; alle 10x Genomics) für 15 min bei 20 °C in einem Thermocycler (Biometra Trio 48, Jena Analytics) inkubiert. Es folgte die Zugabe von 80 µl *SPR/select Reagent* und 5 min Inkubation bei Raumtemperatur. Im Magnetständer wurde der Überstand entfernt, das zurückbleibende *Beads-Pellet* zweimal mit 80 % Ethanol gereinigt und das Ethanol verworfen. Nach Zugabe von 30,5 µl *Buffer EB* und 2 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 30 µl des Überstands im Magnetständer entnommen.

Jeder Probe wurden 60 µl *Sample Index PCR Mix* (50 µl *Amp Mix* und 10 µl *SI Primer*; beides 10x Genomics) und 10 µl *Individual Chromium i7 Sample Index* aus einer *Chromium i7 Sample Index Plate* (10x Genomics) zugefügt. Die Platten-Koordinaten der entnommenen *Indices* sowie die Plattennummer wurden zur Rückverfolgung dokumentiert. Es folgte die Inkubation in einem Thermocycler (Biometra Trio 48, Jena Analytics). In Absprache mit dem technischen Support von Jena Analytics wurden Anpassungen an das Inkubationsprotokoll speziell für den Biometra Trio 48 Thermocycler vorgenommen (Tabelle 3).

Es folgten die Zugabe von 60 µl *SPR/select Reagent* und 5 min Inkubation bei Raumtemperatur. Im Magnetständer wurden 150 µl des Überstands entnommen und weitere 20 µl *SPR/select Reagent* aufgetragen. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 165 µl des Überstands im Magnetständer entnommen und verworfen. Das zurückbleibende *Beads-Pellet* wurde zweimal mit 80 % Ethanol gereinigt und das Ethanol verworfen. 35,5 µl *Buffer EB* wurden zugefügt und für 2 min inkubiert. Im Magnetständer konnten schließlich 35 µl des Überstands als finale Genexpressionsbibliotheken entnommen werden. 1 µl wurde in 1:10-Verdünnung mit Nuklease-freiem Wasser zur Qualitätskontrolle im *Fragment Analyzer* (Advanced Analytical Technologies, Inc.) mit entsprechendem Kit (DNF-474 HS NGS 1-6000bp, Agilent) analysiert (Abbildung 19B). Der Rest wurde bei -20 °C bis zur Sequenzierung gelagert.

### 6.2.7. Sequenzierung von Genexpressionsbibliotheken

Die finalen Genexpressionsbibliotheken wurden durch unsere Kooperationspartner des Deutschen Rheuma-Forschungszentrums Berlin am Charité Campus Mitte per Qubit Fluoreszenzspektroskopie (Thermo Fisher Scientific) quantifiziert und nach Illumina-Protokoll mittels eines NextSeq500 Sequenzierautomat (Illumina) sowie dem zugehörigen Illumina NextSeq 500/550 *High Output Kit v2.5* (150 Cycles) sequenziert. Hierfür wurden

folgende empfohlene Einstellungen gewählt: read1: 26 nt, read2: 98 nt, index1: 8 nt, index2: n.a.

**Tabelle 3: Anpassungen an den verwendeten Thermocycler: Jena Analytics Biometra TRIO 48**

cDNA-Amplifikation

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit
<b>1</b>	<b>99</b>	<b>00:00:04</b>
2	98	00:03:00
<b>3</b>	<b>99</b>	<b>00:00:04</b>
4	98	00:00:15
5	62	00:00:04
6	63	00:00:20
<b>7</b>	<b>73,5</b>	<b>00:00:04</b>
8	72	00:01:00
Wiederholung ab Schritt 2	-	#12x
9	72	00:01:00
10	4	∞

„Sample Index PCR“

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit
<b>1</b>	<b>99</b>	<b>00:00:04</b>
2	98	00:00:45
<b>3</b>	<b>99</b>	<b>00:00:04</b>
4	98	00:00:20
<b>5</b>	<b>53</b>	<b>00:00:04</b>
6	54	00:00:30
<b>7</b>	<b>73,5</b>	<b>00:00:04</b>
8	72	00:00:20
Wiederholung ab Schritt 2	-	#14x
9	72	00:01:00
10	4	∞

Die **fett** gedruckten Zeilen sind zusätzlich zum Protokoll des Herstellers eingefügte Schritte. Dies erfolgte in Rücksprache mit dem technischen Support von Jena Analytics. Sie sollten sicherstellen, dass die Amplifikation (Seite 34) und Index PCR (Seite 44) optimal in dem verwendeten Biometra TRIO 48 *Thermocycler* ablaufen<sup>e</sup>. cDNA: komplementäre DNA, PCR: Polymerase-Kettenreaktion.

## 6.2.8. Statistische Auswertung

### 6.2.8.1. Durchflusszytometrie-Daten

Die statistische Auswertung wurde in GraphPad Prism 9 (San Diego, California, USA) durchgeführt. Zur Bestimmung möglicher signifikanter Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden Zweiweg-Varianzanalysen (engl.: *analysis of variance*, ANOVA) durchgeführt und mit *post-hoc*-Tests nach Tukey bzw. Šidák ergänzt. Eine statistische Signifikanz wurde bei *P*-Werten unter 0,05 angenommen.

<sup>e</sup> Handbuch des Herstellers:

[https://assets.ctfas-](https://assets.ctfas-sets.net/an68im79xiti/1eX2FPdpeCgnCJtw4fj9Hx/7cb84edaa9eca04b607f9193162994de/CG000204_ChromiumNextGEMSingleCell3_v3.1_Rev_D.pdf)

[sets.net/an68im79xiti/1eX2FPdpeCgnCJtw4fj9Hx/7cb84edaa9eca04b607f9193162994de/CG000204\\_ChromiumNextGEMSingleCell3\\_v3.1\\_Rev\\_D.pdf](https://assets.ctfas-sets.net/an68im79xiti/1eX2FPdpeCgnCJtw4fj9Hx/7cb84edaa9eca04b607f9193162994de/CG000204_ChromiumNextGEMSingleCell3_v3.1_Rev_D.pdf), letzter Zugriff: 31.10.2021, 16:56

### 6.2.8.2. Auswertung der Sequenzierungsdaten

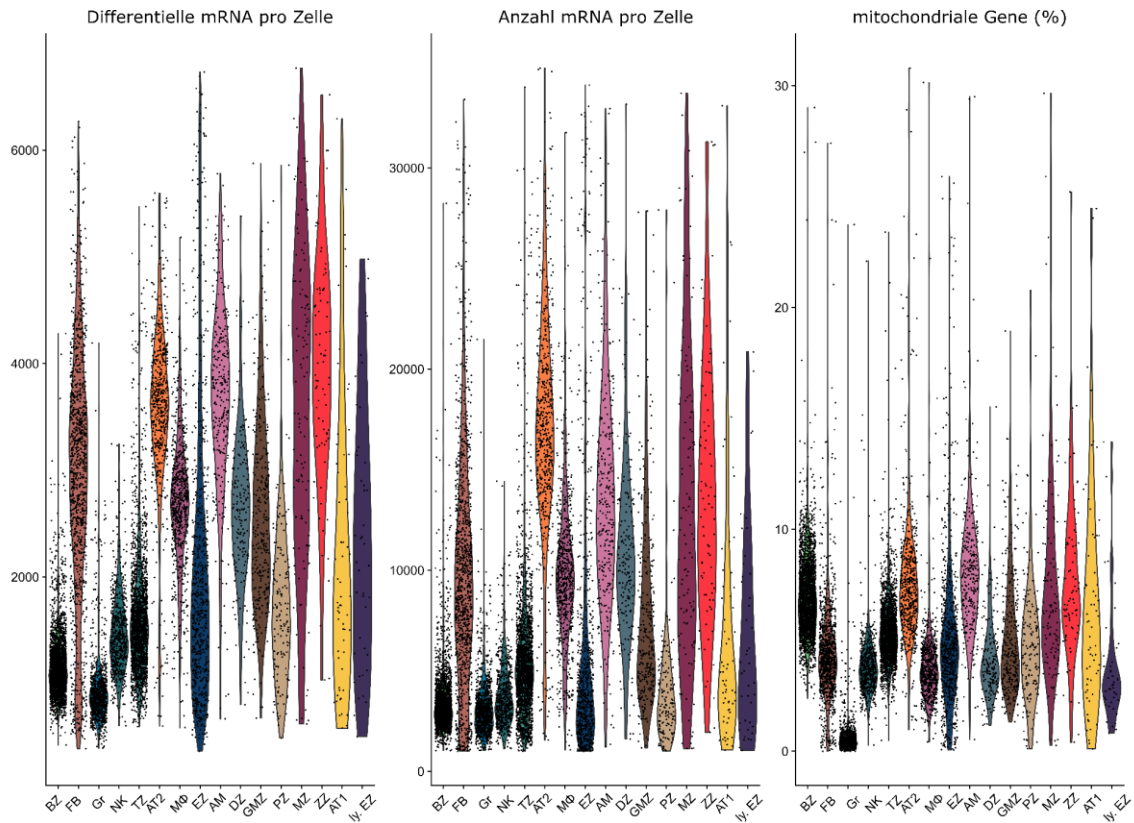
Die Auswertung der Sequenzierungsdaten erfolgte in enger Kooperation mit dem Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie (IMISE) der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig, insbesondere in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Holger Kirsten. Sequenzierte Genexpressionsbibliotheken wurden von unseren Kooperationspartnern des Deutschen Rheuma-Forschungszentrums Berlin (AG Mashreghi und AG Radbruch) am Charité Campus Mitte an das murine Referenz Genom mm10 aligniert und mittels *Cell Ranger* Software (10x Genomics) und der Funktionen *mkfastq* und *Cell Ranger Count* gezählt. Die Weiterverarbeitung des erhaltenen Datensatzes erfolgte mit R Version 4.0.3 mit den Erweiterungspaketen zur Analyse von Einzelzell-Sequenzierungsdaten von Bioconductor und Seurat Version 4.0.4 [130-132]. Die drei verschiedenen Datensätze der Versuchsgruppen wurden integriert und zur Qualitätssicherung wurden Zellen, deren Expressionsprofil mehr als 30 % mitochondriale RNA, unter 1.000 mRNA-Moleküle pro Zelle oder unter 300 verschieden exprimierte Genen aufwies, genauso wie Zellen mit über 35.000 Genen pro Zelle von der weiteren Analyse exkludiert (Abbildung 8A). Diese Qualitätskontrollen wurden nach Empfehlungen der Fachliteratur durchgeführt [133]. Der erhaltene Datensatz wurde nach Empfehlung des Seurat Pakets zur Analyse von Einzelzell-Sequenzierungsdaten im SCT Verfahren normalisiert und log<sub>2</sub> transformiert [134].

Das Expressionsprofil von 10.933 verbliebenen sequenzierten Zellen wurde durch Anwendung des Louvain-Algorithmus sowie des R-Pakets Harmony in *Cluster* eingeteilt und zur Visualisierung als *Uniform Manifold Approximation and Projection* (UMAP) dargestellt [135-137]. Dabei werden technische-bedingte Unterschiede, die z. B. durch das Ausführen der Analyse in verschiedenen Chargen entstehen; minimiert. Jedem Zellcluster wurde der wahrscheinlichste Zelltyp durch Analyse von *Cluster*-spezifisch differenziell exprimierten Genen sowie exprimierten „Genexpressions-Zellmarkern“ aus Datenbanken [138, 139] und Fachliteratur: *Marco* [140], *Adgre1* [141], *Flt3* [142, 143], *S100a9* [144], *Siglecf* [145], *Akap5* [143], *Lamp3* [143], *Sftpc* [140], *Foxj1* [143], *Cdh5* [146], *Mmrn1* [126], *Inmt* [126], *Acta2* [126], *Cox4i2* [147], *Msln* [126], *Ncr1* [148], *Cd3e* [149], *Cd79a* [122], zugeordnet. Hierfür wurde der *Loupe Cell Browser* (10x Genomics) und der BB Browser [150] zur schnellen graphischen Darstellung von Genen zur Hilfe genommen. Zur Darstellung von *Density Plots* wurden das R Paket *Nebulosa* Version 1.0.2 verwendet [151]. Nach finaler Festlegung von *Clustern* und deren Zuordnung zu Zellpopulationen

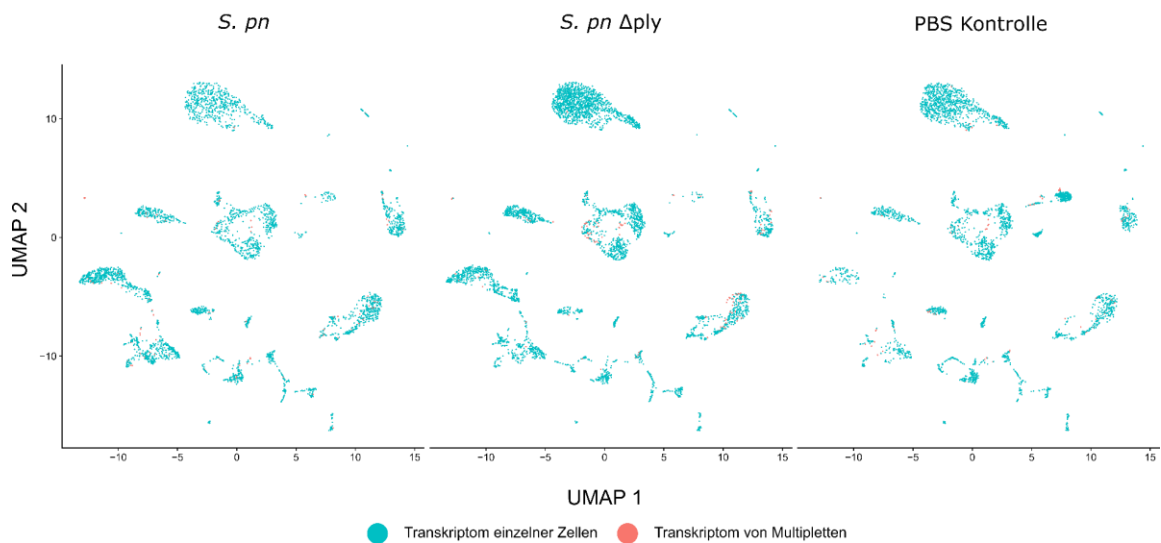
wurden jene Transkriptome, die durch mehrere Zellen im GEM Verfahren (Multipletten, Unterpunkt 4.3.1.) entstanden sind, mittels des R-Pakets DoubletFinder Version 2.0.3 bestimmt (Abbildung 8B) [152]. Bei der anschließenden Analyse zur unterschiedlichen Genexpression zwischen den Versuchsgruppen mittels Wilcoxon-Tests, die nach Zellpopulationen erfolgte, wurden Multipletten-Transkriptome nicht berücksichtigt. Aufgrund der vielfachen Hypothesentestung wurde das statistische Korrekturverfahren nach Bonferroni für multiple Testungen angewandt und nur Gene mit adjustiertem *P*-Wert von unter 0,05 als signifikant angenommen. Alle anderen Gene mit *P*-Werten von unter 0,05 wurden als nominal signifikant bezeichnet. Zur Bestimmung von Zell-Zell Interaktionen wurde das R-Paket „SingleCellSignalR“ Version 1.6.0 verwendet [153]. Die Abbildungen der Einzelzell-Sequenzierungsergebnisse wurden mit Funktionen der R-Pakete Seurat oder ggplot2 Version 3.3.5 erstellt und mit der Software Inkscape aligniert und einheitlich beschriftet [154]. Abbildungen der Zell-Zell Interaktionen wurden von Dr. rer. nat. Holger Kirsten (Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig) zur Verfügung gestellt und mit Inkscape nachbearbeitet, um einheitliche Abkürzungen der Zellpopulationen und Versuchsgruppen zu erhalten.

## Material und Methodik

A



B



### Abbildung 8: Angewandte Qualitätsfilter für Einzelzell-Sequenzierungsdaten

**A:** *Violin Plots* für die Anzahl verschiedener mRNA-Moleküle pro Zelle, die Gesamtanzahl an mRNA-Molekülen pro Zelle und die Prozentzahl an mitochondrialen Genen pro Zelle, dargestellt für jede Zellpopulation nach Anwendung von Qualitätsfiltern. **B:** *Feature Plots* je Versuchsgruppe nach der Bestimmung von Multipletten-Transkriptomen (in Rot dargestellt). AM: Alveolarmakrophagen, AT1: Typ I Alveolarepithelzellen, AT2: Typ II Alveolarepithelzellen, BZ: B-Zellen, DZ: Dendritische Zellen, EZ: vaskuläre Endothelzellen, FB: Fibroblasten, GMZ: Glatte-Muskelzellen, Gr: Granulozyten, ly. EZ: lymphatische Endothelzellen, MZ: *Msln*<sup>+</sup> Mesothelzellen, MΦ: interstitielle und inflammatorische Makrophagen, NK: natürliche Killerzellen, PZ: Perizyten, TZ: T-Zellen, ZZ: Zilien-tragende Zellen. Versuchsgruppen: Proben gepoolt: *S. pn*: Infektion mit Pneumokokken des Serotyps 2 (D39 WT, n = 3); *S. pn* Δply: Infektion mit Pneumolysin-defizienter Mutante (D39 Δply, n = 3), PBS Kontrolle: Scheininfektion mit Lösungsmittel (PBS, n = 2).

## 7. Ergebnisse

### 7.1. Etablierung des Einzelzell-Isolationsprotokolls aus murinem Lungengewebe

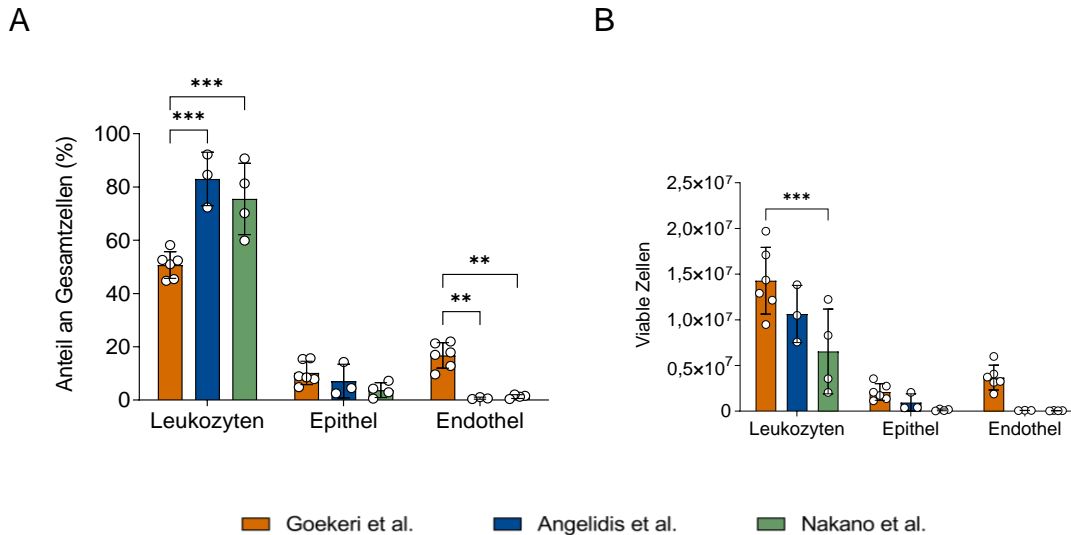
Zur Identifizierung eines geeigneten Einzelzell-Isolationsprotokolls wurden drei vorhandene Protokolle aus der Literatur über eng kooperierende Arbeitsgruppen sowie ein laborinternes etabliertes Isolationsprotokoll miteinander verglichen (Unterpunkte 6.2.2.1. bis 6.2.2.3.). Der finalen Auswahl eines Protokolls wurden folgende qualitative und technisch notwendige Kriterien zugrunde gelegt:

- 1.) Hohe Variabilität: In der Einzelzell-Suspension sollten Leukozyten, Endothelzellen und Epithelzellen zur Repräsentation der heterogenen Zellpopulationen der Lunge in ausreichendem Maße vorhanden sein. Dies ist Voraussetzung für die angestrebte Erstellung von inhaltlich hochwertigen Genexpressionsbibliotheken.
- 2.) Sehr gute Zellvereinzelung: Für eine erfolgreiche individuelle Markierung von mRNA-Molekülen einzelner Zellen wurde eine Singularität der Suspension von  $\geq 90\%$  als Voraussetzung definiert.
- 3.) Hohe Rate an lebenden Zellen: Zur Erstellung aussagekräftiger Genexpressionsbibliotheken wurde eine Viabilität der isolierten Lungenzellen von  $\geq 80\%$  angestrebt.

#### 7.1.1. Die anteilig beste Repräsentation von Leukozyten, Endothelzellen und Epithelzellen wurde mit dem Protokoll nach Goekeri *et al.* erzielt.

Isolierte Einzelzell-Suspensionen dreier Protokolle (Unterpunkte 6.2.2.1. bis 6.2.2.3.) wurden durchflusszytometrisch auf Präsenz von Leukozyten (CD45<sup>+</sup> Zellen), Endothelzellen (CD31<sup>+</sup>) und Epithelzellen (CD326<sup>+</sup>) untersucht (Abbildung 9). In der Einzelzell-Suspension des Protokolls nach Angelidis *et al.* wurde gemittelt mit ~83 % der höchste Anteil an Leukozyten gemessen, dieser war 1,6-fach so hoch wie bei Goekeri *et al.* und 1,1-fach so hoch wie bei Nakano *et al.* Die Zellsuspension nach der Goekeri *et al.*-Aufreinigung wies mit gemittelt ~17 % den höchsten Anteil an Endothelzellen auf, der Anteil der Endothelzellfraktion lag sowohl nach dem Angelidis *et al.*-Protokoll sowie dem Nagano *et al.*-Protokoll im Mittel unter 1,5 % (Abbildung 9A). Der Anteil der Epithelzellfraktion betrug gemittelt ~10 % (Goekeri *et al.*), ~7 % (Angelidis *et al.*) und ~4 % (Nakano *et al.*). Hierbei gab es zwischen den Protokollen jedoch keinen signifikanten Unterschied.

## Ergebnisse



### Abbildung 9: Anteil an Leukozyten, Epithelzellen und Endothelzellen in Einzelzell-Suspension und Gesamtzahl lebender Zellen

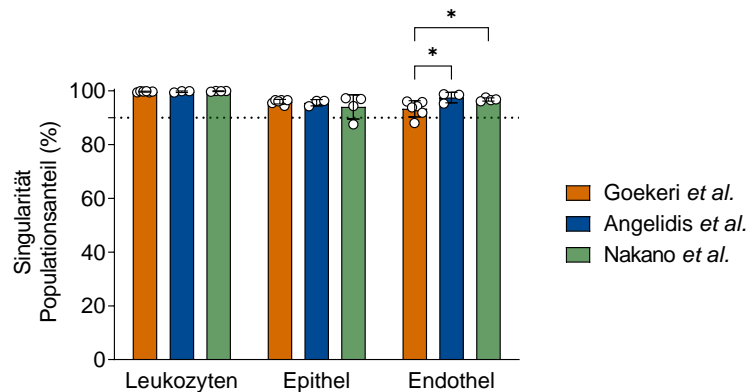
Zellen wurden nach drei Protokollarten (Goekeri *et al.*, Angelidis *et al.* und Nakano *et al.*) aus Lungen von naiven C57BL/6J Mäusen isoliert, in Trypanblau gezählt, phänotypisiert (CD45<sup>+</sup>: Leukozyten, CD326<sup>+</sup>: Epithelzellen, CD31<sup>+</sup>: Endothelzellen) und ihre Viabilität (FVD<sup>-</sup>) wurde bestimmt. **A:** Prozentualer Anteil der Leukozyten, Epithelzellen und Endothelzellen an der Gesamtzellzahl. **B:** Gesamtanzahl an lebend isolierten Zellen pro Lunge je Population. Mittelwert ± Standardabweichung (SD); n = 6 (Goekeri *et al.*), n = 3 (Angelidis *et al.*), n = 4 (Nakano *et al.*). Zweiweg-Varianzanalyse und *post-hoc* Test nach Tukey, (\*\*  $P < 0,01$  und \*\*\*  $P < 0,001$ ).

Die drei beschriebenen Protokolle ermöglichten die Isolation viabler Zellen aus murinem Lungengewebe. Die Quantität der dargestellten Zellpopulationen zeigte jedoch deutliche Unterschiede. Die höchste Anzahl lebender Zellen wurde für alle drei Populationen in der Einzelzell-Suspension des Protokolls nach Goekeri *et al.* gemessen, ein signifikanter Unterschied auf Zellpopulationsebene konnte in der Anzahl lebender Leukozyten zwischen dem Protokoll nach Goekeri *et al.* und Nakano *et al.* festgestellt werden (Abbildung 9B).

#### 7.1.2. Die drei Einzelzell-Isolationsprotokolle erzielten hohe Vereinzlungsraten.

Die Singularität der Zellsuspensionen wurde qualitativ visuell durch Zählen in der Neubauerkammer sowie quantitativ über durchflusszytometrische Dubletten-Messung bestimmt. Eine hohe Singularität stellt eine technische Voraussetzung zur Erstellung von Genexpressionsbibliotheken dar. Ohne vorherige Zellvereinzlung lässt die individuelle Markierung von mRNA-Molekülen in GEM keinen Rückschluss auf die Einzelzelle zu, sondern würde identisch für alle im GEM vorhandenen Zellen ablaufen. Befänden sich mehrere Zellen in einem GEM, würden die mRNA-Moleküle in der späteren Expressionsanalyse so erscheinen, als stammten sie aus derselben Zelle.





### Abbildung 10: Singularität von Leukozyten, Epithelzellen und Endothelzellen

Zellen wurden nach drei Protokollen (Goekeri *et al.*, Angelidis *et al.* und Nakano *et al.*) aus Lungen von naiven C57BL/6J Mäusen isoliert, in Trypanblau gezählt, phänotypisiert (CD45<sup>+</sup>: Leukozyten; CD326<sup>+</sup>: Epithelzellen; CD31<sup>+</sup>: Endothelzellen) und ihre Singularität bestimmt. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD); n = 6 (Goekeri *et al.*), n = 3 (Angelidis *et al.*), n = 4 (Nakano *et al.*). Zweiweg-Varianzanalyse und *post-hoc* Test nach Tukey (\*  $P < 0,05$ ). Die gepunktete Linie gibt die angestrebte Zellvereinzlungsrate von  $\geq 90\%$  an.

Alle drei Protokolle erreichten sehr hohe Zellvereinzlungsraten, die visuell in der Neubauerkammer festgestellt und quantitativ im Durchflusszytometer gemessen werden konnten. Für Leukozyten lag die Einzelzellrate bei allen drei Protokollen über 99 %, auch die Vereinzlungsraten der Epithelzellen und Endothelzellen mit über 90 % erfüllten für alle drei Protokolle die festgelegten Qualitätskriterien (Abbildung 10). In der Gruppe der Endothelzellen waren signifikante Unterschiede zwischen dem Protokoll nach Goekeri *et al.* 93,2 % verglichen mit 97,4 % bei Angelidis *et al.* und mit 96,7 % bei Nakano *et al.* feststellbar.

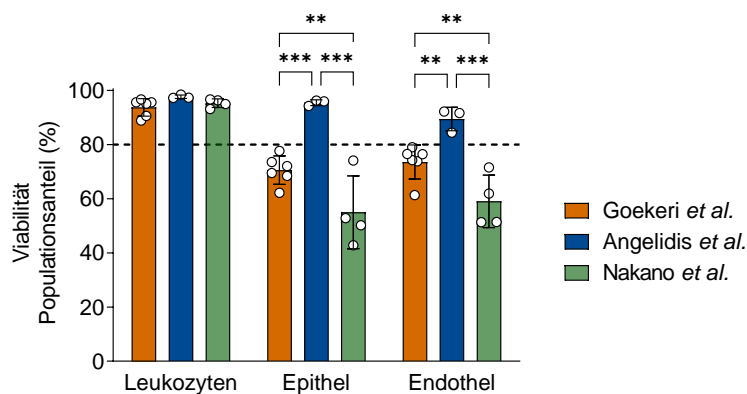
### 7.1.3. Das Protokoll nach Angelidis *et al.* ermöglichte die höchste prozentuale Viabilität innerhalb der gemessenen Zellpopulationen.

Das dritte Kriterium, nach welchem die drei Protokolle beurteilt wurden, war die Viabilität der isolierten Zellpopulationen. Die Viabilität wurde visuell mittels Trypanblau-Färbung in der Neubauerkammer erhoben und quantitativ durchflusszytometrisch mittels Viabilitätsfarbstoff, *Fixable Viability Dye* (FVD<sup>+</sup>) Färbung, gemessen. Trypanblau ist ein Farbstoff und wird von Zellen mit intakter Zellmembran nicht aufgenommen. Perforierte oder tote Zellen werden hingegen blau angefärbt und sind so mikroskopisch abgrenzbar [155]. FVD beinhaltet fluoreszierende Reaktivfarbstoffe, die mit Zellproteinen reagieren. Bei abgestorbenen Zellen können diese auch an intrazelluläre Bestandteile binden, wodurch die Fluoreszenzintensität laut Herstellerangaben um den Faktor 50 erhöht wird [156]. Im

## Ergebnisse

Durchflusszytometer lassen sich dadurch tote von lebenden Zellen unterscheiden. Eine hohe Viabilität ist für eine Genexpressionsanalyse unabdingbar, da isolierte mRNA-Moleküle eine umfassende Momentaufnahme der zellulären Aktivität darstellen. Bei toten Zellen ist durch den Abbau von Nukleinsäuren kein natürliches Expressionsmuster zu erwarten, außerdem kommt es durch Verlust der Zellstruktur zu einer scheinbaren Überexpression mitochondrialer Gene.

Visuell wurde nur ein geringer Prozentsatz an Trypanblau-gefärbten Zellen und somit toten Zellen festgestellt. Die quantitative Untersuchung mittels Durchflusszytometrie konnte den visuellen Eindruck bestätigen. Zunächst wurde der Anteil lebender Zellen innerhalb ihrer eigenen Zellpopulation bestimmt (Abbildung 11). Dies erlaubte die Beurteilung, wie stark der durch die Isolation ausgeübte Stress auf eine bestimmte Population in Abhängigkeit vom verwendeten Protokoll war.



### Abbildung 11: Viabilität von Leukozyten, Epithelzellen und Endothelzellen

Zellen wurden nach drei Protokollen (Goekeri *et al.*, Angelidis *et al.* und Nakano *et al.*) aus Lungen von naiven C57BL/6J Mäusen isoliert, in Trypanblau gezählt, phänotypisiert (CD45<sup>+</sup>: Leukozyten; CD326<sup>+</sup>: Epithelzellen; CD31<sup>+</sup>: Endothelzellen) und ihre Viabilität (FVD) wurde bestimmt. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD); n = 6 (Goekeri *et al.*), n = 3 (Angelidis *et al.*), n = 4 (Nakano *et al.*). Zweiweg-Varianzanalyse und *post-hoc* Test nach Tukey (\*\*  $P < 0,01$  und \*\*\*  $P < 0,001$ ). Die gestrichelte Linie gibt die angestrebte Viabilität von  $\geq 80\%$  an.

Für nicht-hämatopoetische Zellpopulationen (Epithel- und Endothelzellen) lieferte das Protokoll von Angelidis *et al.* den signifikant höchsten Anteil lebender Zellen. Innerhalb der Leukozytenpopulation lag die durchschnittliche Viabilität bei ~98 % (Angelidis *et al.*), ~94 % (Goekeri *et al.*) sowie ~95 % (Nakano *et al.*) und war somit bei allen drei Protokollen sehr gut. Große Unterschiede zwischen den Protokollen konnten vor allem bei Epithel- und Endothelzellen festgestellt werden. Hier erreichte nur die Einzelzell-Suspension

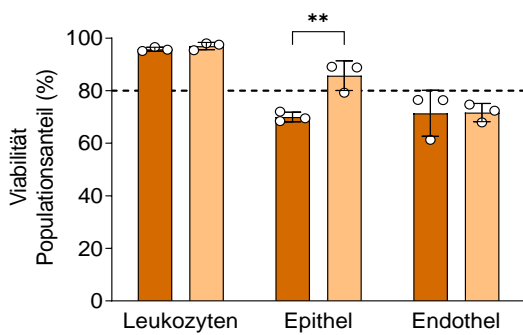
sion des Protokolls nach Angelidis *et al.* eine gemittelte Viabilität um 90 % (~95 % Epithelzellen; ~89 % Endothelzellen). Die Anteile lebender Zellen dieser Populationen waren um mehr als die Hälfte höher als die durchschnittlichen Raten des Protokolls nach Nakano *et al.* (~55 % Epithelzellen; ~59 % Endothelzellen). Das Protokoll nach Goekeri *et al.* erreichte im Mittel Viabilitätsraten von ~71 % innerhalb der Epithelzellfraktion und ~74 % innerhalb der Endothelzellfraktion.

#### **7.1.4. Magnetische Zell-Aufreinigung kann die Viabilität bei gleichbleibender Populationsverteilung erhöhen.**

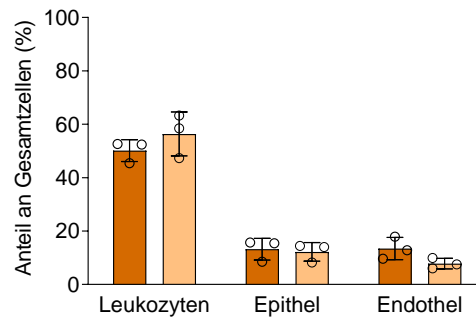
In den durchgeführten Versuchen konnten nur bei dem Protokoll nach Goekeri *et al.* Endothelzellen in größerem Umfang isoliert werden (Abbildung 9), allerdings lag der Anteil lebender Epithelzellen im Mittel um fast 20 % niedriger als beim Protokoll nach Angelidis *et al.* Um die Viabilität zu steigern, wurde eine magnetische Zell-Aufreinigung mittels *MACS Dead Cell Removal Kit* (Miltenyi Biotec GmbH, Unterpunkt 6.2.2.4.) durchgeführt. Dabei binden Membranbestandteile toter Zellen an speziellen *Micro Beads* und werden nach dem Prinzip der positiven Selektion beim Durchlaufen einer Magnetsäule zurückgehalten. Zur Validierung der Methode erfolgte vor und nach der Magnetsortierung eine durchflusszytometrische Messung. Dabei zeigte sich eine nahezu gleichbleibende Viabilität von Leukozyten und Endothelzellen, während der Mittelwert der Viabilität von Epithelzellen signifikant von ~70 % auf ~86 % (Abbildung 12A) gesteigert werden konnte, was eine entscheidende Erhöhung der verfügbaren Zellen zur Einzelzell-Sequenzierung darstellt. Bezüglich der gemittelten prozentualen Verteilung isolierter Lungenzellpopulationen zeigte sich eine leichte Erhöhung des Leukozytenanteils von 50,2 % auf 56,4 %, eine geringgradige Abnahme des Epithelzellanteils von 13,2 % auf 12,2 % sowie eine Abnahme des Endothelzellanteils von 13,4 % auf 7,8 % (Abbildung 12B).

## Ergebnisse

A



B



■ Goekeri et al.    ■ Goekeri et al. + MACS

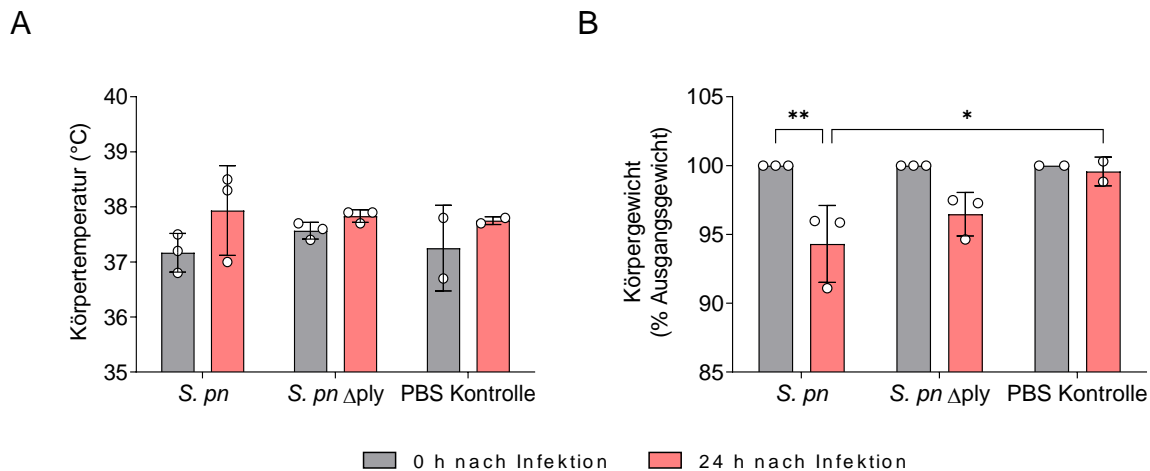
### Abbildung 12: Magnetische Zell-Aufreinigung

Isolierte Lungenzellen wurden durch eine magnetische Zellseparierung (MACS „*Dead Cell Removal*“) zur Viabilitätserhöhung aufgereinigt. Die Proben wurden vor und nach dieser in Trypanblau gezählt, phänotypisiert (CD45<sup>+</sup>: Leukozyten; CD326<sup>+</sup>: Epithelzellen; CD31<sup>+</sup>: Endothelzellen) und ihre Viabilität (FVD<sup>-</sup>) wurde durchflusszytometrisch und lichtmikroskopisch bestimmt. **A:** Viabilität von Leukozyten, Epithel- und Endothelzellen; **B:** Anteile von Leukozyten, Epithel- und Endothelzellen an der Gesamtzellzahl. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD); n = 3. Zweiweg-Varianzanalyse und *post-hoc* Test nach Šidák, (\*\*  $P < 0,01$ ). Die gestrichelte Linie gibt die angestrebte Viabilität von  $\geq 80\%$  an.

## 7.2. Lungenzell-Isolation aus infizierten Versuchstieren zur Einzelzell-Sequenzierung

### 7.2.1. Intranasale Infektion mit *Streptococcus pneumoniae*

Die Versuchstiere wurden mit *S. pn* des Stammes D39 (Serotyp 2) und der Pneumolysindefizienten Mutante D39  $\Delta$ ply infiziert. Eine Kontrollgruppe wurde mit Lösungsmittel (PBS) scheininfiziert. Vitalparameter wurden zum Infektionszeitpunkt und 24 Stunden nach der Infektion bestimmt. 24 Stunden nach der Infektion zeigte sich kein Temperaturverlust bei den Versuchstieren (Abbildung 13A). In bakteriell infizierten Versuchsgruppen zeigte sich eine Abnahme des Körpergewichts 24 Stunden nach der Infektion im Mittel auf 94,3 % bei *S. pn*-infizierten, auf 96,5 % bei *S. pn*  $\Delta$ ply-infizierten und auf 99,6% bei scheininfizierten Versuchstieren. Der Gewichtsverlust war nur im Falle einer *S. pn* Infektion statistisch signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 13B).



### Abbildung 13: Vitalparameter der Versuchstiere nach Infektion

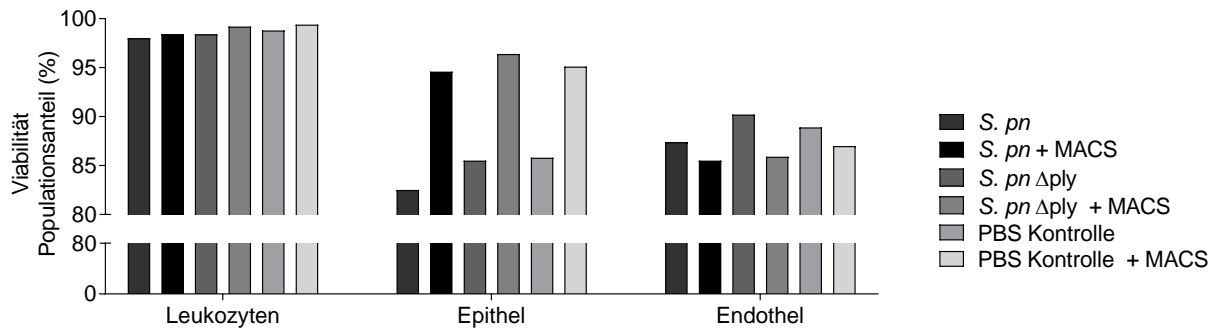
Versuchstiere wurden mit *S. pn* D39 WT, D39  $\Delta$ ply oder Lösungsmittel infiziert. Die Vitalparameter wurden vor und 24 Stunden nach erfolgter Infektion gemessen. Verlaufskontrolle der Körpertemperatur (**A**) und des Körpergewichts (**B**). *S. pn*: Infektion mit Pneumokokken des Serotyps 2 (D39 WT, n = 3); *S. pn*  $\Delta$ ply: Infektion mit Pneumolysin-defizienter Mutante (D39  $\Delta$ ply, n = 3), PBS Kontrolle: Scheininfektion mit Lösungsmittel (PBS, n = 2), Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD). Zweiweg-Varianzanalyse und *post-hoc* Tests nach Tukey, (\* p < 0,05, \*\* p < 0,01).

### 7.2.2. Magnetische Zell-Aufreinigung steigerte den Anteil lebender Epithelzellen.

Aus den Lungen von Versuchstieren wurden residente Zellpopulationen nach dem Protokoll von Goekeri *et al.* für Sc-RNA-Seq isoliert. Die erhaltenen Einzelzell-Suspensionen wurden zur Minimierung biologischer Variabilität versuchsgruppenintern gepoolt und zur Qualitätssteigerung mittels MACS *Dead Cell Removal Kit* (Miltenyi Biotec GmbH, Unterpunkt 6.2.2.4.) einer magnetischen Zell-Aufreinigung unterzogen.

Sowohl die gepoolten Ausgangsproben als auch Zellen nach durchgeführtem MACS *Dead Cell Removal* wurden durchflusszytometrisch gezählt (CountBright™ *Absolute Counting Beads*), phänotypisiert und ihre Viabilität bestimmt. Der Anteil an lebenden Epithelzellen konnte im Mittel um ca. 10 – 12 % gesteigert werden. Bei Leukozyten war eine sehr geringe Steigerung des Anteils lebender Zellen messbar, während dieser bei Endothelzellen leicht sank (Abbildung 14).

## Ergebnisse

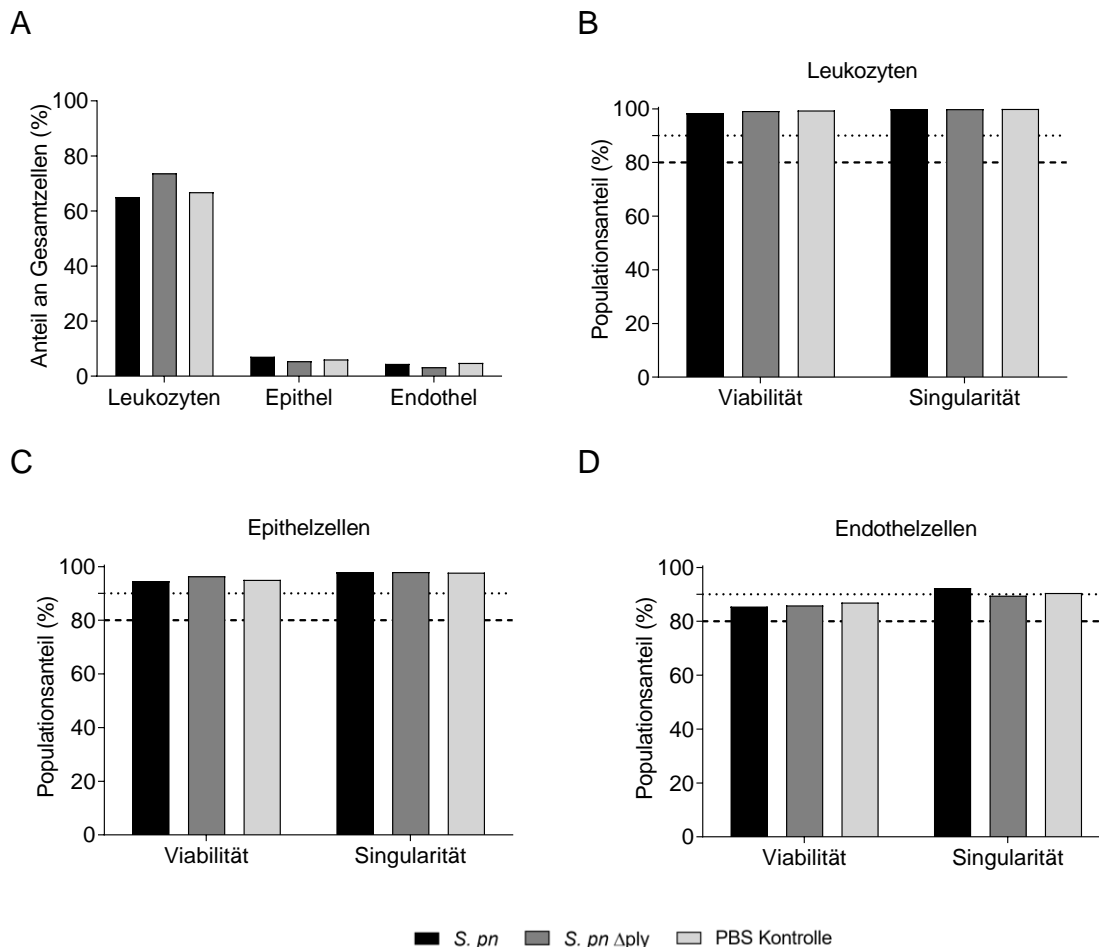


### Abbildung 14: Viabilität isolierter Lungen-Zellen vor und nach MACS *Dead Cell Removal*

Gepoolte Einzelzell-Suspensionen der Versuchsgruppen wurden vor und nach magnetischer Zell-Aufreinigung (MACS, „*Dead Cell Removal*“) durchflusszytometrisch gezählt, phänotypisiert und ihre Viabilität bestimmt. Versuchsgruppen: Proben gepoolt: *S. pn*: Infektion mit Pneumokokken des Serotyps 2 (D39 WT, n = 3); *S. pn Δply*: Infektion mit Pneumolysin-defizienter Mutante (D39 Δply, n = 3), PBS Kontrolle: Scheininfection mit Lösungsmittel (PBS, n = 2).

### 7.2.3. Angestrebte Qualitätskriterien für Einzelzell-Suspensionen konnten erreicht werden.

Zur Qualitätskontrolle wurden die gepoolten Proben der Versuchsgruppen durchflusszytometrisch auf Verteilung der Zellpopulationen sowie deren Viabilität und Singularität überprüft. Für die Versuchsproben zur Einzelzell-Sequenzierung wurde wie bei den Etablierungsexperimenten des Protokolls eine Viabilität von mindestens 80 % bei möglichst hoher Singularität der Zellen in Suspension angestrebt, um eine ordnungsgemäße Bildung von GEM, notwendig für die Erstellung von Genexpressionsbibliotheken, zu ermöglichen (Abbildung 15). In allen Versuchsgruppen stellten Leukozyten mit über 60 % den größten Anteil isolierter Zellen dar (Abbildung 15A), sowohl Viabilität als auch die Singularität mit über 98 % und 99 % überstiegen die vorher festgesetzten Qualitätskriterien (Abbildung 15B). Epithelzellen stellten mit 5 bis 7 % geringere Anteile der Gesamtzahlen als in den Etablierungsversuchen dar und erreichten die festgesetzten Qualitätsstandards (über 94 % lebende und über 97 % vereinzelte Zellen, Abbildung 15C). Die Fraktion der Endothelzellen fiel mit 3 bis 5 % deutlich geringer aus als in der Etablierung. Allerdings konnte die Viabilität von durchschnittlich 74 % auf über 85 % in allen Versuchsgruppen gesteigert werden. Die Singularität lag in allen Proben über 89 % (Abbildung 15D).



**Abbildung 15: Qualitätskontrolle der Einzelzell-Suspensionen zur Genexpressionsanalyse**  
 Einzelzell-Suspensionen wurden nach durchgeführter magnetischer Zell-Aufreinigung durchflusszytometrisch gezählt (CountBright™ Absolute Counting Beads), phänotypisiert (CD45<sup>+</sup>: Leukozyten, CD326<sup>+</sup>: Epithelzellen, CD31<sup>+</sup>: Endothelzellen) und ihre Viabilität (FVD<sup>-</sup>) bestimmt. **A:** Prozentuale Verteilung von Leukozyten, Epithel- und Endothelzellen. **B-D:** Viabilität und Singularität von Leukozyten (**B**), Epithelzellen (**C**) und Endothelzellen (**D**). Versuchsgruppen: Proben gepoolt: *S. pn*: Infektion mit Pneumokokken des Serotyps 2 (D39 WT, n = 3); *S. pn* Δply: Infektion mit Pneumolysin-defizienter Mutante (D39 Δply, n = 3); PBS Kontrolle: Scheininfection mit Lösungsmittel (PBS, n = 2). Die gestrichelte Linie gibt die angestrebte Viabilität von ≥ 80% an, die gepunktete Linie die angestrebte Zellvereinzelnungsrate von ≥ 90%.

#### 7.2.4. Heterogene Zellpopulationen der Lunge konnten durchflusszytometrisch nachgewiesen werden.

Zur Beurteilung der Diversität isolierter Lungenzellen wurden erhaltene Einzelzell-Suspensionen durchflusszytometrisch analysiert. Exemplarisch wurden folgende Zellpopulationen phänotypisiert und auf Viabilität und Singularität überprüft (Unterpunkte 6.2.3.2. und 6.2.3.3.): Alveolarmakrophagen (AM), Dendritische Zellen (DZ), polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN), eosinophile Granulozyten (EG), inflammatorische Makrophagen und Monozyten (iMM), T-Zellen (TZ), bronchiale Epithelzellen (BEZ), Typ I und

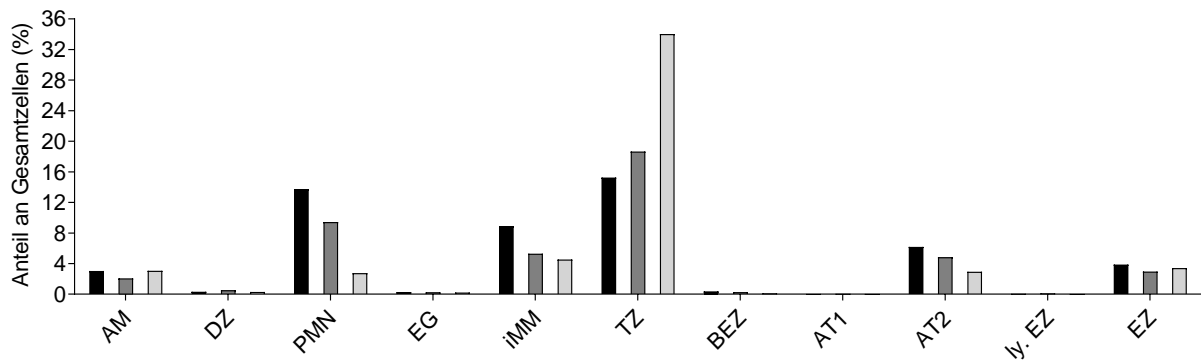
## Ergebnisse

Typ II Alveolarepithelzellen (AT1, AT2), lymphatische Endothelzellen (ly. EZ) sowie vasculäre Endothelzellen (EZ).

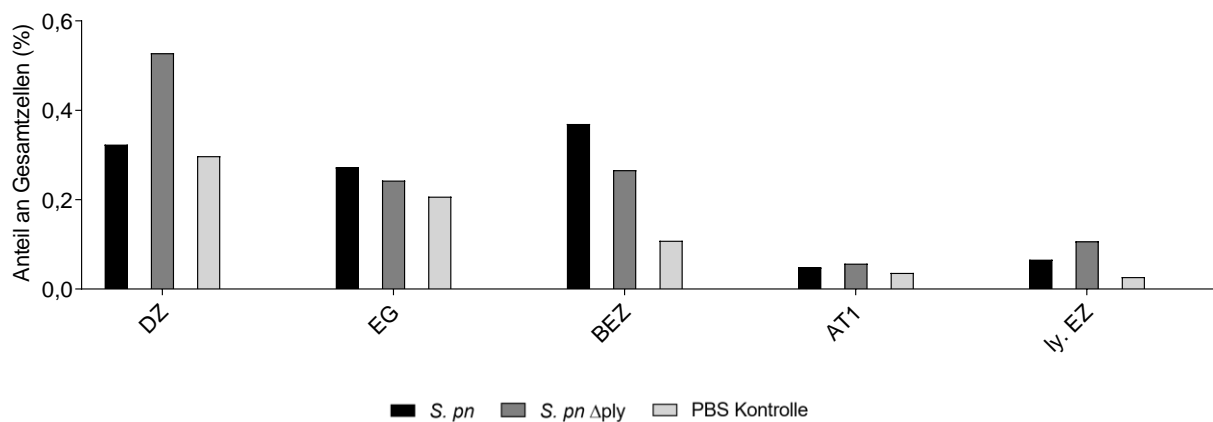
Einen großen Anteil aller isolierten Zellen bildeten Leukozyten. In der Einzelzell-Suspension der scheininfizierten Versuchsgruppe stellten TZ mit ~34 % an Gesamtzellen die bei weitem größte Population dar. PMN (~14 % bei *S. pn* Infektion; ~9 % bei *S. pn*  $\Delta$ ply) und iMM (~9 % bei *S. pn* Infektion; ~5 % bei *S. pn*  $\Delta$ ply) wurden hingegen vermehrt in den infizierten Versuchsgruppen gemessen (Abbildung 16A). EG, BEZ, AT1 und ly. EZ konnten nur in geringem Umfang, unter 1 % der Gesamtzahlen, isoliert werden (Abbildung 16A, B). EG (23 – 32 %), AT1 (78 – 86 %) und ly. EZ (71 – 82 %) erreichten den angestrebten Wert von 80 % Viabilität nicht (Abbildung 17 und 18). Alle diese Zellgruppen konnten nur in sehr geringem Umfang isoliert werden. Bei der Singularität wiesen DZ (89 – 92 %), PMN (67 – 81 %), EG (86 – 90 %), iMM (87 – 90 %), BEZ (87 – 88 %), AT1 (78 – 100 %) und ly. EZ (75 – 92 %) teilweise geringere Vereinzlungsraten auf (Abbildung 17 und 18). Alle weiteren exemplarisch bestimmten Populationen erfüllten die definierten Qualitätsstandards (Abbildung 17 und 18).



A



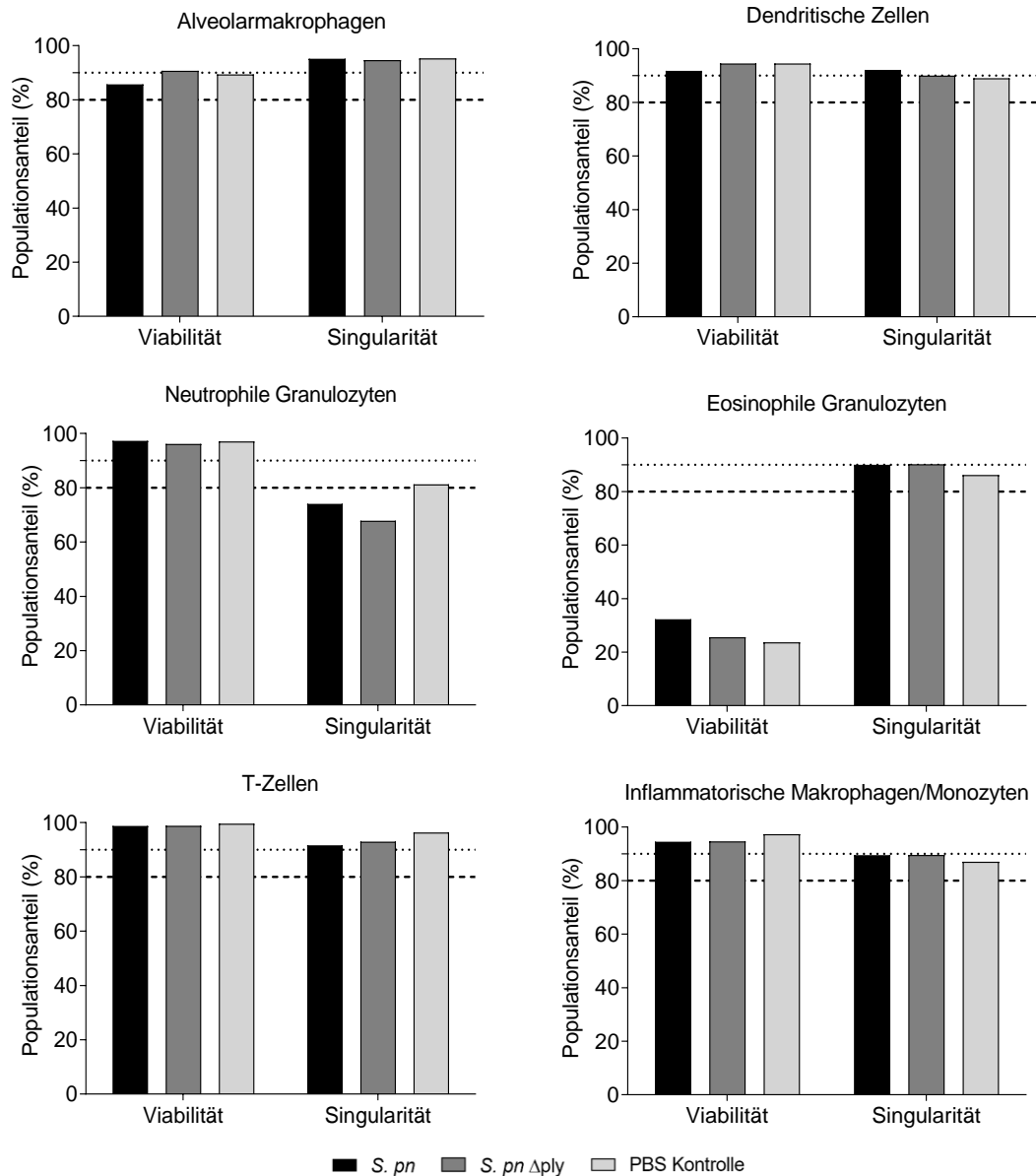
B



### Abbildung 16: Isolierte Zellpopulationen in den Einzelzell-Suspensionen

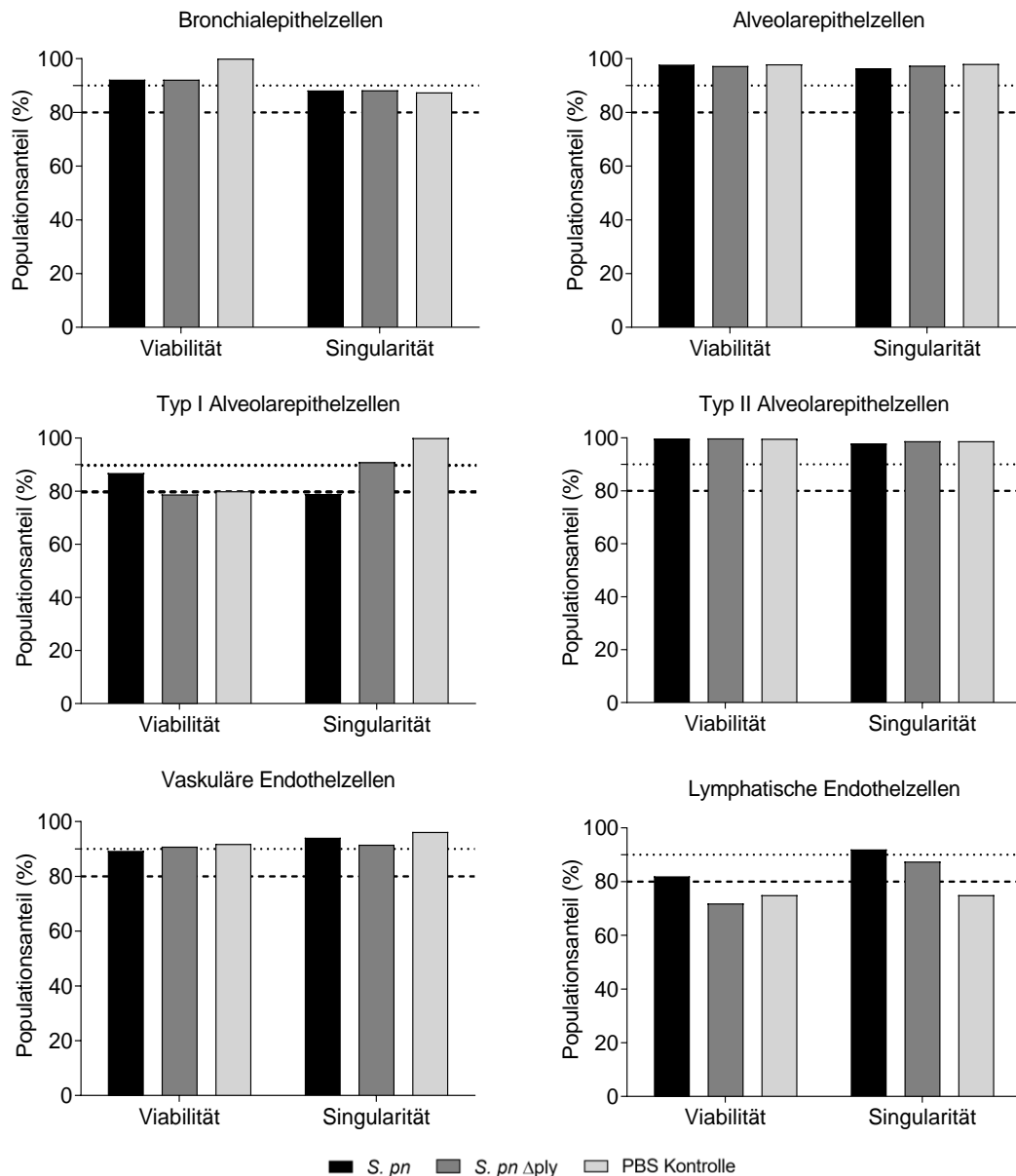
Isolierte Lungenzell-Suspensionen zur Einzelzell-Sequenzierung wurden durchflusszytometrisch gezählt (CountBright™ *Absolute Counting Beads*), phänotypisiert und ihre Viabilität (FVD<sup>-</sup>) bestimmt. **A:** Prozentuale Verteilung phänotypisierter Zellpopulationen. **B:** Darstellung der Zellpopulationen mit geringen Anteilen mit angepasster Achsenskalierung. Versuchsgruppen: Proben gepoolt: *S. pn*: Infektion mit Pneumokokken des Serotyps 2 (D39 WT, n = 3); *S. pn Δply*: Infektion mit Pneumolysin-defizienter Mutante (D39 Δply, n = 3); PBS Kontrolle: Scheininfektion mit Lösungsmittel (PBS, n = 2). AM: Alveolarmakrophagen, AT1: Typ I Alveolarepithelzellen, AT2: Typ II Alveolarepithelzellen, BEZ: Bronchialepithelzellen, DZ: Dendritische Zellen, EG: eosinophile Granulozyten, IMM: inflammatorische Makrophagen und Monozyten, ly. EZ: lymphatische Endothelzellen, PMN: polymorphkernige neutrophile Granulozyten, TZ: T-Zellen, EZ: vaskuläre Endothelzellen.

## Ergebnisse



### Abbildung 17: Viabilität und Singularität isolierter hämatopoetischer Zellpopulationen

Isolierte Lungenzell-Suspensionen zur Einzelzell-Sequenzierung wurden durchflusszytometrisch gezählt (CountBright™ Absolute Counting Beads), phänotypisiert und ihre Viabilität (FVD-) bestimmt. Dargestellt sind Leukozyten Subpopulationen mit angegebener Viabilität und Singularität. Versuchsgruppen: Proben gepoolt: *S. pn*: Infektion mit Pneumokokken des Serotyps 2 (D39 WT, n = 3); *S. pn Δply*: Infektion mit Pneumolysin-defizienter Mutante (D39 Δply, n = 3); PBS Kontrolle: Scheininfection mit Lösungsmittel (PBS, n = 2). Die gestrichelte Linie gibt die angestrebte Viabilität von ≥ 80% an, die gepunktete Linie die angestrebte Zellvereinzelnungsrate von ≥ 90%.



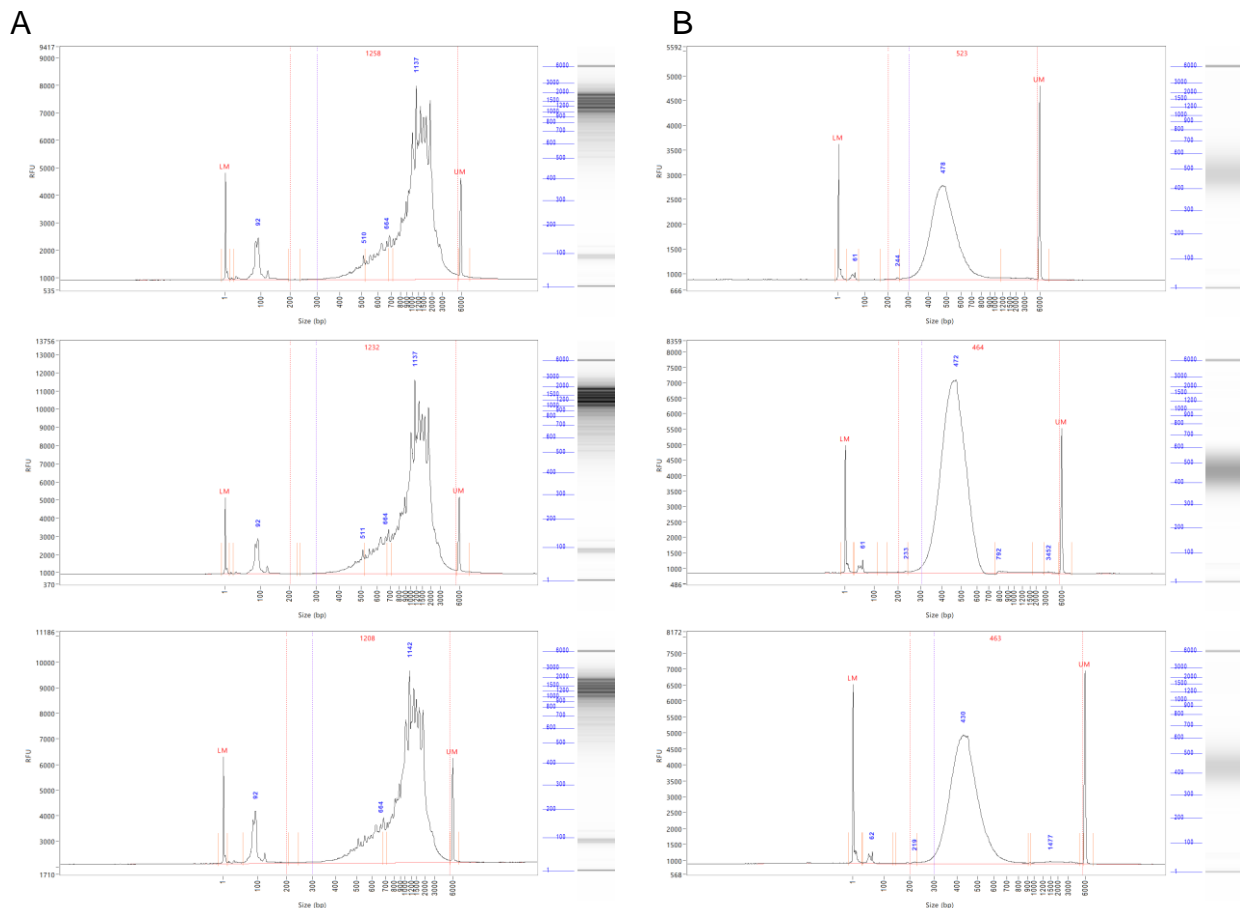
**Abbildung 18: Viabilität und Singularität isolierter nicht-hämatopoetischer Zellpopulationen**

Isolierte Lungenzell-Suspensionen zur Einzelzell-Sequenzierung wurden durchflusszytometrisch gezählt (CountBright™ *Absolute Counting Beads*), phänotypisiert und ihre Viabilität (FVD<sup>-</sup>) bestimmt. Dargestellt sind isolierte Subpopulationen der Epithel- und Endothelzellen. Versuchsgruppen: Proben gepoolt: *S. pn*: Infektion mit Pneumokokken des Serotyps 2 (D39 WT, n = 3); *S. pn Δply*: Infektion mit Pneumolysin-defizienter Mutante (D39 Δply, n = 3); PBS Kontrolle: Scheininfektion mit Lösungsmittel (PBS, n = 2). Die gestrichelte Linie gibt die angestrebte Viabilität von ≥ 80% an, die gepunktete Linie die angestrebte Zellvereinzelnungsrate von ≥ 90%.

### 7.3. Erstellung und Sequenzierung von Einzelzell-Genexpressionsbibliotheken

#### 7.3.1. Die Genexpressionsbibliotheken aller Versuchsgruppen erfüllten die erforderlichen Qualitätsstandards.

Die mRNA-Moleküle einzelner isolierter Lungenzellen wurden in GEM individuell markiert und durch reverse Transkription zu cDNA umgeschrieben. Um Analysen der Zelltranskripte durchführen zu können, mussten Genexpressionsbibliotheken generiert und sequenziert werden. Dabei wurde erst die erhaltene cDNA amplifiziert und zur Kontrolle mittels Fragment-Analyzer gemessen. Die kapillarelektrophoretischen Messungen zeigten erwartungsgemäß ein Muster unterschiedlicher Fragmentlängen (Abbildung 19A). Um finale Genexpressionsbibliotheken zu erhalten, wurden die amplifizierten cDNA-Moleküle fragmentiert, wobei größtenteils Fragmente mit einer Länge von 300 – 400 Basenpaaren entstanden. Diese wurden an einen *Illumina-Read-2-Adaptor* ligiert, welcher essenziell für die spätere Sequenzierung war, anschließend erneut amplifiziert und nach Fragmentgröße selektiert. Dabei wurden erst Fragmente mit einer Länge von über 600 Basenpaaren verworfen und anschließend nur solche mit einer Länge von über 200 Basenpaaren eluiert. Die finalen Genexpressionsbibliotheken wurden erneut mittels Fragment-Analyzer gemessen und zeigten ein homogenes Fragmentmuster mit einem *Peak* (englisch für Spitze bzw. Scheitelwert) um 430 – 480 Basenpaare (Abbildung 19B). Laut Hersteller Empfehlungen sollten finale Genexpressionsbibliotheken Fragmente zwischen 300 – 1000 Basenpaare Länge mit einem *Peak* zwischen 400 – 600 Basenpaaren aufweisen [157]. Da die erhaltenen Genexpressionsbibliotheken alle Vorgaben der Qualitätskontrollen erfüllten, konnte anschließend die Sequenzierung durchgeführt werden. Die vom Hersteller empfohlene Sequenzierungstiefe von mindestens 20.000 *Reads* pro Zelle wurde für alle Versuchsproben eingehalten [158]. Die sequenzierten Versuchsgruppen enthielten zwischen ~3.300 und ~4.600 Zellen mit einer Sequenzierungs-Sättigung von 62,7 % bis 75,3 % (Tabelle 4).



**Abbildung 19: Fragmentgröße amplifizierter cDNA und Genexpressionsbibliotheken**

Qualitätskontrollen der Versuchsgruppen zur Erstellung von Genexpressionsbibliotheken. Messung per *Fragment Analyzer* (Advanced Analytical Technologies, Inc.) und entsprechendem Kit (DNF-474 HS NGS 1-6000bp, Agilent). **A:** Messung nach erfolgreicher Amplifikation komplementärer DNA (cDNA); **B:** Erneute Messung der finalen Genexpressionsbibliotheken. Versuchsgruppen: Proben gepoolt: Obere Zeile, Infektion mit Pneumokokken des Serotyps 2 (D39 WT, n = 3); Mittlere Zeile, Infektion mit Pneumolysin-defizienter Mutante (D39  $\Delta$ ply, n = 3); Untere Zeile, Scheininfektion mit Lösungsmittel (PBS, n = 2). LM: *Lower Marker*, RFU: *Relative Fluorescence Units*, UM: *Upper Marker*.

**Tabelle 4: Sequenzierungsdaten**

Versuchsprobe	Erhaltene Zellen	Reads pro Zelle	Seq Sättigung
<i>S. pn</i>	3.547	32.781	62,7 %
<i>S. pn</i> $\Delta$ ply	4.584	45.578	71,6 %
PBS Kontrolle	3.339	56.065	75,3 %

Seq: Sequenzierung, *S. pn*: Infektion mit Pneumokokken des Serotyps 2 (D39 WT); *S. pn*  $\Delta$ ply: Infektion mit Pneumolysin-defizienter Mutante (D39  $\Delta$ ply); PBS Kontrolle: Scheininfektion mit Lösungsmittel (PBS).

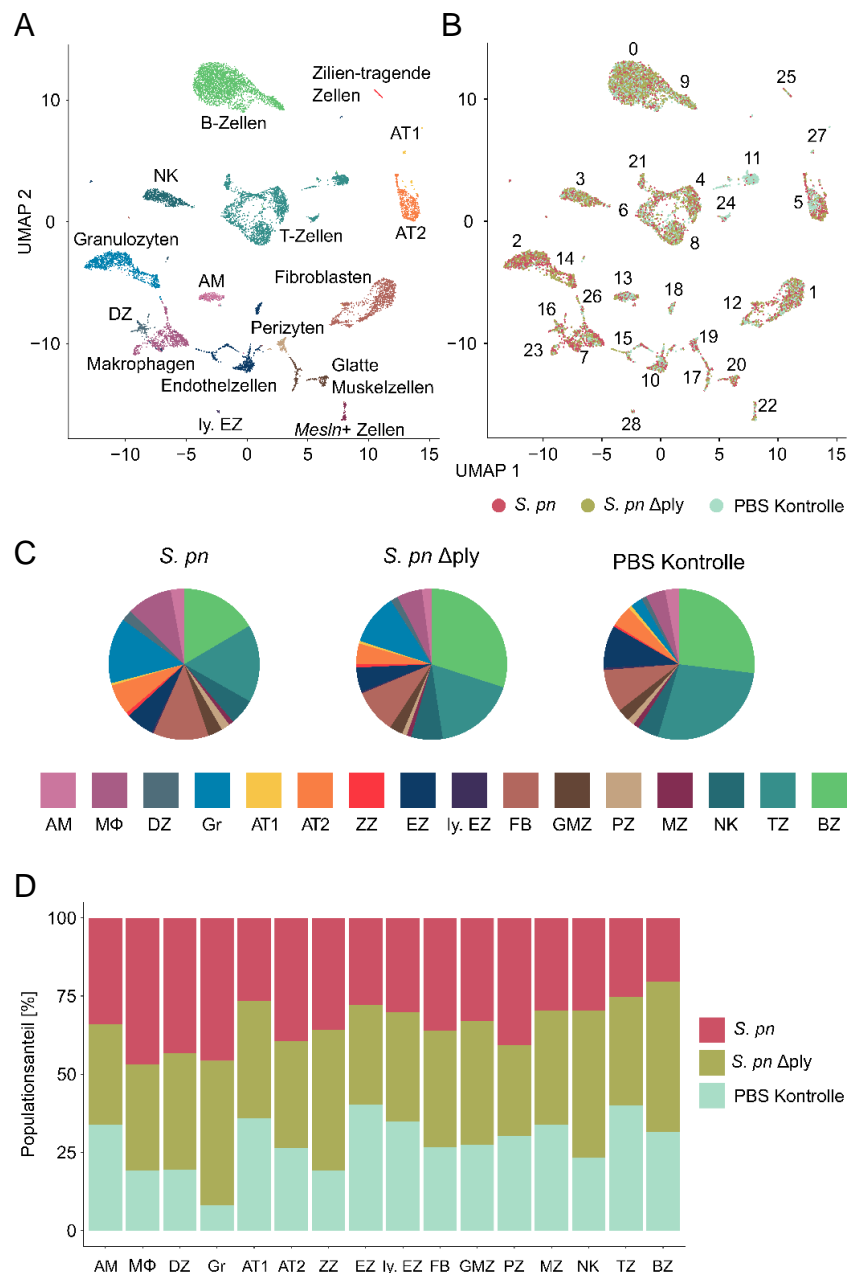
**7.3.2. Die zelluläre Komplexität der Lunge konnte mit 28 *Clustern* dargestellt werden.**

## Ergebnisse

Die mRNA-Moleküle einzelner isolierter Zellen wurden im Zuge der reversen Transkription in GEM markiert, so dass sie nach cDNA-Amplifikation und Sequenzierung der Genexpressionsbibliotheken ihren Ursprungszellen zugeordnet werden konnten. Nach bestandener Qualitätskontrolle wurden die Ursprungszellen im UMAP-Verfahren zur Dimensionsreduktion dargestellt (Unterpunkt 6.2.8.2.). Jede Ursprungszelle ist als Punkt dargestellt und anhand der Ähnlichkeit des Gen-Expressionsmusters in *Clustern* (englisch für Gruppen bzw. Ballungen) gruppiert. Eine Darstellung mit 28 *Clustern* ermöglichte die beste Aufteilung erhaltener Zellen unter biologischen Gesichtspunkten (Abbildung 20A, B). So zeigte sich, dass Leukozyten lymphatischen Ursprungs links oben angeordnet sind, Epithelzellen rechts oben, Leukozyten myeloischen Ursprungs links unten und mesenchymale Zellen rechts unten. Die *Cluster* waren heterogen in Bezug auf ihre Größe und Gruppenzusammensetzung. Eine Analyse der *Cluster* auf Zelltyp-spezifische Genexpression, sogenannte Markergene, erlaubte die Zuordnung der folgenden Lungenzellpopulationen zu entsprechenden *Clustern*: Alveolarmakrophagen (AM), interstitielle und inflammatorische Makrophagen (M $\Phi$ ), Dendritische Zellen (DZ), Granulozyten (Gr), Typ I Alveolarepithelzellen (AT1), Typ II Alveolarepithelzellen (AT2), Zilien-tragende Zellen (ZZ), vaskuläre Endothelzellen (EZ), lymphatische Endothelzellen (ly. EZ), Fibroblasten (FB), glatte Muskelzellen (GMZ), Perizyten (PZ), *Msln*<sup>+</sup> Mesothelzellen (MZ), natürliche Killerzellen (NK), T-Zellen (TZ) sowie B-Zellen (BZ). Die Populationen der Granulozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen wurden mehrheitlich durch Zellen der infizierten Versuchsgruppen gebildet (Abbildung 20C, D).

Einige Genexpressions-Marker, die zur Identifikation pulmonaler Zellpopulationen herangezogen wurden, sollen an dieser Stelle angeführt werden: Alveolarmakrophagen wurden anhand des Gens *Marco* identifiziert, weitere Makrophagen (interstitielle und inflammatorische) durch *Adgre1*, Dendritische Zellen durch *Fit3*. Die Granulozyten-*Cluster* präsentierten sich durch hohe *S100a9* Expression, wobei der Name aufgrund des Vorhandenseins einzelner *Siglec*f positiver eosinophiler Granulozyten zwischen den neutrophilen Granulozyten gewählt wurde. Typ I Alveolarepithelzellen wurden durch *Akap5* dargestellt, Typ II Alveolarepithelzellen durch *Lamp3*, Zilien-tragende Zellen durch *Foxj1*, vaskuläre Endothelzellen durch *Cdh5*, lymphatische Endothelzellen mittels *Mmrn1* identifiziert, Fibroblasten durch *Inmt*, glatte Muskelzellen durch *Acta2*, Perizyten durch *Cox4i2*, Mesothelzellen durch *Msln*, natürliche Killerzellen durch *Ncr1*, T-Zellen durch *Cd3e* sowie B-Zellen durch *Cd79a* (Abbildung 21). Biologisch spezifische Marker-Gene können allerdings in

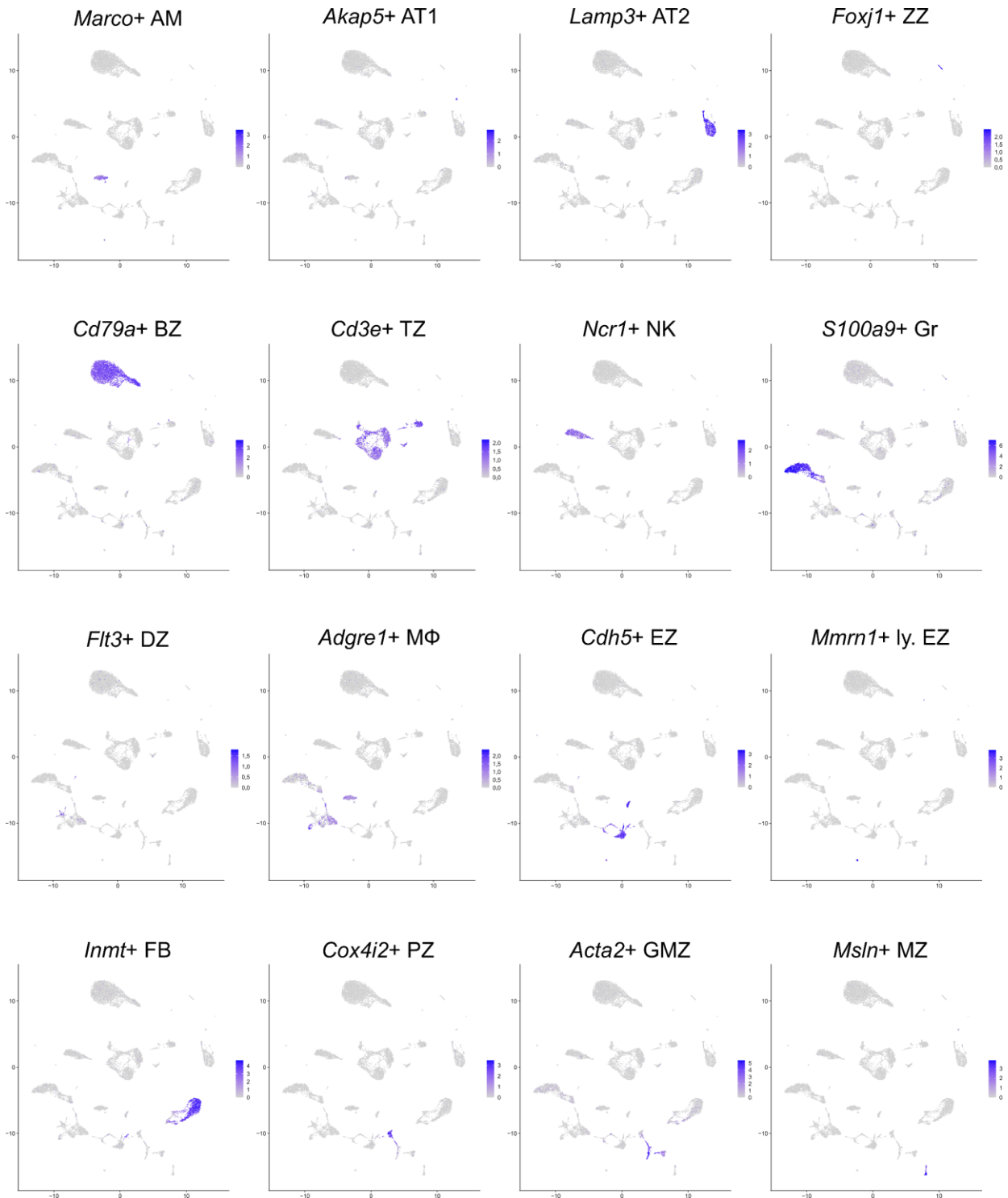
geringem Ausmaß auch in anderen Zellpopulation nachgewiesen werden, wie das Beispiel des Surfactant Protein-C Gens (*Sftpc*) verdeutlicht (Abbildung 22).



### Abbildung 20: Übersicht sequenzierter Lungenzellen

**A:** UMAP-Darstellung erhaltener Zellpopulationen. **B:** UMAP-Darstellung isolierter Lungenzellen mit Beschriftung der durch den Louvain-Algorithmus erhaltenen 28 Zellcluster. Die Zellen sind nach Versuchsgruppe gefärbt. **C:** Tortendiagramme der prozentualen Zusammensetzung der Versuchsgruppen. **D:** Verteilung der zugeordneten Zellpopulationen nach Versuchsgruppe. Proben gepoolt: *S. pn*: Infektion mit Pneumokokken des Serotyps 2 (D39 WT, n = 3); *S. pn Δply*: Infektion mit Pneumolysin-defizienter Mutante (D39 Δply, n = 3); PBS Kontrolle: Scheininfektion mit Lösungsmittel (PBS, n = 2). AM: Alveolarmakrophagen, AT1: Typ I Alveolarepithelzellen, AT2: Typ II Alveolarepithelzellen, BZ: B-Zellen, DZ: Dendritische Zellen, EZ: vaskuläre Endothelzellen, FB: Fibroblasten, GMZ: glatte Muskelzellen, Gr: Granulozyten, ly. EZ: lymphatische Endothelzellen, MZ: *Msln*<sup>+</sup> Mesothezellen, MΦ: interstitielle und inflammatorische Makrophagen, NK: natürliche Killerzellen, PZ: Perizyten, TZ: T-Zellen, UMAP: *Uniform Manifold Approximation and Projection*, ZZ: Zilien-tragende Zellen.

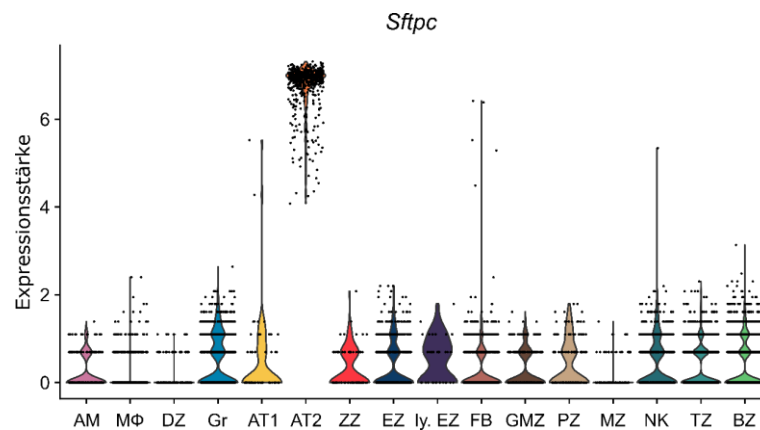
## Ergebnisse



### Abbildung 21: Exemplarische Darstellung von Marker-Genen

*Feature Plots* zur Darstellung der Expression von Marker-Genen sequenzierter Lungenzellpopulationen. Das entsprechende Gen sowie die zugeordnete Zellpopulation ist über der Darstellung exprimierender Zellen im UMAP-Format angegeben. AM: Alveolarmakrophagen, AT1: Typ I Alveolarepithelzellen, AT2: Typ II Alveolarepithelzellen, BZ: B-Zellen, DZ: Dendritische Zellen, EZ: vaskuläre Endothelzellen, FB: Fibroblasten, GMZ: glatte Muskelzellen, Gr: Granulozyten, ly. EZ: lymphatische Endothelzellen, MZ: *Msln*<sup>+</sup> Mesothelzellen, MΦ: interstitielle und inflammatorische Makrophagen, NK: natürliche Killerzellen, PZ: Perizyten, TZ: T-Zellen, ZZ: Zilien-tragende Zellen.





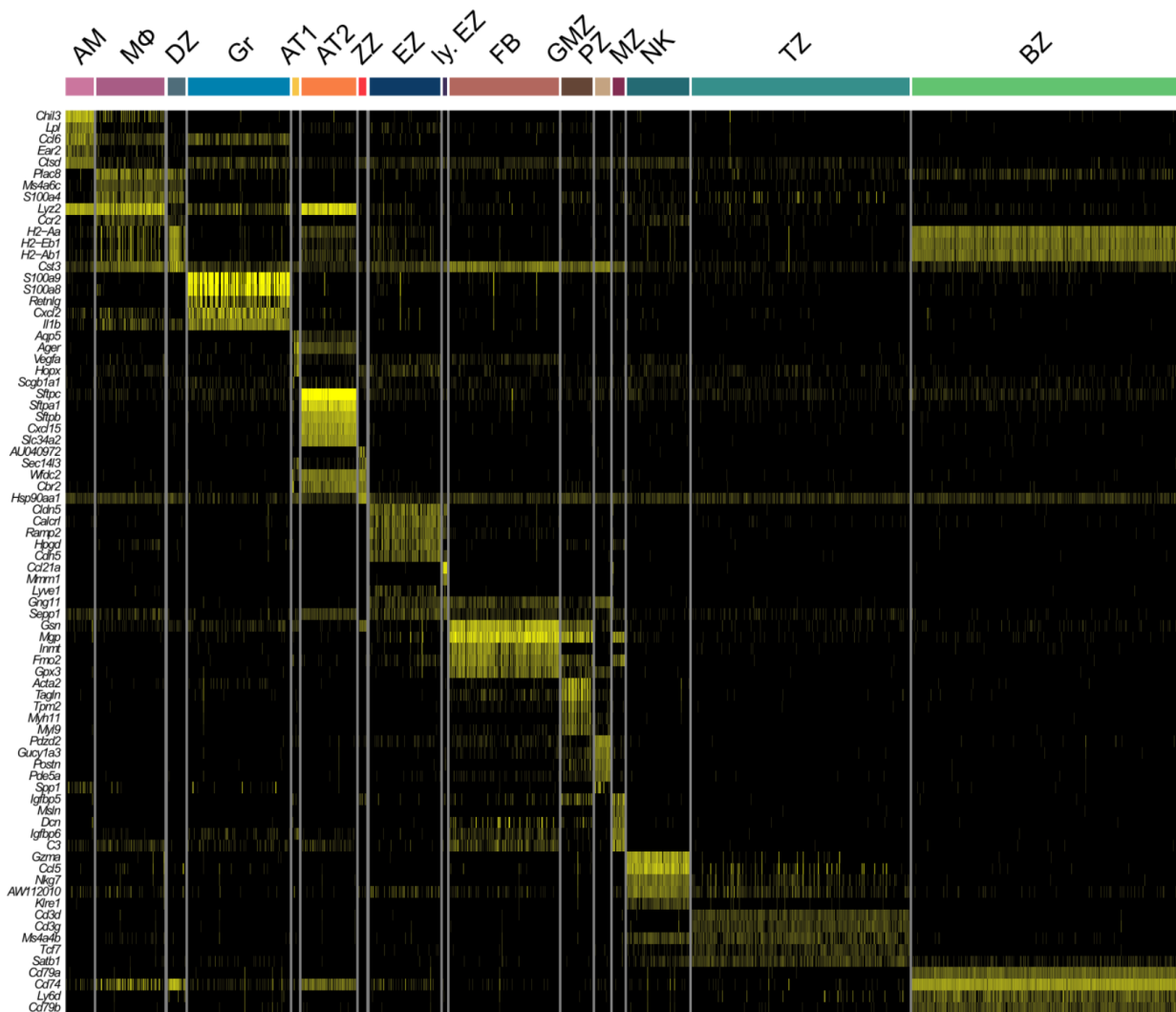
### Abbildung 22: Expressionsstärke des Gens *Sftpc*

*Violin Plots* der Zellen, die *Surfactant Protein C (Sftpc)* exprimieren, geordnet nach Zelltyp. AM: Alveolarmakrophagen, AT1: Typ I Alveolarepithelzellen, AT2: Typ II Alveolarepithelzellen, BZ: B-Zellen, DZ: Dendritische Zellen, EZ: vaskuläre Endothelzellen, FB: Fibroblasten, GMZ: glatte Muskelzellen, Gr: Granulozyten, ly. EZ: lymphatische Endothelzellen, MZ: *Msln*<sup>+</sup> Mesothelzellen, MΦ: interstitielle und inflammatorische Makrophagen, NK: natürliche Killerzellen, PZ: Perizyten, TZ: T-Zellen, ZZ: Zilien-tragende Zellen.

B- und T-Lymphozyten stellten in allen Versuchsgruppen große Anteile und mehrere *Cluster* dar. Ein Teil der T-Zellen, dargestellt in *Cluster* 11 und 24, wurde mehrheitlich durch Zellen der scheininfizierten Kontrollgruppe gebildet. Diese T-Zell Subpopulationen zeigten eine Hochregulierung von *Cd24a*, was darauf hindeutet, dass es sich um proliferierende T-Zellen handelt [159]. *Cluster* 11 zeigte außerdem eine starke Expression des *Rag1* Gens, *Cluster* 24 von *Mki67*. Exprimierten die Zellen des *Clusters* 24 mehrheitlich *Cd8a*, gab es in *Cluster* 11 *Cd8a* und *Cd4* exprimierende Zellen. *Density Plots* zeigten außerdem das Vorhandensein von Zellen, die simultan *Cd8a* und *Cd4* exprimierten in *Cluster* 11.

Die unterschiedlichen Zellpopulationen zeigten ein individuelles Muster von hoch exprimierten Genen. Die Top 5 an unterschiedlich hoch exprimierten Genen je definierter Zellpopulation sind in einer *Heatmap* dargestellt (Abbildung 23). Jede Spalte symbolisiert eine Zelle, sodass *Cluster* mit größeren Zellaufkommen breiter dargestellt sind. Allerdings wurde nicht jedes dieser Top-Gene in jeder einzelnen Zelle einer Population exprimiert bzw. war nachweisbar.

## Ergebnisse



**Abbildung 23: Höchst exprimierte Gene der isolierten Lungenzellpopulationen**

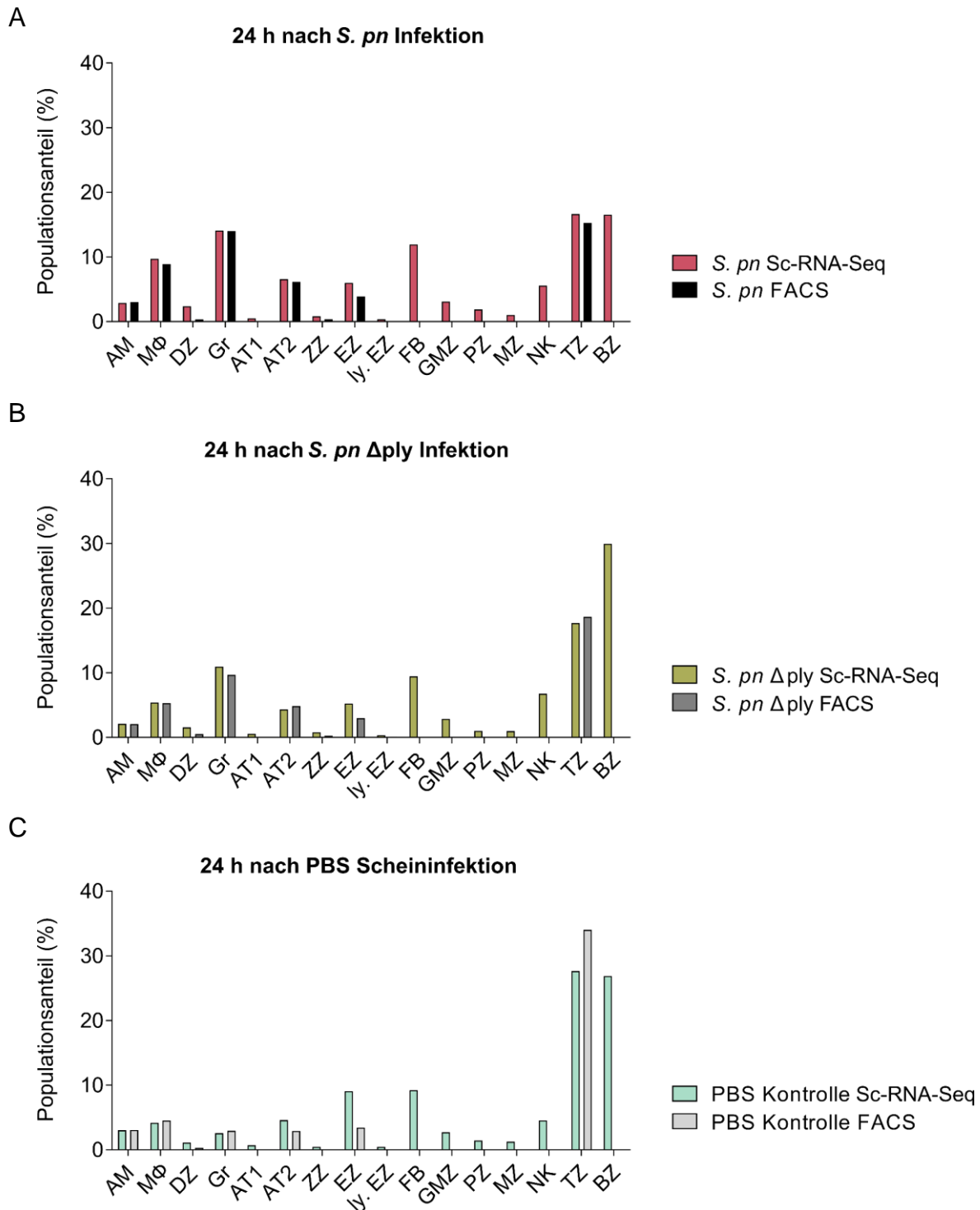
*Heatmap* der Zelltyp-spezifisch am stärksten exprimierten Gene (dargestellt in gelbem Farbton). Die Kopfzeile gibt die zugehörige Zellpopulation an. AM: Alveolarmakrophagen, AT1: Typ I Alveolarepithelzellen, AT2: Typ II Alveolarepithelzellen, BZ: B-Zellen, DZ: Dendritische Zellen, EZ: vaskuläre Endothelzellen, FB: Fibroblasten, GMZ: glatte Muskelzellen, Gr: Granulozyten, ly. EZ: lymphatische Endothelzellen, MZ: *Msln*<sup>+</sup> Mesothelzellen, MΦ: interstitielle und inflammatorische Makrophagen, NK: natürliche Killerzellen, PZ: Perizyten, TZ: T-Zellen, ZZ: Zilien-tragende Zellen.

### 7.3.3. Die prozentualen Anteile der Zellpopulationen in den Sequenzierungsdaten deckten sich mit den durchflusszytometrisch ermittelten Frequenzen.

Den durch Genexpressions-Zellmarker definierten Populationen des sequenzierten Datensatzes wurden durchflusszytometrisch gemessene Zellen nach Phänotypisierung mit Oberflächenmarkern derselben Ausgangsproben gegenübergestellt. Der dargestellte Vergleich zeigt eine hohe Übereinstimmung der Zell-Frequenzen beider Methoden (Abbildung 24). So konnte sowohl durch Sequenzierung als auch durchflusszytometrische Messung eine prozentuale Zunahme an Granulozyten und auch Makrophagen in infizierten Versuchsgruppen beobachtet werden (Abbildung 24A, B). Für beide Populationen

waren die Werte in der *S. pn*-infizierten Gruppe am höchsten, bei Makrophagen waren die prozentualen Gesamtanteile durch Sequenzierung höher als durchflusszytometrisch ermittelt. T-Zellen nahmen in der scheininfizierten Kontrollgruppe durchflusszytometrisch einen größeren Anteil an. Endothelzellen waren in allen Versuchsgruppen stärker in sequenzierten Proben vertreten. Am deutlichsten unterschied sich die Frequenz in der scheininfizierten Gruppe (Abbildung 24C). B-Zellen, mesenchymale Zellpopulationen, wie Fibroblasten, Perizyten und glatte Muskelzellen, wurden ausschließlich durch ScRNA-Seq gemessen und sind daher ohne Vergleichswert angegeben (Abbildung 24A – C).

## Ergebnisse



### Abbildung 24: Prozentuale Zellverteilung bei Durchflusszytometrie und Sc-RNA-Seq

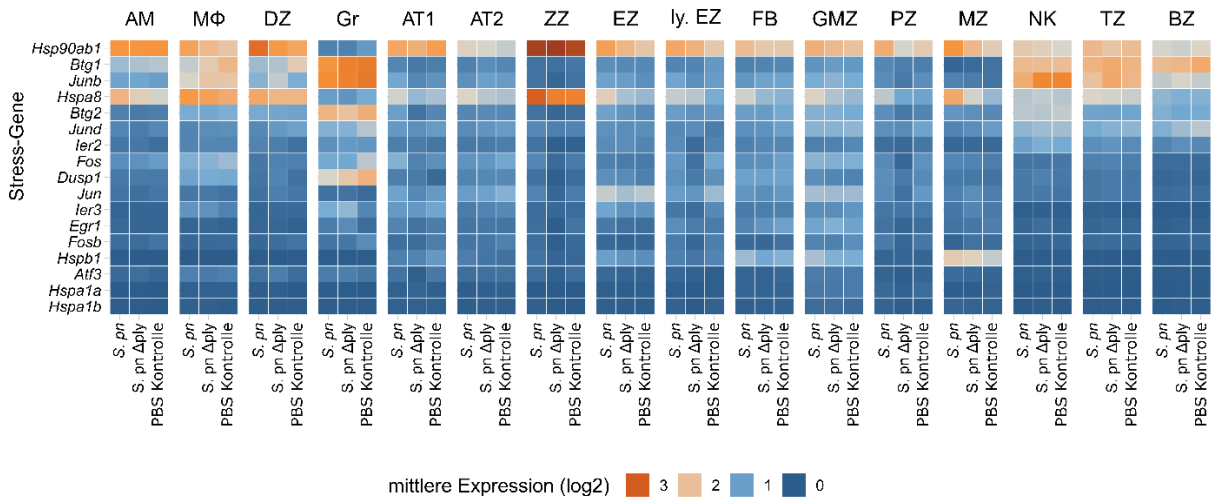
Frequenzen durchflusszytometrisch gemessener isolierter Lungenzellen nach Phänotypisierung mit Oberflächenmarkern (FACS) und durch Einzelzell-Sequenzierung (Sc-RNA-Seq) derselben Ausgangsproben, mit Zuordnung nach Genexpressions-Zellmarkern. **A:** *S. pn*-infizierte Versuchsgruppe, **B:** *S. pn* Δply-infizierte Versuchsgruppe, **C:** Kontrollgruppe. Versuchsgruppen: Proben gepoolt: *S. pn*: Infektion mit Pneumokokken des Serotyps 2 (D39 WT, n = 3); *S. pn* Δply: Infektion mit Pneumolysin-defizienter Mutante (D39 Δply, n = 3); PBS Kontrolle: Scheininfection mit Lösungsmittel (PBS, n = 2). AM: Alveolarmakrophagen, AT1: Typ I Alveolarepithelzellen, AT2: Typ II Alveolarepithelzellen, BZ: B-Zellen, DZ: Dendritische Zellen, E2: vaskuläre Endothelzellen, FB: Fibroblasten, GMZ: glatte Muskelzellen, Gr: Granulozyten, ly. E2: lymphatische Endothelzellen, MZ: *Msln*<sup>+</sup> Mesothelzellen, MΦ: interstitielle und inflammatorische Makrophagen, NK: natürliche Killerzellen, PZ: Perizyten, TZ: T-Zellen, ZZ: Zilien-tragende Zellen.

### 7.3.4. Eine überschießende Expression von „Zellstress-Genen“ konnte vermieden werden.

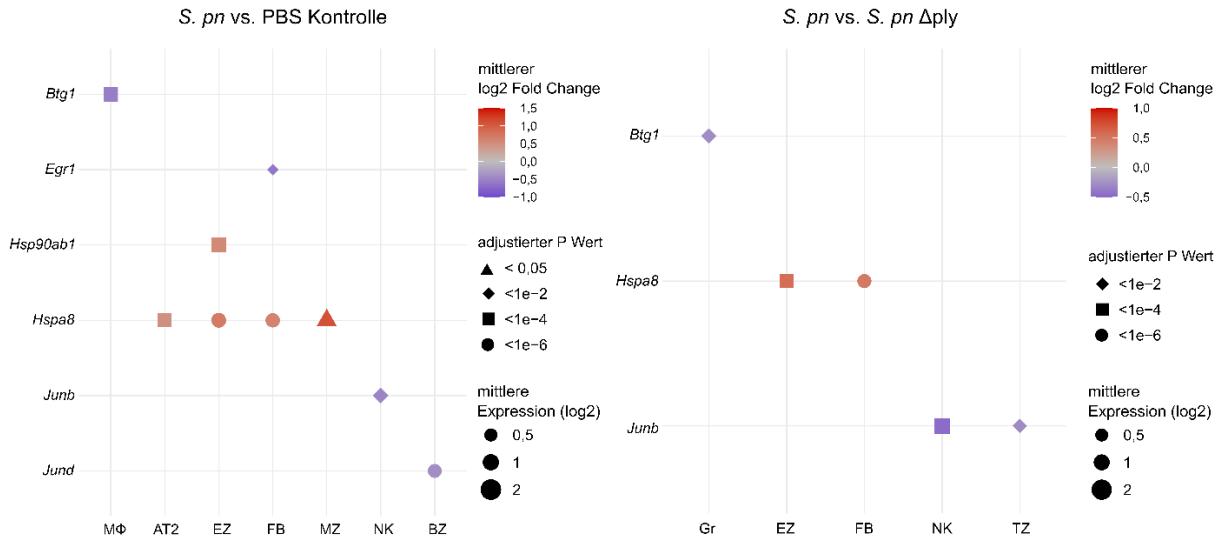
Erhaltene Zellen aller *Cluster* und Versuchsgruppen wurden auf die Expression von beschriebenen „Zellstress-Genen“ untersucht [92, 160]. Die Expressionshöhe dieser 17 Stressgene (*Hsp90ab1*, *Btg1*, *Junb*, *Hspa8*, *Btg2*, *Jund*, *Ier2*, *Fos*, *Dusp1*, *Jun*, *Ier3*, *Egr1*, *Fosb*, *Hspb1*, *Atf3*, *Hspa1a*, *Hspa1b*) wurde individuell für alle sequenzierten Zellen erhoben und der Mittelwert pro Zelltyp in Abhängigkeit der Versuchsgruppe berechnet. Die stärkste Expression einzelner Stress-Gene wurde in der Gruppe der Zilien-tragenden Zellen festgestellt. Insbesondere das *Heat Shock Protein 90 Alpha Family Class B Member 1* (*Hsp90ab1*) wurde von den meisten Geweben exprimiert, interessanterweise allerdings kaum in Granulozyten. Insgesamt schienen Leukozyten-Populationen, durch enzymatischen Verdau bei 37 °C, stärker Stressgene zu exprimieren (Abbildung 25A). Im Vergleich der Versuchsgruppen war der Unterschied von sechs Stressgenen zwischen *S. pn* Infektionsgruppe und PBS Kontrollgruppe (*Btg1*, *Egr1*, *Hsp90ab1*, *Hspa8*, *Junb* und *Jund*) signifikant. *Heat shock 70 kDa protein 8* (*Hspa8*) wurde in AT2, EZ, FB und MZ signifikant stärker in der infizierten Versuchsgruppe exprimiert, *Hsp90ab1* in EZ. In der Kontrollgruppe wurde *BTG anti-proliferation factor 1* (*Btg1*) in MΦ, *Early growth response 1* (*Egr1*) in FB, *Jun B proto-oncogene* (*Junb*) in NK und *Jun D proto-oncogene* (*Jund*) in BZ signifikant stärker exprimiert. Drei Stressgene (*Btg1*, *Hsp8* und *Junb*) waren im Vergleich *S. pn* Infektionsgruppe und *S. pn* Δply Infektionsgruppe signifikant unterschiedlich exprimiert. *Hspa8* wurde in EZ der *S. pn* Infektionsgruppe signifikant höher exprimiert, während *Btg1* in Gr und *Junb* in NK und TZ der *S. pn* Δply Infektionsgruppe signifikant stärker exprimiert wurden (Abbildung 25B). Mittels der Funktion `AddModuleScore()` des R Pakets `Seurat` wurde ein *Stress-Score* errechnet [161]. Ein hoher *Stress-Score* ist in Gelb dargestellt. Im Bereich der Granulozyten exprimierte ein großer Teil der Zellen Versuchsgruppen-unabhängig Stressgene, während in anderen Populationen, wie GMZ, FB und AT2, nur konditionsabhängig kleine Anteile einen erhöhten *Stress-Score* aufwiesen (Abbildung 25C).

# Ergebnisse

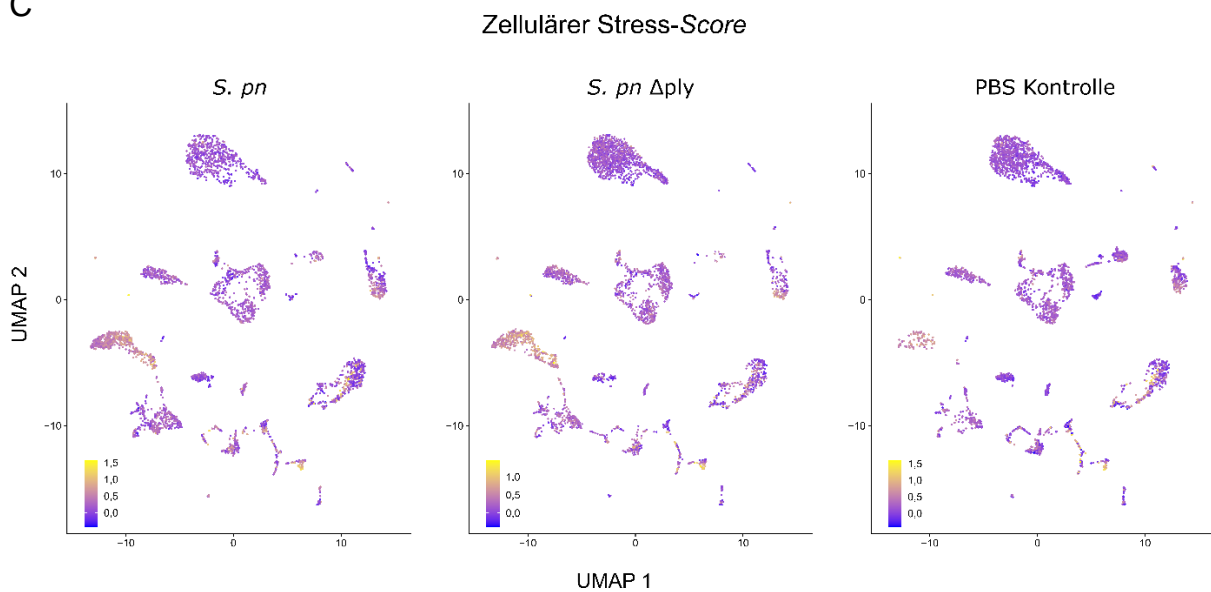
A



B



C



(Legende auf der nächsten Seite)

**Abbildung 25: Expression definierter „Stress-Gene“ des Sc-RNA-Seq Datensatzes**

Einzelzell-Sequenzierungs-Datensätze wurden auf eine übermäßige Expression definierter „Zellstress-Gene“ untersucht. **A:** *Heatmap* der durchschnittlichen Expression je Zellpopulation und Versuchsgruppe. **B:** *Dotplots* signifikant differenziell exprimierter Stress-Gene in den Vergleichen *S. pn*-infizierte Versuchstiere gegenüber der Kontrollgruppe und *S. pn*-infizierte Versuchstiere vs. *S. pn Δply*-infizierte Versuchstiere. Als signifikant wurden Gene mit *P*-Werten unter 0,05 nach durchgeführter Bonferroni Korrektur für multiple Tests (adjustierter *P*-Wert) angenommen. **C:** *Feature Plots* zur Darstellung eines aus allen 17 Stressgenen bestehenden Stress-Scores. Versuchsgruppen: Proben gepoolt: *S. pn*: Infektion mit Pneumokokken des Serotyps 2 (D39 WT, n = 3); *S. pn Δply*: Infektion mit Pneumolysin-defizienter Mutante (D39 Δply, n = 3); PBS Kontrolle: Scheininfektion mit Lösungsmittel (PBS, n = 2). AM: Alveolarmakrophagen, AT1: Typ I Alveolarepithelzellen, AT2: Typ II Alveolarepithelzellen, BZ: B-Zellen, DZ: Dendritische Zellen, EZ: vaskuläre Endothelzellen, FB: Fibroblasten, GMZ: glatte Muskelzellen, Gr: Granulozyten, ly. EZ: lymphatische Endothelzellen, MZ: *Msln*<sup>+</sup> Mesothelzellen, MΦ: interstitielle und inflammatorische Makrophagen, NK: natürliche Killerzellen, PZ: Perizyten, TZ: T-Zellen, ZZ: Zilien-tragende Zellen.

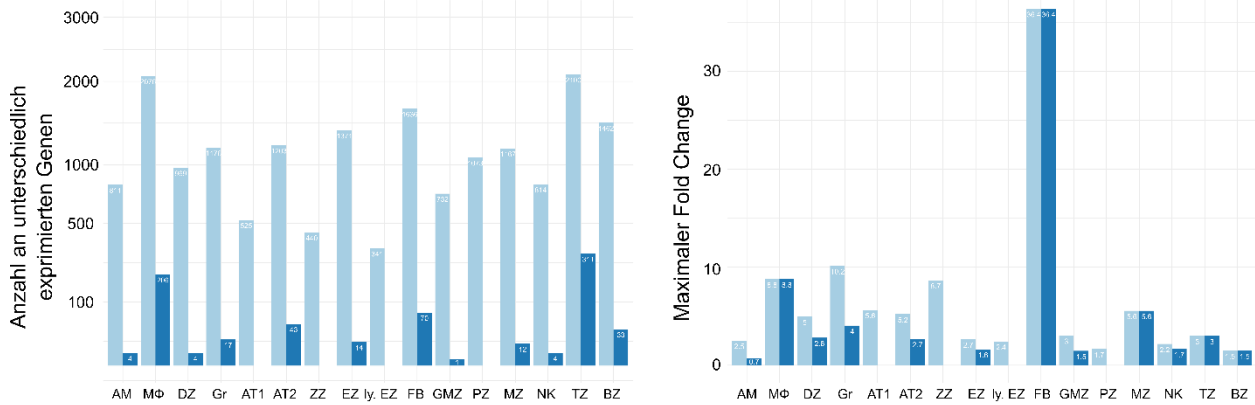
**7.4. Analysen der differenziellen Genexpression und Zell-Zell-Kommunikation****7.4.1. Das Expressionsmuster isolierter Lungenzellpopulationen unterschied sich 24 Stunden nach Infektion signifikant von dem der Kontrollgruppe.**

Die mit Sc-RNA-Seq ermittelte Expressionshöhe von Genen isolierter Lungenzellen aus mit *S. pn*-infizierten Versuchstieren wurde mit der von scheininfizierten und mit *S. pn Δply*-infizierten Versuchstieren gemessenen Genexpression verglichen und mittels Wilcoxon-Tests mit anschließender Bonferroni-Korrektur für multiple Testungen statistisch ausgewertet (Abbildung 26). Die Anzahl an signifikant unterschiedlich exprimierten Genen variierte stark zwischen den unterschiedlichen Zellpopulationen. Durch die angewandte Bonferroni-Korrektur wurden in einigen Geweben mit kleinerer Zellzahl keine Gene als signifikant unterschiedlich exprimiert gewertet. Die größten Unterschiede im Expressionsverhältnis (engl.: *fold change*, FC) zeigten sich zwischen den Zellpopulationen der *S. pn*-infizierten und scheininfizierten Versuchstiere. TZ wiesen sowohl nominal (2100) als auch nach Bonferroni-Korrektur für multiple Tests mit 311 die höchste Anzahl an signifikant unterschiedlich exprimierten Genen auf. MΦ zeigten die höchste Anzahl an signifikant unterschiedlich exprimierten Genen (206) sowie den höchsten maximalen FC (8,8) der myeloischen Zellen nach Bonferroni-Korrektur. Der maximale FC war mit 36,4 bei Fibroblasten am höchsten (Abbildung 26A). Im Vergleich der *S. pn* Versuchsgruppe und der *S. pn Δply* Versuchsgruppe wiesen MΦ mit 119 die höchste Anzahl an signifikant unterschiedlich exprimierten Genen nach Bonferroni-Korrektur auf. Auch der maximale FC war bei MΦ mit 3,1 am höchsten (Abbildung 26B).

# Ergebnisse

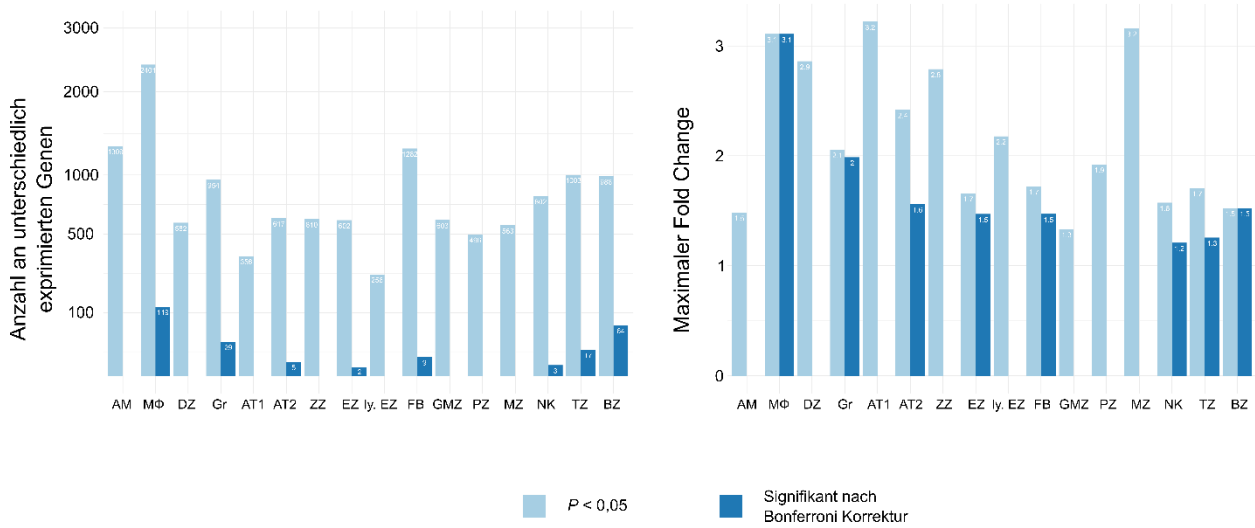
A

*S. pn* vs. PBS Kontrolle



B

*S. pn* vs. *S. pn* Δply



## Abbildung 26: Differenzielle Genexpression 24 Stunden nach Infektion

Anzahl an signifikant unterschiedlich exprimierten Genen sowie maximaler *Fold Change* je Zellpopulation. Die Anzahl an nominal signifikant unterschiedlich exprimierten Genen (*P*-Wert unter 0,05) sowie der maximale *Fold Change* sind in hellblau dargestellt. Die Anzahl an signifikant unterschiedlich exprimierten Genen nach Bonferroni-Korrektur für multiple Tests (adjustierter *P*-Wert unter 0,05) sowie der maximale *Fold Change* sind dunkelblau dargestellt. **A:** Unterschiedlich exprimierte Gene im Vergleich *S. pn*-infizierte Versuchsgruppe vs. Kontrollgruppe. **B:** Unterschiedlich exprimierte Gene im Vergleich *S. pn* Infektionsgruppe und *S. pn* Δply Infektionsgruppe. Versuchsgruppen: Proben gepoolt: *S. pn*: Infektion mit Pneumokokken des Serotyps 2 (D39 WT, n = 3); *S. pn* Δply: Infektion mit Pneumolysin-defizienter Mutante (D39 Δply, n = 3); PBS Kontrolle: Scheininfektion mit Lösungsmittel (PBS, n = 2). AM: Alveolarmakrophagen, AT1: Typ I Alveolarepithelzellen, AT2: Typ II Alveolarepithelzellen, BZ: B-Zellen, DZ: Dendritische Zellen, EZ: vaskuläre Endothelzellen, FB: Fibroblasten, GMZ: glatte Muskelzellen, Gr: Granulozyten, ly: EZ: lymphatische Endothelzellen, MZ: *Msln*<sup>+</sup> Mesothelzellen, MΦ: interstitielle und inflammatorische Makrophagen, NK: natürliche Killerzellen, PZ: Perizyten, TZ: T-Zellen, ZZ: Zilien-tragende Zellen.



#### 7.4.2 Fibroblasten zeigten eine starke transkriptionale Aktivität nach *S. pn* Infektion.

Fibroblasten sind residente Gewebezellen, die auch im Lungengewebe zu finden sind und zum Abklingen von Entzündungsreaktionen beitragen, indem sie Chemokin-Gradienten normalisieren [162]. Obwohl eine mögliche positive Rolle von alveolären Fibroblasten bei der akuten Lungenschädigung beschrieben wurde, bleibt ihre Rolle in der akuten inflammatorischen Phase unklar, weshalb im Rahmen dieser Dissertation ihre Genexpression untersucht wurde (Abbildung 27). [163].

Bei *Volcano Plots* stellt die y-Achse die *P*-Werte und die x-Achse den FC dar, welcher zur besseren Übersicht als logarithmischer Wert angegeben ist. Sowohl in *Scatter* als auch *Volcano Plots* sind Gene mit einem *P*-Wert kleiner als 0,05 als Punkt dargestellt. Jene Gene, die nach erfolgter Bonferroni-Korrektur für multiple Tests einen adjustierten *P*-Wert von unter 0,05 aufweisen, sind in dunkelgrüner Farbe dargestellt.

Die Gene des *Serum Amyloid A3 (Saa3)* und *Lipocalin 2 (Lcn2)* wurden durch die *S. pn* Infektion deutlich hochreguliert (FC von 36,38 und 5,19). Das *Zinc Finger and BTB Domain Containing 16 Gen (Zbtb16)* stach hingegen durch einen sehr kleinen *P*-Wert ( $2,1 \times 10^{-29}$  und  $5,7 \times 10^{-24}$  nach Bonferroni-Korrektur) hervor und *Gelsolin (Gsn)* durch hohe Expressionswerte (mittlere Expression von 3,9 in der *S. pn*-infizierten Versuchsgruppe).

Im Vergleich zwischen *S. pn* Infektionsgruppe und *S. pn*  $\Delta$ ply Infektionsgruppe fiel ebenfalls das Gen *Zbtb16* auf, das die stärkste Hochregulierung durch *S. pn* Infektion sowohl nach FC als auch *P*-Wert aufwies (FC: 1,47; *P*-Wert:  $1,8 \times 10^{-21}$  sowie  $5 \times 10^{-16}$  nach Bonferroni-Korrektur); außerdem das *Heat Shock 70 kDa Protein 8 (Hspa8)*, das durch einen niedrigen *P*-Wert und den Expressionswert auffiel (*P*-Wert:  $1,4 \times 10^{-15}$  sowie  $3,9 \times 10^{-10}$  nach Bonferroni-Korrektur, mittlere Expression von 1,7 in der *S. pn*-infizierten Versuchsgruppe). In der *S. pn*  $\Delta$ ply Infektionsgruppe wurde *Cystein-Rich-Protein 61 (Cyr61)* verstärkt exprimiert (FC: von 0,6; *P*-Wert:  $9,2 \times 10^{-13}$  sowie  $2,5 \times 10^{-7}$  nach Bonferroni-Korrektur).





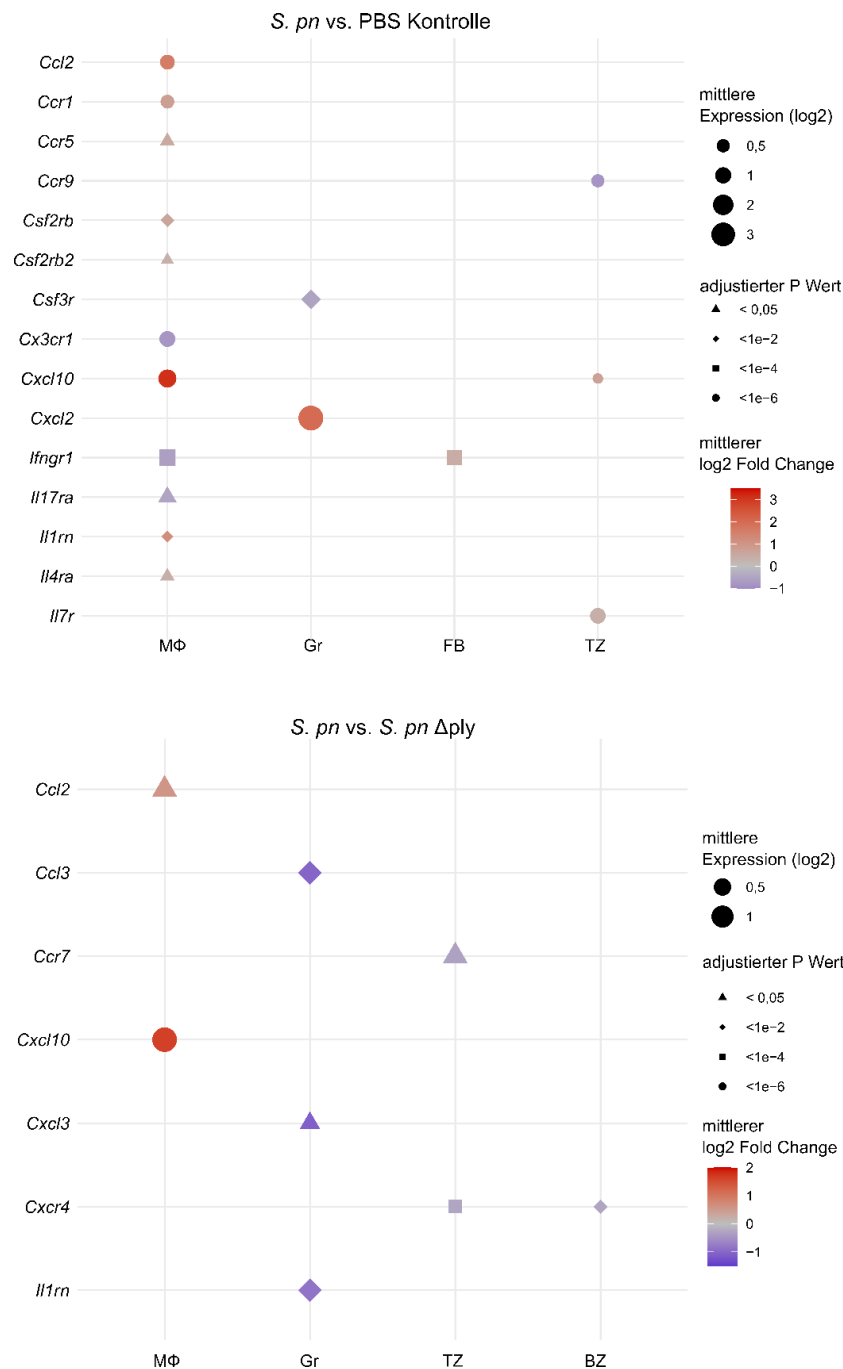
### **Abbildung 27: Inflammatorische Mediatoren im Fibroblasten Kompartiment**

Differenziell exprimierte Gene im Fibroblasten Kompartiment mit einem *P*-Wert kleiner als 0,05 (als Punkt dargestellt). Gene, die nach Bonferroni-Korrektur für multiple Tests einen adjustierten *P*-Wert von unter 0,05 aufwiesen, sind in dunkelgrüner Farbe dargestellt. **A – B:** Unterschiedlich exprimierte Gene im Vergleich zwischen *S. pn*-infizierten Versuchstieren vs. PBS Kontrollgruppe. A: *Volcano Plot*, B: *Scatter Plot*. **C – D:** Unterschiedlich exprimierte Gene im Vergleich zwischen *S. pn* Infektionsgruppe und *S. pn*  $\Delta$ ply Infektionsgruppe. C: *Volcano Plot*, D: *Scatter Plot*. Die roten Linien in den *Volcano Plots* zeigen einen *Log2 Fold Change* von 0,2 und -0,2 an. Versuchsgruppen: Proben gepoolt: *S. pn*: Infektion mit Pneumokokken des Serotyps 2 (D39 WT, n = 3); *S. pn*  $\Delta$ ply: Infektion mit Pneumolysin-defizienter Mutante (D39  $\Delta$ ply, n = 3); PBS Kontrolle: Scheininfektion mit Lösungsmittel (PBS, n = 2).

### **7.4.3. *Cxcl10* und *Cxcl2* waren die am stärksten hochregulierten Zytokin-Gene nach *S. pn* Infektion.**

Zell-Zell-Kommunikation im Zuge von Immunreaktionen findet häufig über Zytokin-Zytokin-Rezeptor-Interaktionen statt [164]. Gene, die für Zytokin-Rezeptoren und deren Liganden kodieren, wurden auf unterschiedliche Expression zwischen den Versuchsgruppen untersucht (Abbildung 28). Im Vergleich der *S. pn* Versuchsgruppe mit der Kontrollgruppe zeigte sich, dass vor allem bei M $\Phi$  die Expression von Zytokin-Genen durch eine *S. pn* Infektion beeinflusst wurde. Am stärksten stach der *Chemokine (C-X-C motif) Ligand 10 (Cxcl10)* mit einem FC von 8,8 hervor, während im Gegensatz dazu der *Chemokine (C-X3-C motif) Receptor 1 (Cx3cr1; FC: 0,6)* in der Kontrollgruppe stärker exprimiert wurde. Bei Granulozyten wurde der *Chemokine (C-X-C motif) Ligand 2 (Cxcl2)* stark hochreguliert (FC: von 4,0) und der *Colony Stimulating Factor 3 Receptor (Csf3r)* herunter reguliert (FC: 0,7).

Im Vergleich der *S. pn* Versuchsgruppe mit der *S. pn*  $\Delta$ ply Versuchsgruppe zeigte sich, dass bei M $\Phi$  ebenso *Cxcl10* die stärkste Hochregulierung erfahren hatte (FC: 3,1). Auch der *Chemokine (C-C motif) Ligand 2 (Ccl2)* wurde verstärkt in der *S. pn* Versuchsgruppe exprimiert (FC: 1,5). Bei den Granulozyten wurden die Gene des *Chemokine (C-C motif) Ligand 3 (Ccl3; FC: 0,5)*, des *Chemokine (C-X-C motif) Ligand 3 Cxcl3 (FC: 0,5)* und des *Interleukin 1 Receptor Antagonist (Il1rn) (FC: 0,6)* signifikant stärker in der *S. pn*  $\Delta$ ply Versuchsgruppe exprimiert. Des Weiteren wurde auch das Inflammasom Gen *NLR Family Pyrin Domain Containing 3 (Nlrp3)* signifikant stärker in den Granulozyten der *S. pn*  $\Delta$ ply Versuchsgruppe exprimiert (FC: 0,68).



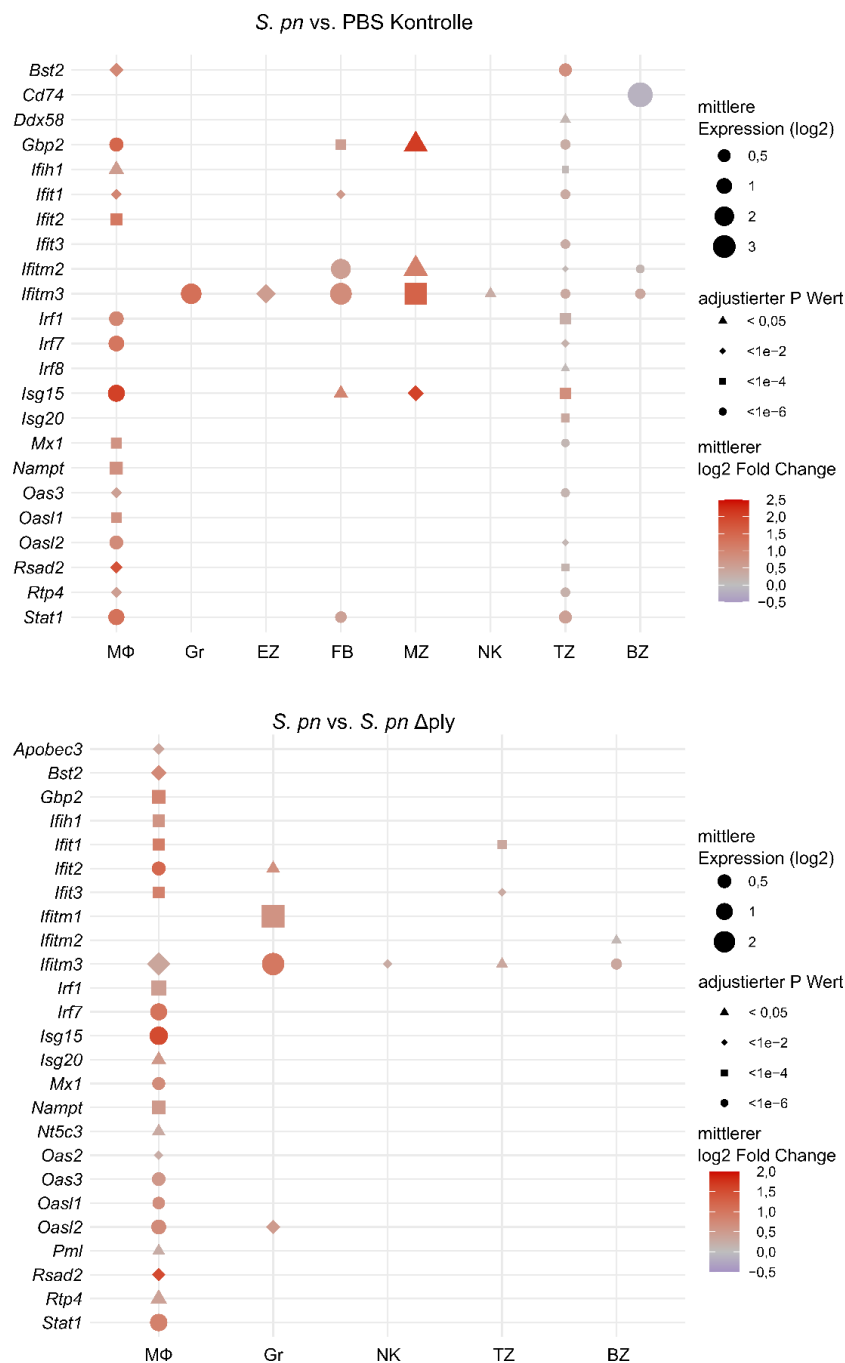
### Abbildung 28: Expressionsmuster von Zytokin-Genen 24 h nach *S. pn* Infektion

*Dotplots* signifikant differenziell exprimierter Zytokin-Genen in den Vergleichen *S. pn*-infizierte Versuchstiere zur PBS Kontrollgruppe und *S. pn*-infizierte Versuchstiere zu *S. pn* Δply-infizierten Versuchstieren. Als signifikant wurden Gene mit *P*-Werten unter 0,05 nach durchgeführter Bonferroni-Korrektur für multiple Tests (adjustierter *P*-Wert) angenommen. Versuchsgruppen: Proben gepoolt: *S. pn*: Infektion mit Pneumokokken des Serotyps 2 (D39 WT, n = 3); *S. pn* Δply: Infektion mit Pneumolysin-defizienter Mutante (D39 Δply, n = 3); PBS Kontrolle: Scheininjektion mit Lösungsmittel (PBS, n = 2). BZ: B-Zellen, FB: Fibroblasten, Gr: Granulozyten, MΦ: interstitielle und inflammatorische Makrophagen, TZ: T-Zellen.

#### 7.4.4. Die Infektion mit *S. pn* führte bei M $\Phi$ zu einer Hochregulierung von Genen des Interferon-Signalwegs.

Bei der Analyse von differenziell exprimierten Genen verschiedener Zelltypen fiel eine signifikante Hochregulierung des Interferon-stimulierten Gens 15 (*Isg15*) auf. Um diese Beobachtung einzuordnen und mögliche Pneumonie-Marker zu untersuchen, wurde die Expression anderer Gene des Interferon I Signalwegs sowie mit dem Interferonsignalweg assoziierter Gene analysiert (Abbildung 29). Im M $\Phi$  Kompartiment war eine Vielzahl dieser Gene nach *S. pn* Infektion im Vergleich zur Kontrollgruppe hochreguliert. Am stärksten traf dies auf *Isg15* (FC: 4,1) zu. Auch das Gen des *Interferon Induced Transmembrane Protein 3* (*Ifitm3*) fiel durch eine Hochregulation in mehreren Zelltypen, in Gr (FC: 2,5), EZ (FC: 1,5), FB (FC: 1,8), MZ (FC: 3) und den Lymphozyten-Populationen auf. Auch im Vergleich zwischen der *S. pn* Versuchsgruppe und der *S. pn*  $\Delta$ ply Versuchsgruppe wurde durch WT Pneumokokken ein ähnliches Muster an Interferon-stimulierten Genen in M $\Phi$  und Gr hochreguliert. Am deutlichsten war dies bei den Genen *Isg15* in M $\Phi$  (FC: 2,9) und *Ifitm3* in Gr (FC: 2) zu erkennen.

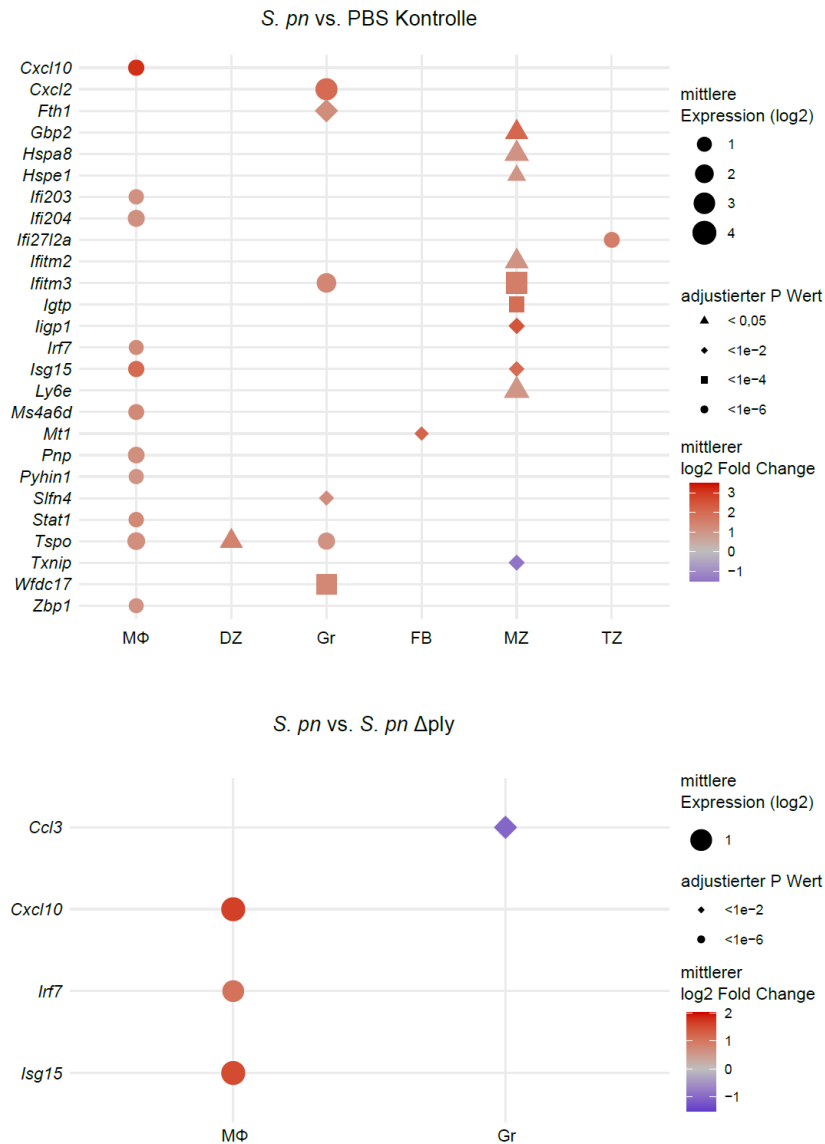
Eine weitere explorative Analyse wurde durchgeführt, um Hinweise auf potenzielle neue Genexpressionsmarker einer akuten bakteriellen Pneumonie zu erhalten. Hierfür wurden Gene analysiert, die im Vergleich zwischen *S. pn*-infizierten Versuchstieren und der PBS Kontrollgruppe mindestens einen Log2 FC von 1 (für hochregulierte Gene, entspricht einem FC von 2) bzw. maximal -1 (für herunterregulierte Gene, entspricht einem FC von 0,5), eine zelltypspezifische Durchschnitts-Expression von 1 (auf der normalisierten log Skala) und Signifikanz ( $P$ -Wert < 0,05) nach angewandter Bonferroni-Korrektur für multiples Testen aufwiesen. Die meisten differenziell exprimierten Gene, die diese Filter erfüllten, wie *Cxcl10*, *Cxcl2*, *Isg15*, wurden bereits in vorherigen Absätzen beschrieben (Abbildung 30). Auffallend waren jedoch das Gen des *Translocator Protein* (*Tspo*) der Dendritischen Zellen mit einem FC von 2,8 und einer durchschnittlichen Expression von 1,8 in der *S. pn* Gruppe, das *WAP Four-Disulfide Core Domain 17* Gen (*Wfdc17*) der Gr (FC: 2,5 und mittlere Expression von 2,9 in der *S. pn*-infizierten Versuchsgruppe) sowie das Vorhandensein einiger signifikant differenziell exprimierter Gene im MZ Kompartiment. Diese oben genannten Kriterien (Log2 FC von 1 bzw. -1 und zelltypspezifische Durchschnitts-Expression von 1) erfüllten im Vergleich zwischen der *S. pn* Versuchsgruppe und der *S. pn*  $\Delta$ ply Versuchsgruppe vier Gene: Die Zytokine *Ccl3* (in Gr) und *Cxcl10* (in M $\Phi$ ) sowie die Interferon-stimulierten-Gene *Irf7* und *Isg15* (in M $\Phi$ ).



### Abbildung 29: Interferon-stimulierte-Gene

*Dotplots* signifikant differenziell exprimierter Interferon-stimulierter-Gene in den Vergleichen *S. pn* infizierte Versuchstiere zur PBS Kontrollgruppe und *S. pn*-infizierte Versuchstiere zu *S. pn* Δply-infizierten Versuchstieren. Als signifikant wurden Gene mit *P*-Werten unter 0,05 nach durchgeführter Bonferroni-Korrektur für multiple Tests (ajustierter *P*-Wert) angenommen. Versuchsgruppen: Proben gepoolt: *S. pn*: Infektion mit Pneumokokken des Serotyps 2 (D39 WT, n = 3); *S. pn* Δply: Infektion mit Pneumolysin-defizienter Mutante (D39 Δply, n = 3); PBS Kontrolle: Scheininjektion mit Lösungsmittel (PBS, n = 2). BZ: B-Zellen, EZ: vaskuläre Endothelzellen, FB: Fibroblasten, Gr: Granulozyten, MZ: *Msln*<sup>+</sup> Mesothelzellen, MΦ: interstitielle und inflammatorische Makrophagen, NK: natürliche Killerzellen, TZ: T-Zellen.

## Ergebnisse



### Abbildung 30: Potenzielle Pneumonie Mediator Gene

*Dotplots* signifikant differenziell exprimierter Gene mit einem Log<sub>2</sub> *Fold Change* von mindestens 1 oder maximal -1 sowie Durchschnitts-Expression von mindestens 1. Dargestellt in den Vergleichen *S. pn*-infizierte Versuchstiere vs. PBS Kontrollgruppe und *S. pn*-infizierte Versuchstiere vs. *S. pn* Δply-infizierte Versuchstiere. Als signifikant wurden Gene mit *P*-Werten unter 0,05 nach durchgeführter Bonferroni-Korrektur für multiple Tests (adjustierter *P*-Wert) angenommen. DZ: Dendritische Zellen, FB: Fibroblasten, Gr: Granulozyten, MZ: *Msln*<sup>+</sup> Mesothelzellen, MΦ: interstitielle und inflammatorische Makrophagen, TZ: T-Zellen. Versuchsgruppen: Proben gepoolt: *S. pn*: Infektion mit Pneumokokken des Serotyps 2 (D39 WT, n = 3); *S. pn* Δply: Infektion mit Pneumolysin-defizienter Mutante (D39 Δply, n = 3); PBS Kontrolle: Scheininfektion mit Lösungsmittel (PBS, n = 2).



#### **7.4.5. Zelluläre Interaktionen scheinen durch inflammatorische Geschehnisse gestört zu werden.**

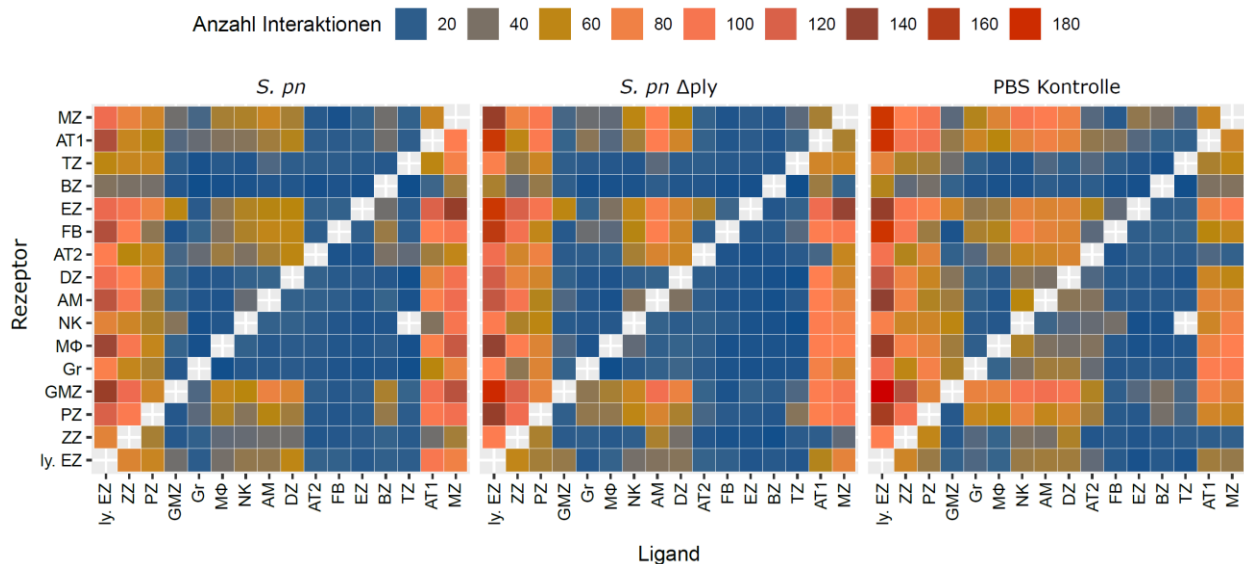
Neben der Analyse von Expressionswerten bzw. deren Gegenüberstellung können Einzelzell-Sequenzierungs-Datensätze auf Muster untersucht und diverse Zusatz-Funktionen angewandt werden. Im Folgenden soll die Möglichkeit Zell-Zell-Interaktionen aufzuzeigen kurz vorgestellt werden. Zahlreiche exprimierte Gene kodieren entweder für Rezeptoren oder Liganden. Werden Analysetools mit diesen biologischen Informationen gespeist, können Algorithmen mögliche Interaktionen zwischen verschiedenen Zelltypen bestimmen. Dabei zählt der Algorithmus eine mögliche Interaktion, wenn in einer Zellpopulation ein Ligand und in einer anderen Zellpopulation ein passender Rezeptor entsprechend einer hinterlegten Referenzdatenbank über einem Schwellenwert exprimiert wird. Eines der verfügbaren Analysetools wurde auf den vorliegenden Datensatz angewandt und das Ergebnis, nach Versuchsgruppen geordnet, als *Heatmap* dargestellt (Abbildung 31). Dabei sind eine hohe Anzahl an Interaktionen in Signalfarben (Rot- und Orangetöne) dargestellt und geringere Interaktionen in dunklen Farben. Auffallend war, dass die Anzahl der Interaktionen in der Mehrheit an Zellpopulationen durch eine stattgefundene Infektion abnahm. Dies war nach *S. pn* Infektion stärker der Fall als nach Infektion mit der Pneumolysin-defizienten Variante. Außerdem schienen zahlenmäßig kleine Zellpopulationen tendenziell stärker zur Interaktion mit anderen Zellpopulationen zu neigen. Dies kann daran liegen, dass in kleineren Zellpopulationen der skalierte Mittelwert aller exprimierten Gene stärker schwanken kann als in großen Zellpopulationen und der Schwellenwert für eine Expression von Liganden bzw. Rezeptoren daher schneller überschritten wird, was zu mehr detektierten Interaktionen führt. Die „fehlende Kachel“ im Muster der *S. pn*-infizierten Versuchsgruppe sowie der Kontrollgruppe kam durch keine einzige errechnete Interaktion zwischen T-Zellen und natürlichen Killerzellen in diesen Versuchsgruppen zustande.

Zur Analyse der zellulären Interaktionen durch Zytokine wurden die berechneten Ligand-Rezeptor-Interaktionen auf jene Gene gefiltert, die Zytokin Rezeptoren oder Liganden kodieren. Es wurde ein Ligand-Rezeptor-Score (LR-Score) für Interaktionen zwischen den Zellpopulationen gebildet und die Scores im Vergleich *S. pn* Versuchsgruppe gegen PBS Kontrollgruppe sowie *S. pn* Versuchsgruppe gegen *S. pn*  $\Delta$ ply Versuchsgruppe verrechnet, um Unterschiede aufzuzeigen (Abbildung 32A und B).

## Ergebnisse

Treten Interaktionen verstärkt in der mit *S. pn*-infizierten Versuchsgruppe auf, sind die zugehörigen Kacheln in Signalfarben dargestellt, wohingegen bläulich gefärbte Kacheln verstärkte Interaktionen in der PBS Kontrollgruppe bzw. der *S. pn*  $\Delta$ ply Infektionsgruppe darstellen. Fehlende Kacheln deuten an, dass keine Interaktionen des jeweiligen Rezeptor-Ligand-Paares gefunden wurden.

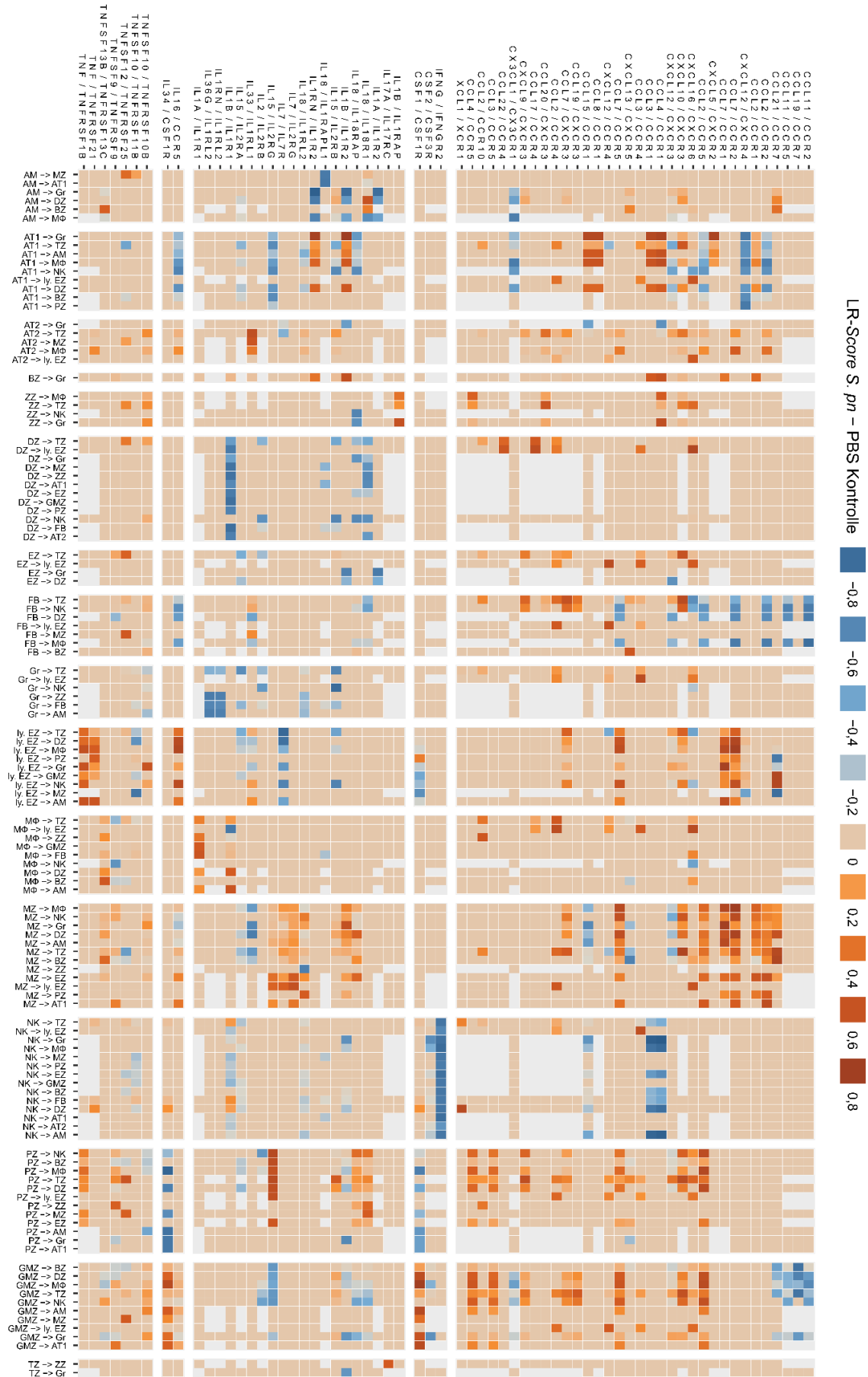
Bei den erhaltenen Mustern zeigten sich vermehrt Zytokin-Interaktionen in der Gruppe der *S. pn* Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Außerdem präsentierte sich eine Zunahme an Interaktionen der Granulozyten, dendritischen Zellen und Alveolar-Makrophagen insbesondere bei Interleukinen in der *S. pn*  $\Delta$ ply Infektionsgruppe gegenüber der *S. pn* Versuchsgruppe (Abbildung 32A und B).



### Abbildung 31: Übersicht von Rezeptor-Ligand-Interaktionen

Heatmaps zur Darstellung von Ligand-Rezeptor-Interaktionen zwischen unterschiedlichen Zelltypen. Die Farbe der Kacheln zeigt die Anzahl an Interaktionen an. Versuchsgruppen: Proben gepoolt: *S. pn*: Infektion mit Pneumokokken des Serotyps 2 (D39 WT, n = 3); *S. pn*  $\Delta$ ply: Infektion mit Pneumolysin-defizienter Mutante (D39  $\Delta$ ply, n = 3); PBS Kontrolle: Scheininfektion mit Lösungsmittel (PBS, n = 2). AM: Alveolarmakrophagen, AT1: Typ I Alveolarepithelzellen, AT2: Typ II Alveolarepithelzellen, BZ: B-Zellen, DZ: Dendritische Zellen, EZ: vaskuläre Endothelzellen, FB: Fibroblasten, GMZ: glatte Muskelzellen, Gr: Granulozyten, ly. EZ: lymphatische Endothelzellen, MZ: *Msln*<sup>+</sup> Mesothelzellen, M $\Phi$ : interstitielle und inflammatorische Makrophagen, NK: natürliche Killerzellen, PZ: Perizyten, TZ: T-Zellen, ZZ: Zilien-tragende Zellen. Diese Abbildung wurden von Dr. rer. nat. Holger Kirsten (IMISE, Universität Leipzig) erstellt, zur Verfügung gestellt und anschließend mit Inkscape nachbearbeitet, um einheitliche Abkürzungen der Zellpopulationen und Versuchsgruppen zu erhalten.

A





**Abbildung 32: Zytokin-abhängige Zell-Zell-Interaktionen**

*Heatmaps* zur Darstellung von Ligand Rezeptor Interaktionen von Zytokin-Genen zwischen unterschiedlichen Zelltypen. Ein Ligand Rezeptor Score (LR-Score) wurde gebildet und zwischen den Versuchsgruppen verrechnet. Die Farbe der Kacheln zeigt die Höhe des Scores als Maß der Interaktionen an. Versuchsgruppen: Proben gepoolt: *S. pn*: Infektion mit Pneumokokken des Serotyps 2 (D39 WT, n = 3); *S. pn*  $\Delta$ ply: Infektion mit Pneumolysin-defizienter Mutante (D39  $\Delta$ ply, n = 3); PBS Kontrolle: Scheininfektion mit Lösungsmittel (PBS, n = 2). AM: Alveolarmakrophagen, AT1: Typ I Alveolarepithelzellen, AT2: Typ II Alveolarepithelzellen, BZ: B-Zellen, DZ: Dendritische Zellen, EZ: vaskuläre Endothelzellen, FB: Fibroblasten, GMZ: glatte Muskelzellen, Gr: Granulozyten, ly. EZ: lymphatische Endothelzellen, MZ: *Msln*<sup>+</sup> Mesothelzellen, M $\Phi$ : interstitielle und inflammatorische Makrophagen, NK: natürliche Killerzellen, PZ: Perizyten, TZ: T-Zellen, ZZ: Zilien-tragende Zellen. Diese Abbildung (A und B) wurde von Dr. rer. nat. Holger Kirsten (IMISE, Universität Leipzig) erstellt, zur Verfügung gestellt und anschließend mit Inkscape nachbearbeitet, um einheitliche Abkürzungen der Zellpopulationen und Versuchsgruppen zu erhalten. Die Gene der Rezeptor-Ligand-Paare sind in der humanen Schreibweise angegeben, da die im Analysetool hinterlegte Referenzdatenbank auf Rezeptor-Ligand-Interaktionen die humane Gennomenklatur anwendet.



## 8. Diskussion

In dieser Arbeit gelang es erfolgreich die heterogenen Zellpopulationen aus murinem Lungengewebe unter Einhaltung erforderlicher Qualitätsstandards zur Durchführung von Einzelzell-Sequenzierungen zu isolieren sowie beispielhafte Analysen der Transkription in der Akutphase der Pneumokokken-Pneumonie auf Einzelzellebene, unter Berücksichtigung der Effekte des Virulenzfaktors Pneumolysin, durchzuführen. Im Gegensatz zu Einzelzell-Transkriptomanalysen von Blut- oder Knochenmarkzellen, bei denen Zellen schnell und schonend vereinzelt werden können, ist bei soliden Organen wie der Lunge die Wahl des Zellisolutionsprotokolls von entscheidender Bedeutung, um aussagekräftige Analysen durchführen zu können. Die Resultate der gesetzten Ziele sollen im Folgenden diskutiert werden.

### 8.1. Anforderungen an ein Einzelzell-Isolutionsprotoll der murinen Lunge

Mit dem in dieser Arbeit demonstrierten pulmonalen Zellisolutionsprotokoll nach Goekeri *et al.* konnten die definierten Voraussetzungen zur Durchführung von Einzelzell-Sequenzierungen am besten umgesetzt werden. Die angestrebten Qualitätsstandards von  $\geq 80\%$  Viabilität und  $\geq 90\%$  Singularität, was einen Kompromiss zwischen schonender Aufreinigung mit hoher Viabilität, aber geringer Diversität, und intensiviertem Lungenverdau mit hoher Diversität, aber schlechterer Viabilität, darstellt, wurden für einen Großteil der untersuchten Zellen erreicht. Auffallend war, dass Zellpopulationen, die nur in geringem Umfang isoliert werden konnten, wie EG, AT1 und ly. EZ, die angestrebten Qualitätsstandards teilweise oder gänzlich nicht erreichten. Bei der authentischen Darstellung von residenten und migrierten Zellpopulationen der Lunge stellt die Heterogenität dieser Zellpopulationen eine Schwierigkeit dar. Fest im Bindegewebe verankerte Zellen benötigen spezialisiertere Protokolle zur Freisetzung als solche mit der Fähigkeit zu migrieren. Deutlich wurde dies vor allem an dem Anteil der Endothelzellen in der Einzelzell-Suspension, welche nur bei dem Protokoll nach Goekeri *et al.* in ausreichendem Maße isoliert werden konnten. In der durchflusszytometrischen Messung der Zellsuspensionen dieses Protokolls zeigte sich, dass nicht alle lebenden Zellen den Endothelzellen, Epithelzellen oder Leukozyten zugeordnet werden konnten (über die Versuchsgruppen gemittelt ca. 19,6%), was einen relevanten Anteil an mesenchymalen Gewebezellen vermuten ließ. Eine mögliche Erklärung für die höhere Rate an Endothelzellen in der Einzelzell-Suspension

sion des Protokolls nach Goekeri *et al.* ist das bereits bei der Durchführung der pulmonalvaskulären Lavage eingebrachte Enzym Dispase. Durch die Spülung des kleinen Kreislaufs vom rechten Herzen aus konnte das Gefäßsystem der Lunge von luminaler Seite mit der Protease benetzt werden. In der Publikation von Raredon *et al.* wurde für die Zellisolation aus Nagetierlungen ein ähnlicher Ansatz mit dem Einbringen einer Enzymlösung über das Gefäßsystem gewählt [115].

Eine bekannte Schwachstelle der Einzelzell-Sequenzierung betrifft Zellen mit niedrigem RNA Gehalt, insbesondere neutrophile Granulozyten, die zusätzlich hohe RNase Konzentrationen aufweisen, bei bakteriellen Infektionen allerdings relevant für das Verständnis der inflammatorischen Geschehnisse sind. In den vorliegenden Ergebnissen konnten kaum Unterschiede zwischen durchflusszytometrisch und durch Sc-RNA-Seq gemessenen Zellfrequenzen festgestellt werden. Insbesondere der zu erwartende höhere Anteil an Granulozyten in den infizierten Versuchsgruppen konnte unabhängig von der Messmethode dargestellt werden [75]. Dies könnte daran gelegen haben, dass die isolierten Zellen direkt dem Sc-RNA-Seq Prozess zugeführt wurden, was auch vom Hersteller empfohlen wird [112].

Trotz hinreichender Diversität isolierter Lungen-Zellpopulationen in einem Ausmaß, das valide Analysen ermöglicht, muss die Authentizität der Einzelzell-Suspension kritisch betrachtet werden. Die erhaltene Einzelzell-Suspension der scheininfizierten Versuchsgruppe enthielt mit ca 70 % zum überwiegenden Teil Leukozyten, was einen Zellisolations-Bias zugunsten von hämatopoetischen Zellen vermuten lässt [92]. In der *Supplementary Table 1* der Veröffentlichung von Travaglini *et al.* wurden Zellfrequenzen zur Abschätzung der physiologischen Zelllandschaft der humanen Lunge aus Publikationen zusammengetragen und berechnet [144, 165]. Am stärksten unterscheiden sich Leukozyten-Populationen, insbesondere die der Lymphozyten von den Angaben der Literatur. So wurde der Anteil an B-Zellen von Travaglini *et al.* mit 0,5 % angegeben, in der scheininfizierten Versuchsgruppe belief sich der Anteil auf ca. 26,9 %. Auch T-Zellen und NK waren in dieser Versuchsgruppe mit ca. 27,6 % bzw. 4,6 % deutlich gegenüber der Literatur von 4,1 % bzw. 1 % überrepräsentiert. Granulozyten waren wie zu vermuten besonders in den infizierten Gruppen deutlich erhöht (ca. 11 % bis 14 %), in der Kontrollgruppe mit 2,6 %, allerdings auch im Vergleich mit 1,1 % laut Literatur leicht erhöht. Im Gegensatz dazu wurden einige Zelltypen nicht hämatopoetischen Ursprungs in der Zellsuspension unterrepräsentiert. Dies traf in besonderem Maße auf Typ I



Alveolarepithelzellen zu: 0,7 % im Gegensatz zu 13 % in der Literatur. Auch Endothelzellen und Fibroblasten waren mit 9,0 % bzw. 9,2 % im Vergleich zu 25,7 % bzw. 21 % vermindert abgebildet. Makrophagen, dendritische Zellen, glatte Muskelzellen und Typ II Alveolarepithelzellen konnten in ähnlichem Umfang wie in der Literatur angegeben isoliert werden [144, 165]. Diese Vergleiche können allerdings nur einer groben Einschätzung dienen, da hierbei humane Lungenstrukturen mit denen von Mäusen verglichen wurden. Da die inflammatorischen Geschehnisse in den infizierten Versuchsgruppen zur Migration von Leukozyten in die Lunge führen und so die zellulären Landschaften verändern wurden diese Versuchsgruppen nicht in diesen Vergleich miteinbezogen.

Problematisch angesehen werden kann das Vorhandensein der zwei proliferierenden T-Zellclustern, die hauptsächlich in der scheininfizierten Kontrollgruppe beobachtet wurden. Da doppelt positive T-Zellen, in diesem Fall solche, die *Cd4* und *Cd8a* exprimieren, physiologisch nicht in der Lunge vorkommen, könnte es sich um eine Verunreinigung mit Gewebe aus dem Thymus handeln. Diese Theorie würde das andere Cluster mit *Cd8a* und *Mki67* exprimierenden T-Zellen als einfach positive unreife T-Zellen, die ebenfalls im Thymus vorkommen, erklären [166]. Da in einer kürzlich erschienenen Publikation von Winkels *et al.* jedoch doppelt positive T-Zellen unter anderem im mediastinalen Fettgewebe mittels Sc-RNA-Seq gefunden wurden, kann der Ursprungsort dieser Zellen nicht abschließend geklärt werden. In der angesprochenen Publikation wurde über einen möglichen Beitrag doppelt positiver T-Zellen zur Gewebehomöostase, insbesondere der Aorta und Wundheilung spekuliert [167].

Generell konnte in den Etablierungsversuchen beobachtet werden, dass die längere Versuchszeit zwischen der Organentnahme und der fertigen Zellsuspension negativen Einfluss auf die Viabilität nimmt. Dies benachteiligt das Protokoll von Nakano *et al.*, welches eine Abfolge von intuitiven, allerdings auch zeitintensiven Versuchsschritten aufweist [128]. Dies sollte auch für zusätzliche Zell-Aufreinigungsschritte mittels FACS oder MACS kritisch abgewogen werden. Durchflusszytometrische Zellsortierungen erfreuen sich großer Beliebtheit, um gewünschte Populationen mit hohem Reinheitsgrad oder schwierig zugängliche Zellen in relevantem Ausmaß zu erhalten, was jedoch mit einer zusätzlichen Verlängerung der Versuchszeit einhergeht [168]. Zur Steigerung der Viabilität der pulmonalen Epithelzellen wurde eine magnetische Zell-Aufreinigung mittels MACS *Dead Cell Removal Kit* (Miltenyi Biotec GmbH) gewählt, welche mit ca. 30 min zusätzlicher Versuchszeit eine Zeitersparnis gegenüber der durchflusszytometrischen Methode bietet.

Ein anderes System „EasySep™ *Dead Cell Removal Kit*“ (Stemcell Technologies) verspricht eine magnetische Zell-Aufreinigung deutlich schneller durchzuführen und könnte entscheidende Vorteile für zukünftige Einzelzell-Sequenzierungs-Experimente liefern<sup>f</sup>. Limitationen der Zellsortierung sind, neben einer Verlängerung der Präparationszeit und damit erhöhtem Zellstress, der potenzielle Verlust von Zellen, was insbesondere bei der Suche bislang unbekannter Phänotypen problematisch sein kann [169].

Die Anforderung, einen validen Arbeitsablauf zur Einzelzell-Sequenzierung in Infektionsmodellen der Lunge zu etablieren, konnte erfüllt werden. Zum Zeitpunkt der Sequenzierung (Herbst 2019) waren noch keine Infektionsmodelle der Lunge mit der Methode der Einzelzell-Sequenzierung veröffentlicht worden. Durch die anhaltende COVID-19-Pandemie und den Bedarf an explorativer Forschung, insbesondere zur Auswirkung des Virus auf Zellen der Atemwege und des Bluts, stieg die Zahl der veröffentlichten Publikationen dieser Methode in COVID-19-Modellen rasant an. Die gewonnenen Erkenntnisse dieser Arbeit konnten direkt für Studien, welche unter anderem die Immunreaktionen bei unterschiedlichen COVID-19-Schweregraden in SARS-CoV-2-infizierten Hamstern untersuchten, verwendet werden [129, 170-173].

### **8.2. Wahrung der Aussagekraft des Transkriptoms**

Eine essenzielle Herausforderung der Einzelzell-Sequenzierungsanalysen stellt die Minimierung einer Zellstressreaktion der Zellen und der damit verbundenen Überexpression von zellstressassoziierten Genen dar. Ein Ansatz zur Eindämmung dieser Überexpression ist neben der schonenden Gewebeverarbeitung der Zusatz spezieller Substanzen zur Inhibition einer Neuexpression an Genen. Diese sollen das Expressionsmuster möglichst zu Beginn der Präparation auf natürlichem Niveau „einfrieren“, um so die Authentizität der Genexpression trotz nachfolgender mechanischer und enzymatischer Verdauung zu erhalten. Von mehreren in der Literatur beschriebenen Möglichkeiten wurde der Zusatz des Zytostatikums Actinomycin D gewählt, welches die RNA-Synthese durch Bindung an der DNA hemmt [93, 94, 174].

Ein anderer Ansatz, den Zellstress der Isolation zu minimieren, ist die Modifizierung des enzymatischen Organverdaus. Beispielsweise wurde in der Literatur die Möglichkeit beschrieben, anstelle von Enzymen mit Aktivität bei 37 °C einen kalten Proteaseverdau zu

---

<sup>f</sup> Handbuch des Herstellers:  
[https://cdn.stemcell.com/media/files/pis/10000000718-PIS\\_01.pdf](https://cdn.stemcell.com/media/files/pis/10000000718-PIS_01.pdf), letzter Zugriff: 31.10.2021, 16:55

verwenden. So konnte die Expression an Zellstressgenen nach Isolation aus murinem Nierengewebe deutlich gesenkt werden [92]. An die genannte Studie angelehnte Versuche unseres Instituts, lebende Zellen aus murinem Lungengewebe mittels kaltem Verdau zu isolieren, konnten allerdings zum aktuellen Zeitpunkt noch keine dem klassischen Verdau gleichwertige oder ähnliche Ergebnisse liefern. Die in den Experimenten dieser Dissertation durchgeführte Zugabe von Actinomycin D als RNA Synthese Inhibitor konnte das Ziel der Verhinderung einer Überexpression an Zellstress-Genen weitgehend erfüllen. Da allerdings in allen Versuchsgruppen dieses Experiments Actinomycin D eingesetzt wurde, kann an dieser Stelle keine Aussage über die direkte Wirksamkeit zur Verhinderung von *De-Novo* Transkription gemacht werden. Die Wirkung von Actinomycin D auf das Zelltranskriptom konnte jedoch im Supplement der Publikation von Sunkara *et al.* anhand einer behandelten und einer nicht behandelten Chondrozyten Gruppe gezeigt werden [94]. Durch die sich stetig erhöhende Anzahl an öffentlich zugänglichen Einzelzell-Sequenzierungs-Datensätzen könnte in naher Zukunft eine genauere Beurteilung von Actinomycin D als *De-Novo* Transkriptioninhibitor bei pulmonalen Zellen stattfinden.

### 8.3. Einordnung inflammatorischer Geschehnisse auf Expressionsebene

Dass inflammatorische Geschehnisse in der Lunge sich auf Struktur- und Gewebezellen auswirken und fallabhängig zu fibrotischem Umbau führen können, ist bereits bekannt [175]. In dieser Arbeit konnte am Beispiel der Fibroblasten-Population aufgezeigt werden, in welchem großem Umfang Strukturzellen auf Infektionen reagieren. Einige der angesprochenen Gene wurden bereits in Publikationen mit anderen Methoden beschrieben. Ein Beispiel ist das Gen *Lcn2*, dessen erhöhte Expression in der exemplarischen Analyse des Fibroblasten Kompartiments gezeigt wurde. *Lcn2*-Werte wurden auch beim Menschen während einer bakteriellen Pneumonie als stark erhöht beschrieben und als verantwortlich für die Deaktivierung von AM ausgemacht. Ebenfalls gezeigt wurde, dass *Lcn2* *-/- Knockout*-Mäuse eine verbesserte antibakterielle Reaktion aufweisen [176]. *Lcn2* fiel auch in den AT2-Zellen mit einem FC von 5,2 auf, wurde nach angewandter Bonferroni-Korrektur allerdings als nicht signifikant klassifiziert.

*Gsn* wird, ebenfalls in der Fibroblastenpopulation, signifikant schwächer exprimiert als nach *S. pn* Infektion. In der Literatur wurde eine erhöhte Durchlässigkeit der alveolokapillären Barriere bei fehlendem *Gsn* beschrieben, gemessen durch eine erhöhte Proteinkonzentration in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit. [177]. Erhöhte Proteinmengen

## Diskussion

in einer bronchoalveolären Lavage sind auch bei schwerer Pneumonie im Mausmodell zu beobachten [178]. Die Autoren Becker *et al.* vermuten, dass *Gsn* wesentlich zur Aufrechterhaltung der alveolokapillären Barriere beiträgt [177]. *Cxcl2* spielt eine wichtige Rolle in der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten [179]. Wie der in dieser Arbeit erhobene Datensatz vermuten lässt und in der Literatur beschrieben, produzieren neutrophile Granulozyten nach *S. pn* Stimulation CXCL2 und erhöhen somit weiter den Einstrom. [180].

Auffallend in der differentiellen Expression der verschiedenen Versuchsgruppen war, dass sich das Transkriptom nach Infektion mit Pneumolysin-defizienter *S. pn* Mutante nur in wenigen Zellpopulationen signifikant von dem nach WT *S. pn* Infektion unterschied.

Insbesondere zeigte sich eine vermehrte Expression der Zytokin-Gene *Ccl3*, *Cxcl3* und *Il1rn* sowie des Inflammasom-Gens *Nlrp3* in der Granulozyten-Population der *S. pn*  $\Delta$ ply Versuchsgruppe. Es wurde beschrieben, dass durch Pneumolysin über die Freisetzung von Mikrovesikeln die Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen, wichtig für die Infektabwehr, reduziert wird [181]. Eine Reduktion der Zytokin-Transkription wurde allerdings nicht beschrieben. Im Gegenteil wurde eine gesteigerte Zytokin Freisetzung und die Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms in der Literatur beschrieben [182]. In frühen Publikationen wurde jedoch gezeigt, dass Pneumolysin den Oxidativen Burst sowie die Fähigkeit zur Chemotaxis in polymorphkernigen Leukozyten hemmt [183]. Da in dieser Arbeit diese Beobachtungen jedoch nur in Granulozyten gemacht wurden, welche aufgrund des geringen RNA Gehalts nur eingeschränkt aussagekräftig für Transkriptomanalysen sind, wäre eine Validierung durch alternative Methoden zur Einordnung nötig.

In den letzten Jahren mehren sich die Veröffentlichungen zum Einfluss von Interferonen und interferonabhängigen Mediatoren bei bakteriellen Infekten. In dem Datensatz dieser Arbeit konnte ebenfalls ein Einfluss dieser Mediatoren, die ursprünglich für ihre antivirale Bedeutung bekannt waren, gezeigt werden [184]. Insbesondere im M $\Phi$  Kompartiment konnte eine Mehrexpression interferonabhängiger Gene gezeigt werden. Der Vergleich zwischen *S. pn* und *S. pn*  $\Delta$ ply Versuchsgruppe lässt auf eine Abhängigkeit der interferonabhängigen Geneexpression vom Virulenzfaktor Pneumolysin schließen. Eine ähnliche Schlussfolgerung wurde bereits 2012 von Koppe *et al.* publiziert [185]. In einer Studie von Strehlitz *et al.* zur Identifizierung von Biomarkern, die eine Unterscheidung zwischen einer Pneumonie durch *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pneumoniae* ermöglichen sollten, wurde *Cxcl10* zusammen mit *Cxcl9* als erfolgreicher Kandidat benannt.

Wie auch im Datensatz dieser Arbeit wurden nach *S. pn* Infektion die interferonabhängigen Gene *Mx1* und *Rsad2* als verstärkt exprimiert beschrieben [186]. Auch *Cxcl9* weist bei MΦ im vorliegenden Datensatz im Vergleich *S. pn* gegen PBS Kontrollgruppe einen FC von 5,8 und *P*-Wert von  $2,1 \times 10^{-6}$  auf, wird nach durchgeführter Bonferroni-Korrektur allerdings als nicht signifikant geführt.

Unter den im Ergebnisteil dargestellten Gene mit beobachteter Verbindung zur bakteriellen Pneumonie wurden auch neue, noch nicht in der Fachliteratur beschriebene Gene gefunden. Diese sind größtenteils ebenfalls plausibel, da sie z. B. in der online zugänglichen Harmonizome-Datenbank unter der Kategorie *Pneumonia*, einem Set aus 2245 Genen oder Proteinen in Zusammenhang mit Pneumonie, vermerkt sind [187].

#### 8.4. Limitationen

Die vorliegende Dissertation weist einige Limitationen auf. Beispielsweise fällt die relativ geringe Anzahl an Versuchstieren bzw. der Umstand, dass die Versuchstiere einer Gruppe gepoolt und nicht einzeln der Einzelzell-Sequenzierung zugeführt wurden, auf. Dieses Vorgehen ist vorrangig mit den außergewöhnlich hohen Kosten des Verfahrens zu erklären. Der Ansatz, Versuchsgruppen vor der Erstellung einer Genexpressionsbibliothek zu poolen, um Kosten zu sparen, wurde bereits für die DNA-Chip-Technologie (engl.: *Microarray*) sowie RNA-Seq angewandt und evaluiert [188]. Neuere Versuchskits beispielsweise des Herstellers 10x Genomics oder der Firma Biolegend ermöglichen es, Versuchsproben an der Zelloberfläche mit Markierungen zu versehen, bevor diese gepoolt werden, und nach der Sequenzierung wieder zu unterscheiden [189]. So kann trotz Poolens eine individuelle Zuordnung der Proben ermöglicht werden [190]. Ein positiver Nebeneffekt des Lipidanker basierten Multiplex Kit des Herstellers 10x Genomics ist, dass die Beladung des Chips auf bis zu 49.500 gepoolte Zellen gesteigert werden kann<sup>9</sup>. Erste Erfahrungen unserer Arbeitsgruppe mit diesem Kit erscheinen äußerst vielversprechend [171].

Um die Aussagekraft der in dieser Dissertation verwendeten gepoolten Proben auf hohem Niveau zu halten, wurde entschieden, strenge statistische Korrekturverfahren bei

---

<sup>9</sup> Handbuch des Herstellers:  
[https://assets.ctfassets.net/an68im79xiti/7KPpQNrqSsAeS-GYDr6Xeub/06fa19442477db836fde8928c89d5dda/CG000383\\_TechNote\\_ChromiumNextGEMSingle\\_Cell\\_3\\_\\_\\_v3.1\\_CellMultiplexing\\_Rev\\_A.pdf](https://assets.ctfassets.net/an68im79xiti/7KPpQNrqSsAeS-GYDr6Xeub/06fa19442477db836fde8928c89d5dda/CG000383_TechNote_ChromiumNextGEMSingle_Cell_3___v3.1_CellMultiplexing_Rev_A.pdf), letzter Zugriff: 03.11.2021, 13:03

## Diskussion

Vergleichen der Versuchsgruppen anzuwenden. Die Korrektur nach Bonferroni für multiple Testungen wird als konservatives Verfahren beschrieben, was sich auch in diesem Datensatz an dem deutlichen Unterschied der zwischen der Zahl der nominal signifikanten und der nach Bonferroni-Korrektur verbleibenden signifikant unterschiedlich exprimierten Genen zeigt [191]. Dennoch wurden selbst nach Korrektur noch eine große Zahl an differenziell exprimierten Genen detektiert, von denen viele im Infektionskontext eine hohe Relevanz haben.

Obwohl sich die Methodik der Einzelzell-Sequenzierung aktuell großer Beliebtheit erfreut, weist auch diese Limitationen auf. So sind beispielsweise das nicht supervidierte *clustering* und die Anwendung diverser Dimensionsreduktionsverfahren mit der Einschränkung verbunden, dass die erhaltene *Cluster*-Darstellung nicht zu 100 % den biologischen Zellpopulationen entspricht. In den letzten zwei Jahren wurden viele Erweiterungspakete entwickelt, um die Situation zu verbessern, im Falle dieser Arbeit wurde auf das R-Paket Harmony zurückgegriffen, was Verzerrungen durch technische Artefakte, wie die Analyse in verschiedenen Chargen, minimiert [136].

Eine weitere Limitation betrifft die Einzelzell-Suspension, die zu einem gewissen Grad geplatze Zellen enthält, deren mRNA-Moleküle frei in der Einzelzell-Suspension vorliegen und mit in die GEM gelangen können. Dies resultiert in der vermeintlichen Expression von ungewöhnlichen Genen in diversen Zellen, man spricht hierbei von Umgebungs-RNA (engl.: *ambient RNA*). Erkenntnisse, die sich auf Gene mit geringer Expressionsstärke stützen, sollten daher, unabhängig von anderen Faktoren wie *P*-Wert und *Fold Change*, kritisch analysiert werden. In diesem Datensatz zeigt sich eine unkorrekte Genexpression aufgrund von Umgebungs-RNA bei den Expressionswerten des Surfactant-Protein-C (*Sftpc*) Gens, das ausschließlich von AT2 exprimiert werden sollte [192]. *Sftpc* erscheint beispielsweise in der differenziellen Expressionsanalyse bei Endothelzellen als signifikant unterschiedlich exprimiert (FC: 1,5; adjustierter *P*-Wert: 0,0049). Auch in anderen Zelltypen ist eine geringgradige „*Expression*“ dieses Gens zu erkennen, was auch als „Hintergrundrauschen“ bezeichnet wird. In diesem Fall ist zu erkennen, dass jene Zellen, die außerhalb des AT2-Kompartiments liegen und positiv auf *Sftpc* sind, mehrheitlich auf der ersten bis dritten Linie an Zellen eines *Violin Plots* liegen. Lässt man sich die gezählten mRNA-Moleküle dieses Gens anzeigen, wird deutlich, dass diese Zellen nur ein, zwei oder drei RNA-Moleküle dieses Gens aufweisen. Im Vergleich dazu sind es im AT2 Kompartiment zwischen 55 und 5607 Kopien des *Sftpc* Gens pro Zelle. Die mittlere Expressionsstärke beträgt in der AT2-Population 6,8, in allen anderen Populationen unter 0,5. Die

verzerrte Darstellung ist dem logarithmischen Charakter der Expressionsstärke geschuldet. Möglichkeiten zur Reduktion der Umgebungs-RNA versprechen die R-Pakete SoupX oder DecontX, welche allerdings bei diesem Datensatz nicht angewandt wurden [193, 194]. In diesem Zusammenhang stellt die begrenzte Sequenziertiefe pro Zelle eine grundlegende Limitation von Tröpfchen-basierten Hochdurchsatz Sc-RNA-Seq Systemen (wie dem hier verwendeten von 10x Genomics) dar, die generell die Detektion sehr niedrig exprimierter RNA-Transkripte ausschließt. Eine Möglichkeit, dies zu berücksichtigen, wäre beispielsweise die Kombination mit SmartSeq2-basierten Sc-RNASeq Systemen, wie in der Publikation von Travaglini *et al.* beschrieben [144].

Auch die relativ geringe Anzahl an Zellen, die je Probe bei der Einzelzell-Sequenzierung analysiert werden kann, verglichen beispielsweise mit der Durchflusszytometrie, stellt eine Einschränkung dar. Zur Zeit der Durchführung beschriebener Experimente lag diese bei 10.000 Zellen je Probe abzüglich 7,6 % erwarteter Multipletten. Seltene Zelltypen der Lunge, wie beispielsweise die von Montoro *et al.* 2018 entdeckten Ionozyten, machen allerdings nur weniger als 1 % der Zellen der Lunge aus [40]. Im Falle der Ionozyten sind es laut Travaglini *et al.* weniger als 1 % der Epithelzellen. Bezug nehmend darauf entspricht das 0,03 % der Lungen Zellen [144]. So ist es selbst mit einer optimalen Authentizität der Einzelzell-Suspension und hundertprozentiger Viabilität und Singularität äußerst unwahrscheinlich, eine ausreichende Anzahl an Zellen seltener Populationen für eine fundierte Analyse zu erhalten. Auch die Steigerung auf 30.000 Zellen je Probe (abzüglich 24 % erwarteter Multipletten) durch das neu eingeführte Multiplex Kit (10x Genomics) ändert die Situation nicht grundlegend. Einen sehr innovativen Ansatz zur Lösung dieses Problems haben Baccin *et al.* 2020 in ihrer Publikation beschrieben [195]. Dieser besteht darin, nach Sequenzierung einer Einzelzell-Suspension die größten Zellpopulationen zu bestimmen und in einem weiteren Schritt einer Einzelzell-Suspension desselben Organs diese Zellpopulationen zu entfernen. Durch die Abreicherung bekannter Zelltypen sollen unbekannte und seltene Zellen erhalten bleiben und nach mehreren Durchgängen des Prozederes in ausreichend großer Anzahl zur Verfügung stehen.

## 8.5. Ausblick

Zusammenfassend konnten die festgelegten Ziele des Projekts erreicht werden. Die Implementierung eines geeigneten Zellisolationsprotokolls zur Einzelzell-Sequenzierung infektiologischer Versuchsproben wurde bereits mehrfach für Folgeprojekte genutzt und

der Umfang an analysierten Zellen erheblich gesteigert. Insbesondere in der COVID-19 Forschung, in der ungewöhnliche Tiermodelle wie Hamster, Frettchen und Primaten eine entscheidende Rolle spielen, erfreut sich die Einzelzell-Sequenzierung als Methodik großer Beliebtheit [196-200]. Dies liegt einerseits an dem großen Umfang an generierten Daten pro Experiment, die sich gut für explorative Studien eignen und andererseits an der Anwendbarkeit der Methodik für Zellen von Menschen als auch von sämtlichen Versuchstierspezies. Gegenüber antikörperbasierten Analysemethoden, die speziesspezifisch sind, stellt dies einen Vorteil dar, weil hier die Verfügbarkeit für nicht humane oder nicht murine Zellen nicht immer gegeben ist. Die gewonnenen Erkenntnisse dieser Arbeit werden aktuell genutzt, um in Hamstermodellen unterschiedlich schwere COVID-19 Verläufe zu untersuchen und Therapie sowie Impfoptionen zu testen. So konnte bereits der Verlauf einer moderaten COVID-19 Infektion in Goldhamstern über 14 Tage bis zur Genesung, die protektiven Effekte von Dexamethason und monoklonalen Antikörpern bei schweren COVID-19 Verläufen in Zwerghamstern, und eine Evaluation unterschiedlicher Impfschemata und Präparate in Goldhamstern gezeigt werden [170, 171, 173].

Durch immer neue Erweiterungen und Verbesserungen der Einzelzell-Sequenzierung würden weiterführende Transkriptomanalysen eines Pneumokokkeninfektionsmodells die Menge an biologisch relevanten Informationen erheblich steigern. Die Möglichkeit, verschiedene Technologien mit Einzelzellauflösung im selben Experiment zu einem multimodalen Ansatz zu kombinieren, wurde als *Single-cell multimodal omics* zur *Nature Method of the year 2019* gekürt [201]. Eine dieser Erweiterungen stellt die *Feature Barcode Technology* dar, die zusätzlich zu den mRNA-Molekülen die Oberflächenproteine einzelner Zellen markiert und so die Zellzuordnung erheblich erleichtert. Ein, auch auf diese Arbeit bezogenes relevantes Beispiel stellt die Einteilung der T-Zellen dar, die klassischerweise in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen unterteilt werden. Die Gene dieser Oberflächenmarker werden zwar auch exprimiert, allerdings gruppieren sich T-Zellen im UMAP-Verfahren eher nach Aktivierungsstatus [202]. Durch eine zusätzliche Markierung mit Oberflächenmarkern kann diese Einteilung sowie die präzise Zuordnung in Subfamilien weitere relevante Informationen über die Abläufe immunologischer Prozesse liefern. Eine der Limitationen dieser Arbeit stellt die Unterrepräsentation von Gewebezellen dar, was zukünftig über *Single-Nucleus-RNA-Sequencing* gelöst werden könnte. Da diese Methode allerdings wiederherum Gewebezellen gegenüber Leukozyten besser abbildet, wäre insbesondere für infektiologische Versuche die Kombination beider Ansätze relevant [203, 204]. Eine Limitation der weitverbreiteten Methoden zur Transkriptomanalyse



stellt die fehlende räumliche Einordnung analysierter Zellen dar. Bei suspensionsbasierten Ausgangsproben kann kein Rückschluss auf den Ursprungsort der Zelle innerhalb des Organs gezogen werden. Einen vielversprechenden Lösungsansatz stellt das *spatial transcriptomics* Konzept dar, das klassische Histologie mit *Next Generation Sequencing* Methoden kombiniert. Aus einem 6,5 x 6,5 mm Organschnitt wird eine Karte der Genexpression auf einer hochauflösenden mikroskopischen Aufnahme erstellt, was die Möglichkeit der Analyse von Genexpressionen nach Region eröffnet [205]. Dies schließt zusätzlich den Vorteil mit ein, authentische Abbilder der vertretenen Zelltypen zu erhalten und nicht primär solche, die sich einfach isolieren lassen. Zum Erhalt qualitativ hochwertiger Ergebnisse ist die Kombination aus klassischer Einzelzell-Sequenzierung sowie der räumlichen Einordnung dieser durch das *spatial transcriptomics* Konzept eine vielversprechende Möglichkeit, die bereits Anwendung findet [195]. In Bezug auf die vorliegende Arbeit wären insbesondere *spatial transcriptomics* Analysen von besonders relevanten Lungenabschnitten wie der alveolokapillären Barriere von großem Interesse. Auch die Möglichkeiten verfügbarer Analysetools in R oder Python wachsen stetig und durch zahlreiche veröffentlichte Anleitungen und *Guidelines* wird die Möglichkeit, erste Erfahrungen im Bereich der Datenanalyse von Transkriptomdaten zu sammeln, zunehmend niederschwelliger. Dies könnte zusammen mit der zunehmenden Verfügbarkeit öffentlich zugänglicher Datensätze dazu führen, dass zukünftig eigene Datensätze direkt mit vorhandenen abgeglichen und validiert werden können. Die durch technische Erweiterungen und innovative Ansätze rasant wachsenden Möglichkeiten, Informationen auf Einzelzellebene zu sammeln und auszuwerten, könnte insbesondere in komplexen Organen wie der Lunge zu einem tieferen Verständnis zahlreicher pathophysiologischer Prozesse führen und mögliche Optionen für therapeutische Interventionen aufzeigen.



## 9. Literaturverzeichnis

1. Musher DM, Abers MS, Bartlett JG. Evolving Understanding of the Causes of Pneumonia in Adults, With Special Attention to the Role of Pneumococcus. *Clin Infect Dis*. 2017;65(10):1736-44. doi:10.1093/cid/cix549.
2. Hisatomi K, Ishii H, Hashiguchi K, Seki M, Ide M, Sugiyama K, Ishimoto H, Nakayama S, Mukae H, Kohno S. Interstitial pneumonia caused by inhalation of fumes of nickel and chrome. *Respirology*. 2006;11(6):814-7. doi:10.1111/j.1440-1843.2006.00926.x.
3. WHO. Global Health Estimates 2020: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2019. Geneva: World Health Organization; 2020. <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghle-leading-causes-of-death/> Accessed October 31, 2021.
4. WHO. Pneumonia [Fact sheet]. World Health Organization; 2019. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/pneumonia/> Accessed October 31, 2021.
5. Bartlett JG, Breiman RF, Mandell LA, File TM, Jr. Community-acquired pneumonia in adults: guidelines for management. The Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 1998;26(4):811-38. doi:10.1086/513953.
6. Ewig S, Kolditz M, Pletz M, Altiner A, Albrich W, Droemann D, Flick H, Gatermann S, Krüger S, Nehls W, Panning M, Rademacher J, Rohde G, Rupp J, Schaaf B, Heppner HJ, Krause R, Ott S, Welte T, Witzenrath M. S3-Leitlinie zu Behandlung von erwachsenen Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie – Update 2021. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF). AWMF-Register-Nr. 020-020; 2021. [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/020-020l\\_S3\\_Behandlung-von-erwachsenen-Patienten-mit-ambulant-erworbener-Pneumonie\\_2021-05.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/020-020l_S3_Behandlung-von-erwachsenen-Patienten-mit-ambulant-erworbener-Pneumonie_2021-05.pdf) Accessed October 31, 2021.
7. Niederman MS. Hospital-acquired pneumonia, health care-associated pneumonia, ventilator-associated pneumonia, and ventilator-associated tracheobronchitis: definitions and challenges in trial design. *Clin Infect Dis*. 2010;51 Suppl 1:S12-7. doi:10.1086/653035.

8. Schnoor M, Hedicke J, Dalhoff K, Raspe H, Schafer T, group Cs. Approaches to estimate the population-based incidence of community acquired pneumonia. *J Infect.* 2007;55(3):233-9. doi:10.1016/j.jinf.2007.04.355.
9. Suttorp N, Welte T, Marre R, Stenger S, Pletz M, Rupp J, Schutte H, Rohde G, Studiengruppe C. [CAPNETZ. The competence network for community-acquired pneumonia (CAP)]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 2016;59(4):475-81. doi:10.1007/s00103-016-2318-7.
10. Ewig S, Birkner N, Strauss R, Schaefer E, Pauletzki J, Bischoff H, Schraeder P, Welte T, Hoeffken G. New perspectives on community-acquired pneumonia in 388 406 patients. Results from a nationwide mandatory performance measurement programme in healthcare quality. *Thorax.* 2009;64(12):1062-9. doi:10.1136/thx.2008.109785.
11. Konig R, Cao X, Oswald M, Forstner C, Rohde G, Rupp J, Witzenrath M, Welte T, Kolditz M, Pletz M, group Cs. Macrolide combination therapy for patients hospitalised with community-acquired pneumonia? An individualised approach supported by machine learning. *Eur Respir J.* 2019;54(6). doi:10.1183/13993003.00824-2019.
12. Welte T, Torres A, Nathwani D. Clinical and economic burden of community-acquired pneumonia among adults in Europe. *Thorax.* 2012;67(1):71-9. doi:10.1136/thx.2009.129502.
13. Olasupo O, Xiao H, Brown JD. Relative Clinical and Cost Burden of Community-Acquired Pneumonia Hospitalizations in Older Adults in the United States-A Cross-Sectional Analysis. *Vaccines (Basel).* 2018;6(3). doi:10.3390/vaccines6030059.
14. Ferreira-Coimbra J, Sarda C, Rello J. Burden of Community-Acquired Pneumonia and Unmet Clinical Needs. *Adv Ther.* 2020;37(4):1302-18. doi:10.1007/s12325-020-01248-7.
15. Engholm DH, Kilian M, Goodsell DS, Andersen ES, Kjaergaard RS. A visual review of the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Rev.* 2017;41(6):854-79. doi:10.1093/femsre/fux037.
16. Brown AO, Orihuela CJ. Visualization of *Streptococcus pneumoniae* within Cardiac Microlesions and Subsequent Cardiac Remodeling. *J Vis Exp.* 2015(98). doi:10.3791/52590.
17. Veenhoven RH, Bogaert D, Schilder AG, Rijkers GT, Uiterwaal CS, Kiezebrink HH, van Kempen MJ, Dhooge IJ, Bruin J, Ijzerman EP, de Groot R, Kuis W, Hermans

- PW, Sanders EA. Nasopharyngeal pneumococcal carriage after combined pneumococcal conjugate and polysaccharide vaccination in children with a history of recurrent acute otitis media. *Clin Infect Dis.* 2004;39(7):911-9. doi:10.1086/422651.
18. Bogaert D, De Groot R, Hermans PW. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis.* 2004;4(3):144-54. doi:10.1016/S1473-3099(04)00938-7.
  19. Paton JC, Andrew PW, Boulnois GJ, Mitchell TJ. Molecular analysis of the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*: the role of pneumococcal proteins. *Annu Rev Microbiol.* 1993;47:89-115. doi:10.1146/annurev.mi.47.100193.000513.
  20. Cockeran R, Anderson R, Feldman C. The role of pneumolysin in the pathogenesis of *Streptococcus pneumoniae* infection. *Curr Opin Infect Dis.* 2002;15(3):235-9. doi:10.1097/00001432-200206000-00004.
  21. Wolfmeier H, Radecke J, Schoenauer R, Koeffel R, Babiychuk VS, Drucker P, Hathaway LJ, Mitchell TJ, Zuber B, Draeger A, Babiychuk EB. Active release of pneumolysin prepores and pores by mammalian cells undergoing a *Streptococcus pneumoniae* attack. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1860(11 Pt A):2498-509. doi:10.1016/j.bbagen.2016.07.022.
  22. Nishimoto AT, Rosch JW, Tuomanen EI. Pneumolysin: Pathogenesis and Therapeutic Target. *Front Microbiol.* 2020;11:1543. doi:10.3389/fmicb.2020.01543.
  23. Witzernath M, Gutbier B, Hocke AC, Schmeck B, Hippenstiel S, Berger K, Mitchell TJ, de los Toyos JR, Rosseau S, Suttorp N, Schutte H. Role of pneumolysin for the development of acute lung injury in pneumococcal pneumonia. *Crit Care Med.* 2006;34(7):1947-54. doi:10.1097/01.CCM.0000220496.48295.A9.
  24. Garcia-Suarez Mdel M, Florez N, Astudillo A, Vazquez F, Villaverde R, Fabrizio K, Pirofski LA, Mendez FJ. The role of pneumolysin in mediating lung damage in a lethal pneumococcal pneumonia murine model. *Respir Res.* 2007;8:3. doi:10.1186/1465-9921-8-3.
  25. Alhamdi Y, Neill DR, Abrams ST, Malak HA, Yahya R, Barrett-Jolley R, Wang G, Kadioglu A, Toh CH. Circulating Pneumolysin Is a Potent Inducer of Cardiac Injury during Pneumococcal Infection. *PLoS Pathog.* 2015;11(5):e1004836. doi:10.1371/journal.ppat.1004836.
  26. WHO. Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report: 2021. Geneva: World Health Organization; 2021.

- <https://www.who.int/publications/i/item/9789240027336> Accessed November 03, 2021.
27. Prina E, Ranzani OT, Torres A. Community-acquired pneumonia. *Lancet*. 2015;386(9998):1097-108. doi:10.1016/S0140-6736(15)60733-4.
  28. Lim WS, van der Eerden MM, Laing R, Boersma WG, Karalus N, Town GI, Lewis SA, Macfarlane JT. Defining community acquired pneumonia severity on presentation to hospital: an international derivation and validation study. *Thorax*. 2003;58(5):377-82. doi:10.1136/thorax.58.5.377.
  29. Evans GM, Gaisford W. TREATMENT OF PNEUMONIA WITH 2-(p-AMINOBENZENESULPHONAMIDO) PYRIDINE. *The Lancet*. 1938;232(5992):14-9. doi:10.1016/S0140-6736(00)87996-9.
  30. Georges H, Leroy O, Vandenbussche C, Guery B, Alfandari S, Tronchon L, Beaucaire G. Epidemiological features and prognosis of severe community-acquired pneumococcal pneumonia. *Intensive Care Med*. 1999;25(2):198-206. doi:10.1007/s001340050816.
  31. STIKO. Empfehlungen der Ständigen Impfkommision (STIKO) beim Robert Koch-Institut 2021. 2021(34):3--63. doi:<http://dx.doi.org/10.25646/8824>.
  32. Chaudhry R, Bordoni B. Anatomy, Thorax, Lungs. *StatPearls*. Treasure Island 2021.
  33. Schünke M, Schulte E, Schumacher U. Prometheus - LernAtlas der Anatomie. [2], Innere Organe. 3. Auflage. Stuttgart, Thieme; 2012.
  34. Patwa A, Shah A. Anatomy and physiology of respiratory system relevant to anaesthesia. *Indian J Anaesth*. 2015;59(9):533-41. doi:10.4103/0019-5049.165849.
  35. Khan YS, Lynch DT. Histology, Lung. *StatPearls*. Treasure Island 2021.
  36. Franks TJ, Colby TV, Travis WD, Tuder RM, Reynolds HY, Brody AR, Cardoso WV, Crystal RG, Drake CJ, Engelhardt J, Frid M, Herzog E, Mason R, Phan SH, Randell SH, Rose MC, Stevens T, Serge J, Sunday ME, Voynow JA, Weinstein BM, Whitsett J, Williams MC. Resident cellular components of the human lung: current knowledge and goals for research on cell phenotyping and function. *Proc Am Thorac Soc*. 2008;5(7):763-6. doi:10.1513/pats.200803-025HR.
  37. Hu G, Christman JW. Editorial: Alveolar Macrophages in Lung Inflammation and Resolution. *Front Immunol*. 2019;10:2275. doi:10.3389/fimmu.2019.02275.
  38. Bhattacharya J, Westphalen K. Macrophage-epithelial interactions in pulmonary alveoli. *Semin Immunopathol*. 2016;38(4):461-9. doi:10.1007/s00281-016-0569-x.

39. Aghapour M, Raei P, Moghaddam SJ, Hiemstra PS, Heijink IH. Airway Epithelial Barrier Dysfunction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Role of Cigarette Smoke Exposure. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2018;58(2):157-69. doi:10.1165/rcmb.2017-0200TR.
40. Montoro DT, Haber AL, Biton M, Vinarsky V, Lin B, Birket SE, Yuan F, Chen S, Leung HM, Villoria J, Rogel N, Burgin G, Tsankov AM, Waghray A, Slyper M, Waldman J, Nguyen L, Dionne D, Rozenblatt-Rosen O, Tata PR, Mou H, Shivaraju M, Bihler H, Mense M, Tearney GJ, Rowe SM, Engelhardt JF, Regev A, Rajagopal J. A revised airway epithelial hierarchy includes CFTR-expressing ionocytes. *Nature.* 2018;560(7718):319-24. doi:10.1038/s41586-018-0393-7.
41. Loxham M, Davies DE. Phenotypic and genetic aspects of epithelial barrier function in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;139(6):1736-51. doi:10.1016/j.jaci.2017.04.005.
42. Clarke SW, Pavia D. Lung mucus production and mucociliary clearance: methods of assessment. *Br J Clin Pharmacol.* 1980;9(6):537-46. doi:10.1111/j.1365-2125.1980.tb01078.x.
43. Bustamante-Marin XM, Ostrowski LE. Cilia and Mucociliary Clearance. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017;9(4). doi:10.1101/cshperspect.a028241.
44. Krasteva G, Canning BJ, Hartmann P, Veres TZ, Papadakis T, Muhlfeld C, Schliecker K, Tallini YN, Braun A, Hackstein H, Baal N, Weihe E, Schutz B, Kotlikoff M, Ibanez-Tallon I, Kummer W. Cholinergic chemosensory cells in the trachea regulate breathing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(23):9478-83. doi:10.1073/pnas.1019418108.
45. Reid L, Meyrick B, Antony VB, Chang LY, Crapo JD, Reynolds HY. The mysterious pulmonary brush cell: a cell in search of a function. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172(1):136-9. doi:10.1164/rccm.200502-203WS.
46. Song H, Yao E, Lin C, Gacayan R, Chen MH, Chuang PT. Functional characterization of pulmonary neuroendocrine cells in lung development, injury, and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(43):17531-6. doi:10.1073/pnas.1207238109.
47. White ES. Lung extracellular matrix and fibroblast function. *Ann Am Thorac Soc.* 2015;12 Suppl 1:S30-3. doi:10.1513/AnnalsATS.201406-240MG.

48. Wu Y, Li P, Goodwin AJ, Cook JA, Halushka PV, Zingarelli B, Fan H. miR-145a Regulation of Pericyte Dysfunction in a Murine Model of Sepsis. *J Infect Dis.* 2020;222(6):1037-45. doi:10.1093/infdis/jiaa184.
49. Chung KF. Airway smooth muscle cells: contributing to and regulating airway mucosal inflammation? *Eur Respir J.* 2000;15(5):961-8. doi:10.1034/j.1399-3003.2000.15e26.x.
50. Murphy KM, Weaver C, Mowat A, Berg L, Chaplin D, Seidler L. *Janeway Immunologie*. 9. Auflage. Berlin, Springer Spektrum; 2018.
51. Beisswenger C, Bals R. Antimicrobial peptides in lung inflammation. *Chem Immunol Allergy.* 2005;86:55-71. doi:10.1159/000086651.
52. Hartl D, Tirouvanziam R, Laval J, Greene CM, Habel D, Sharma L, Yildirim AO, Dela Cruz CS, Hogaboam CM. Innate Immunity of the Lung: From Basic Mechanisms to Translational Medicine. *J Innate Immun.* 2018;10(5-6):487-501. doi:10.1159/000487057.
53. Noris M, Remuzzi G. Overview of complement activation and regulation. *Semin Nephrol.* 2013;33(6):479-92. doi:10.1016/j.semnephrol.2013.08.001.
54. Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front Immunol.* 2015;6:262. doi:10.3389/fimmu.2015.00262.
55. Dunkelberger JR, Song WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res.* 2010;20(1):34-50. doi:10.1038/cr.2009.139.
56. Rink L, Kruse A, Haase H. *Immunologie für Einsteiger*. 2. Auflage. Berlin, Heidelberg, Springer 2015.
57. Kumar V. Pulmonary Innate Immune Response Determines the Outcome of Inflammation During Pneumonia and Sepsis-Associated Acute Lung Injury. *Front Immunol.* 2020;11:1722. doi:10.3389/fimmu.2020.01722.
58. Wu L, Liu YJ. Development of dendritic-cell lineages. *Immunity.* 2007;26(6):741-50. doi:10.1016/j.immuni.2007.06.006.
59. Kopf M, Schneider C, Nobs SP. The development and function of lung-resident macrophages and dendritic cells. *Nat Immunol.* 2015;16(1):36-44. doi:10.1038/ni.3052.
60. Ribatti D, Crivellato E, Vacca A. The contribution of Bruce Glick to the definition of the role played by the bursa of Fabricius in the development of the B cell lineage. *Clin Exp Immunol.* 2006;145(1):1-4. doi:10.1111/j.1365-2249.2006.03131.x.



61. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). *Annu Rev Immunol.* 2010;28:445-89. doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101212.
62. Garcillan B, Marin AV, Jimenez-Reinoso A, Briones AC, Munoz-Ruiz M, Garcia-Leon MJ, Gil J, Allende LM, Martinez-Naves E, Toribio ML, Regueiro JR. gammadelta T Lymphocytes in the Diagnosis of Human T Cell Receptor Immunodeficiencies. *Front Immunol.* 2015;6:20. doi:10.3389/fimmu.2015.00020.
63. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell.* 4th edition. New York, Garland Science; 2002.
64. Farber DL, Yudanin NA, Restifo NP. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(1):24-35. doi:10.1038/nri3567.
65. Pupovac A, Good-Jacobson KL. An antigen to remember: regulation of B cell memory in health and disease. *Curr Opin Immunol.* 2017;45:89-96. doi:10.1016/j.coi.2017.03.004.
66. Toews GB. Cytokines and the lung. *Eur Respir J Suppl.* 2001;34:3s-17s. doi:10.1183/09031936.01.00266001.
67. Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin.* 2007;45(2):27-37. doi:10.1097/AIA.0b013e318034194e.
68. Borish LC, Steinke JW. 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111(2 Suppl):S460-75. doi:10.1067/mai.2003.108.
69. Boxx GM, Cheng G. The Roles of Type I Interferon in Bacterial Infection. *Cell Host Microbe.* 2016;19(6):760-9. doi:10.1016/j.chom.2016.05.016.
70. Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:513-45. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120231.
71. Kovarik P, Castiglia V, Ivin M, Ebner F. Type I Interferons in Bacterial Infections: A Balancing Act. *Front Immunol.* 2016;7:652. doi:10.3389/fimmu.2016.00652.
72. Zhang D, Zhang DE. Interferon-stimulated gene 15 and the protein ISGylation system. *J Interferon Cytokine Res.* 2011;31(1):119-30. doi:10.1089/jir.2010.0110.
73. Perng YC, Lenschow DJ. ISG15 in antiviral immunity and beyond. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16(7):423-39. doi:10.1038/s41579-018-0020-5.
74. Bogunovic D, Byun M, Durfee LA, Abhyankar A, Sanal O, Mansouri D, Salem S, Radovanovic I, Grant AV, Adimi P, Mansouri N, Okada S, Bryant VL, Kong XF,

- Kreins A, Velez MM, Boisson B, Khalilzadeh S, Ozcelik U, Darazam IA, Schoggins JW, Rice CM, Al-Muhsen S, Behr M, Vogt G, Puel A, Bustamante J, Gros P, Huibregtse JM, Abel L, Boisson-Dupuis S, Casanova JL. Mycobacterial disease and impaired IFN-gamma immunity in humans with inherited ISG15 deficiency. *Science*. 2012;337(6102):1684-8. doi:10.1126/science.1224026.
75. Muller-Redetzky H, Lienau J, Suttorp N, Witzernath M. Therapeutic strategies in pneumonia: going beyond antibiotics. *Eur Respir Rev*. 2015;24(137):516-24. doi:10.1183/16000617.0034-2015.
76. Opitz B, van Laak V, Eitel J, Suttorp N. Innate immune recognition in infectious and noninfectious diseases of the lung. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181(12):1294-309. doi:10.1164/rccm.200909-1427SO.
77. Bals R, Hiemstra PS. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J*. 2004;23(2):327-33. doi:10.1183/09031936.03.00098803.
78. Muller-Redetzky HC, Suttorp N, Witzernath M. Dynamics of pulmonary endothelial barrier function in acute inflammation: mechanisms and therapeutic perspectives. *Cell Tissue Res*. 2014;355(3):657-73. doi:10.1007/s00441-014-1821-0.
79. Knudsen L, Ochs M. The micromechanics of lung alveoli: structure and function of surfactant and tissue components. *Histochem Cell Biol*. 2018;150(6):661-76. doi:10.1007/s00418-018-1747-9.
80. Method of the Year 2013. *Nature Methods*. 2014;11(1):1-. doi:10.1038/nmeth.2801.
81. Method of the Year. *Nature Methods*. 2008;5(1):1-. doi:10.1038/nmeth1153.
82. Lowe R, Shirley N, Bleackley M, Dolan S, Shafee T. Transcriptomics technologies. *PLoS Comput Biol*. 2017;13(5):e1005457. doi:10.1371/journal.pcbi.1005457.
83. Hwang B, Lee JH, Bang D. Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines. *Exp Mol Med*. 2018;50(8):1-14. doi:10.1038/s12276-018-0071-8.
84. Tang X, Huang Y, Lei J, Luo H, Zhu X. The single-cell sequencing: new developments and medical applications. *Cell Biosci*. 2019;9:53. doi:10.1186/s13578-019-0314-y.
85. Tang F, Barbacioru C, Wang Y, Nordman E, Lee C, Xu N, Wang X, Bodeau J, Tuch BB, Siddiqui A, Lao K, Surani MA. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat Methods*. 2009;6(5):377-82. doi:10.1038/nmeth.1315.

86. Shalek AK, Satija R, Adiconis X, Gertner RS, Gaublomme JT, Raychowdhury R, Schwartz S, Yosef N, Malboeuf C, Lu D, Trombetta JJ, Gennert D, Gnirke A, Goren A, Hacohen N, Levin JZ, Park H, Regev A. Single-cell transcriptomics reveals bimodality in expression and splicing in immune cells. *Nature*. 2013;498(7453):236-40. doi:10.1038/nature12172.
87. 10x Genomics. What is the maximum number of cells that can be profiled? . Available from: <https://kb.10xgenomics.com/hc/en-us/articles/360001378811-What-is-the-maximum-number-of-cells-that-can-be-profiled-#:~:text=In%20each%20high%2Dthroughput%2010X,20%2C000%20cells%20with%20cell%20multiplexing>. Accessed January 19, 2023.
88. Islam S, Zeisel A, Joost S, La Manno G, Zajac P, Kasper M, Lonnerberg P, Linnarsson S. Quantitative single-cell RNA-seq with unique molecular identifiers. *Nat Methods*. 2014;11(2):163-6. doi:10.1038/nmeth.2772.
89. Kolodziejczyk AA, Kim JK, Svensson V, Marioni JC, Teichmann SA. The technology and biology of single-cell RNA sequencing. *Mol Cell*. 2015;58(4):610-20. doi:10.1016/j.molcel.2015.04.005.
90. Zhang X, Li T, Liu F, Chen Y, Yao J, Li Z, Huang Y, Wang J. Comparative Analysis of Droplet-Based Ultra-High-Throughput Single-Cell RNA-Seq Systems. *Mol Cell*. 2019;73(1):130-42 e5. doi:10.1016/j.molcel.2018.10.020.
91. Williams JW, Winkels H, Durant CP, Zaitsev K, Ghosheh Y, Ley K. Single Cell RNA Sequencing in Atherosclerosis Research. *Circ Res*. 2020;126(9):1112-26. doi:10.1161/CIRCRESAHA.119.315940.
92. Denisenko E, Guo BB, Jones M, Hou R, de Kock L, Lassmann T, Poppe D, Clement O, Simmons RK, Lister R, Forrest ARR. Systematic assessment of tissue dissociation and storage biases in single-cell and single-nucleus RNA-seq workflows. *Genome Biol*. 2020;21(1):130. doi:10.1186/s13059-020-02048-6.
93. Westendorf K, Okhrimenko A, Grun JR, Schliemann H, Chang HD, Dong J, Radbruch A. Unbiased transcriptomes of resting human CD4(+) CD45RO(+) T lymphocytes. *Eur J Immunol*. 2014;44(6):1866-9. doi:10.1002/eji.201344323.
94. Sunkara V, Heinz GA, Heinrich FF, Durek P, Mobasher A, Mashreghi MF, Lang A. Combining segmental bulk- and single-cell RNA-sequencing to define the chondrocyte gene expression signature in the murine knee joint. *Osteoarthritis Cartilage*. 2021;29(6):905-14. doi:10.1016/j.joca.2021.03.007.

## Literaturverzeichnis

95. Ding J, Adiconis X, Simmons SK, Kowalczyk MS, Hession CC, Marjanovic ND, Hughes TK, Wadsworth MH, Burks T, Nguyen LT, Kwon JYH, Barak B, Ge W, Kedaigle AJ, Carroll S, Li S, Hacohen N, Rozenblatt-Rosen O, Shalek AK, Villani AC, Regev A, Levin JZ. Systematic comparison of single-cell and single-nucleus RNA-sequencing methods. *Nat Biotechnol.* 2020;38(6):737-46. doi:10.1038/s41587-020-0465-8.
96. Lake BB, Chen S, Hoshi M, Plongthongkum N, Salamon D, Knoten A, Vijayan A, Venkatesh R, Kim EH, Gao D, Gaut J, Zhang K, Jain S. A single-nucleus RNA-sequencing pipeline to decipher the molecular anatomy and pathophysiology of human kidneys. *Nat Commun.* 2019;10(1):2832. doi:10.1038/s41467-019-10861-2.
97. 10x Genomics. Are RNase inhibitors required in the preparation of my sample? . Available from: <https://kb.10xgenomics.com/hc/en-us/articles/360000087632-Can-RNase-inhibitors-be-used-in-the-preparation-of-my-sample->. Accessed November 03, 2021.
98. Corning. Corning® Dispase, 100 mL. Available from: <https://ecatalog.corning.com/life-sciences/b2c/US/en/Surfaces/Dissociation-and-Recovery-Reagents/Products-for-Cell-Release-and-Recovery-from-ECMs/p/354235>. Accessed October 31, 2021.
99. Griffin PJ, Fogarty WM. Physicochemical properties of the native, zinc- and manganese-prepared metalloprotease of *Bacillus polymyxa*. *Appl Microbiol.* 1973;26(2):191-5. doi:10.1128/am.26.2.191-195.1973.
100. Campbell VW, Jackson DA. The effect of divalent cations on the mode of action of DNase I. The initial reaction products produced from covalently closed circular DNA. *J Biol Chem.* 1980;255(8):3726-35.
101. Matsushita O, Yoshihara K, Katayama S, Minami J, Okabe A. Purification and characterization of *Clostridium perfringens* 120-kilodalton collagenase and nucleotide sequence of the corresponding gene. *J Bacteriol.* 1994;176(1):149-56. doi:10.1128/jb.176.1.149-156.1994.
102. Mookhtiar KA, Van Wart HE. *Clostridium histolyticum* collagenases: a new look at some old enzymes. *Matrix Suppl.* 1992;1:116-26.
103. Shotton DM. [7] Elastase. *Methods in Enzymology.* 19: Academic Press; 1970. p. 113-40.

104. SERVA. Elastase from porcine pancreas min. 200 U/mg protein. Available from: [https://www.serva.de/enDE/ProductDetails/6293\\_20930\\_Elastase\\_from\\_porcine\\_p\\_ancreas\\_min\\_200\\_U\\_mg\\_protein\\_lyophil\\_213\\_0.html](https://www.serva.de/enDE/ProductDetails/6293_20930_Elastase_from_porcine_p_ancreas_min_200_U_mg_protein_lyophil_213_0.html). Accessed October 31, 2021.
105. Merck. Liberase™ TM Research Grade. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/product/roche/libtmro>. Accessed October 31, 2021.
106. Sucre JMS, Hagood J. Single cell analysis of human lung development: knowing what mesenchymal cells are and what they may be. *Eur Respir J.* 2020;55(1). doi:10.1183/13993003.02327-2019.
107. Tabula Muris C, Overall c, Logistical c, Organ c, processing, Library p, sequencing, Computational data a, Cell type a, Writing g, Supplemental text writing g, Principal i. Single-cell transcriptomics of 20 mouse organs creates a Tabula Muris. *Nature.* 2018;562(7727):367-72. doi:10.1038/s41586-018-0590-4.
108. Rozenblatt-Rosen O, Stubbington MJT, Regev A, Teichmann SA. The Human Cell Atlas: from vision to reality. *Nature.* 2017;550(7677):451-3. doi:10.1038/550451a.
109. Regev A, Teichmann SA, Lander ES, Amit I, Benoist C, Birney E, Bodenmiller B, Campbell P, Carninci P, Clatworthy M, Clevers H, Deplancke B, Dunham I, Eberwine J, Eils R, Enard W, Farmer A, Fugger L, Gottgens B, Hacohen N, Haniffa M, Hemberg M, Kim S, Klenerman P, Kriegstein A, Lein E, Linnarsson S, Lundberg E, Lundeberg J, Majumder P, Marioni JC, Merad M, Mhlanga M, Nawijn M, Netea M, Nolan G, Pe'er D, Phillipakis A, Ponting CP, Quake S, Reik W, Rozenblatt-Rosen O, Sanes J, Satija R, Schumacher TN, Shalek A, Shapiro E, Sharma P, Shin JW, Stegle O, Stratton M, Stubbington MJT, Theis FJ, Uhlen M, van Oudenaarden A, Wagner A, Watt F, Weissman J, Wold B, Xavier R, Yosef N, Human Cell Atlas Meeting P. The Human Cell Atlas. *Elife.* 2017;6. doi:10.7554/eLife.27041.
110. Pennitz P, Kirsten H, Friedrich VD, Wyler E, Goekeri C, Obermayer B, Heinz GA, Mashreghi MF, Buttner M, Trimpert J, Landthaler M, Suttorp N, Hocke AC, Hippenstiel S, Tonnies M, Scholz M, Kuebler WM, Witzenrath M, Hoenzke K, Nouailles G. A pulmonologist's guide to perform and analyse cross-species single lung cell transcriptomics. *Eur Respir Rev.* 2022;31(165). doi:10.1183/16000617.0056-2022.
111. Monaco G, Lee B, Xu W, Mustafah S, Hwang YY, Carre C, Burdin N, Visan L, Ceccarelli M, Poidinger M, Zippelius A, Pedro de Magalhaes J, Larbi A. RNA-Seq Signatures Normalized by mRNA Abundance Allow Absolute Deconvolution of

- Human Immune Cell Types. *Cell Rep.* 2019;26(6):1627-40 e7. doi:10.1016/j.celrep.2019.01.041.
112. 10x Genomics. Can I process neutrophils (or other granulocytes) using 10x Single Cell applications? . Available from: <https://kb.10xgenomics.com/hc/en-us/articles/360004024032-Can-I-process-neutrophils-or-other-granulocytes-using-10x-Single-Cell-applications->. Accessed October 31, 2021.
113. Ghaedi M, Shen ZY, Orangi M, Martinez-Gonzalez I, Wei L, Lu X, Das A, Heravi-Moussavi A, Marra MA, Bhandoola A, Takei F. Single-cell analysis of ROR $\alpha$  tracer mouse lung reveals ILC progenitors and effector ILC2 subsets. *J Exp Med.* 2020;217(3). doi:10.1084/jem.20182293.
114. Danopoulos S, Bhattacharya S, Mariani TJ, Al Alam D. Transcriptional characterisation of human lung cells identifies novel mesenchymal lineage markers. *Eur Respir J.* 2020;55(1). doi:10.1183/13993003.00746-2019.
115. Raredon MSB, Adams TS, Suhail Y, Schupp JC, Poli S, Neumark N, Leiby KL, Greaney AM, Yuan Y, Horien C, Linderman G, Engler AJ, Boffa DJ, Kluger Y, Rosas IO, Levchenko A, Kaminski N, Niklason LE. Single-cell connectomic analysis of adult mammalian lungs. *Sci Adv.* 2019;5(12):eaaw3851. doi:10.1126/sciadv.aaw3851.
116. Wang B, Liu M, Ran Z, Li X, Li J, Ou Y. Analysis of Gene Signatures of Tumor Microenvironment Yields Insight Into Mechanisms of Resistance to Immunotherapy. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8:348. doi:10.3389/fbioe.2020.00348.
117. Dimitrov-Markov S, Perales-Paton J, Bockorny B, Dopazo A, Munoz M, Banos N, Bonilla V, Menendez C, Duran Y, Huang L, Perea S, Muthuswamy SK, Al-Shahrour F, Lopez-Casas PP, Hidalgo M. Discovery of New Targets to Control Metastasis in Pancreatic Cancer by Single-cell Transcriptomics Analysis of Circulating Tumor Cells. *Mol Cancer Ther.* 2020;19(8):1751-60. doi:10.1158/1535-7163.MCT-19-1166.
118. Bicak M, Luckerath K, Kalidindi T, Phelps ME, Strand SE, Morris MJ, Radu CG, Damoiseaux R, Peltola MT, Peekhaus N, Ho A, Veach D, Malmberg Hager AC, Larson SM, Lilja H, McDevitt MR, Klein RJ, Ulmert D. Genetic signature of prostate cancer mouse models resistant to optimized hK2 targeted alpha-particle therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(26):15172-81. doi:10.1073/pnas.1918744117.
119. Reyfman PA, Walter JM, Joshi N, Anekalla KR, McQuattie-Pimentel AC, Chiu S, Fernandez R, Akbarpour M, Chen CI, Ren Z, Verma R, Abdala-Valencia H, Nam K,

- Chi M, Han S, Gonzalez-Gonzalez FJ, Soberanes S, Watanabe S, Williams KJN, Flozak AS, Nicholson TT, Morgan VK, Winter DR, Hinchcliff M, Hrusch CL, Guzy RD, Bonham CA, Sperling AI, Bag R, Hamanaka RB, Mutlu GM, Yeldandi AV, Marshall SA, Shilatifard A, Amaral LAN, Perlman H, Sznajder JI, Argento AC, Gillespie CT, Dematte J, Jain M, Singer BD, Ridge KM, Lam AP, Bharat A, Borhade SM, Gottardi CJ, Budinger GRS, Misharin AV. Single-Cell Transcriptomic Analysis of Human Lung Provides Insights into the Pathobiology of Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019;199(12):1517-36. doi:10.1164/rccm.201712-2410OC.
120. Stephenson E, Reynolds G, Botting RA, Calero-Nieto FJ, Morgan MD, Tuong ZK, Bach K, Sungnak W, Worlock KB, Yoshida M, Kumasaka N, Kania K, Engelbert J, Olabi B, Spegarova JS, Wilson NK, Mende N, Jardine L, Gardner LCS, Goh I, Horsfall D, McGrath J, Webb S, Mather MW, Lindeboom RGH, Dann E, Huang N, Polanski K, Prigmore E, Gothe F, Scott J, Payne RP, Baker KF, Hanrath AT, Schim van der Loeff ICD, Barr AS, Sanchez-Gonzalez A, Bergamaschi L, Mescia F, Barnes JL, Kilich E, de Wilton A, Saigal A, Saleh A, Janes SM, Smith CM, Gopee N, Wilson C, Coupland P, Coxhead JM, Kiselev VY, van Dongen S, Bacardit J, King HW, Cambridge Institute of Therapeutic I, Infectious Disease-National Institute of Health Research C-BC, Rostron AJ, Simpson AJ, Hambleton S, Laurenti E, Lyons PA, Meyer KB, Nikolic MZ, Duncan CJA, Smith KGC, Teichmann SA, Clatworthy MR, Marioni JC, Gottgens B, Haniffa M. Single-cell multi-omics analysis of the immune response in COVID-19. *Nat Med*. 2021;27(5):904-16. doi:10.1038/s41591-021-01329-2.
121. Singh M, Bansal V, Feschotte C. A Single-Cell RNA Expression Map of Human Coronavirus Entry Factors. *Cell Rep*. 2020;32(12):108175. doi:10.1016/j.celrep.2020.108175.
122. Chua RL, Lukassen S, Trump S, Hennig BP, Wendisch D, Pott F, Debnath O, Thurmann L, Kurth F, Volker MT, Kazmierski J, Timmermann B, Twardziok S, Schneider S, Machleidt F, Muller-Redetzky H, Maier M, Krannich A, Schmidt S, Balzer F, Liebig J, Loske J, Suttorp N, Eils J, Ishaque N, Liebert UG, von Kalle C, Hocke A, Witzernath M, Goffinet C, Drosten C, Laudi S, Lehmann I, Conrad C, Sander LE, Eils R. COVID-19 severity correlates with airway epithelium-immune cell interactions identified by single-cell analysis. *Nat Biotechnol*. 2020;38(8):970-9. doi:10.1038/s41587-020-0602-4.

123. Efremova M, Vento-Tormo M, Teichmann SA, Vento-Tormo R. CellPhoneDB: inferring cell-cell communication from combined expression of multi-subunit ligand-receptor complexes. *Nat Protoc.* 2020;15(4):1484-506. doi:10.1038/s41596-020-0292-x.
124. Qiu X, Mao Q, Tang Y, Wang L, Chawla R, Pliner HA, Trapnell C. Reversed graph embedding resolves complex single-cell trajectories. *Nat Methods.* 2017;14(10):979-82. doi:10.1038/nmeth.4402.
125. Su Y, Chen D, Yuan D, Lausted C, Choi J, Dai CL, Voillet V, Duvvuri VR, Scherler K, Troisch P, Baloni P, Qin G, Smith B, Kornilov SA, Rostomily C, Xu A, Li J, Dong S, Rothchild A, Zhou J, Murray K, Edmark R, Hong S, Heath JE, Earls J, Zhang R, Xie J, Li S, Roper R, Jones L, Zhou Y, Rowen L, Liu R, Mackay S, O'Mahony DS, Dale CR, Wallick JA, Algren HA, Zager MA, Unit IS-SCB, Wei W, Price ND, Huang S, Subramanian N, Wang K, Magis AT, Hadlock JJ, Hood L, Aderem A, Bluestone JA, Lanier LL, Greenberg PD, Gottardo R, Davis MM, Goldman JD, Heath JR. Multi-Omics Resolves a Sharp Disease-State Shift between Mild and Moderate COVID-19. *Cell.* 2020;183(6):1479-95 e20. doi:10.1016/j.cell.2020.10.037.
126. Angelidis I, Simon LM, Fernandez IE, Strunz M, Mayr CH, Greiffo FR, Tsitsiridis G, Ansari M, Graf E, Strom TM, Nagendran M, Desai T, Eickelberg O, Mann M, Theis FJ, Schiller HB. An atlas of the aging lung mapped by single cell transcriptomics and deep tissue proteomics. *Nat Commun.* 2019;10(1):963. doi:10.1038/s41467-019-08831-9.
127. Pennitz P, Goekeri C, Trimpert J, Wyler E, Ebenig A, Weissfuss C, Muhlebach MD, Witzernath M, Nouailles G. Protocol to dissociate healthy and infected murine- and hamster-derived lung tissue for single-cell transcriptome analysis. *STAR Protoc.* 2022;4(1):101957. doi:10.1016/j.xpro.2022.101957.
128. Nakano H, Nakano K, Cook DN. Isolation and Purification of Epithelial and Endothelial Cells from Mouse Lung. *Methods Mol Biol.* 2018;1799:59-69. doi:10.1007/978-1-4939-7896-0\_6.
129. Goekeri C, Pennitz P, Groenewald W, Behrendt U, Kirsten H, Zobel CM, Berger S, Heinz GA, Mashreghi MF, Wienhold SM, Dietert K, Dorhoi A, Gruber AD, Scholz M, Rohde G, Suttorp N, Capnetz Study G, Witzernath M, Nouailles G. MicroRNA-223 Dampens Pulmonary Inflammation during Pneumococcal Pneumonia. *Cells.* 2023;12(6). doi:10.3390/cells12060959.



130. Amezquita RA, Lun ATL, Becht E, Carey VJ, Carpp LN, Geistlinger L, Marini F, Rue-Albrecht K, Risso D, Soneson C, Waldron L, Pages H, Smith ML, Huber W, Morgan M, Gottardo R, Hicks SC. Orchestrating single-cell analysis with Bioconductor. *Nat Methods*. 2020;17(2):137-45. doi:10.1038/s41592-019-0654-x.
131. Stuart T, Butler A, Hoffman P, Hafemeister C, Papalexi E, Mauck WM, 3rd, Hao Y, Stoeckius M, Smibert P, Satija R. Comprehensive Integration of Single-Cell Data. *Cell*. 2019;177(7):1888-902 e21. doi:10.1016/j.cell.2019.05.031.
132. Hao Y, Hao S, Andersen-Nissen E, Mauck WM, 3rd, Zheng S, Butler A, Lee MJ, Wilk AJ, Darby C, Zager M, Hoffman P, Stoeckius M, Papalexi E, Mimitou EP, Jain J, Srivastava A, Stuart T, Fleming LM, Yeung B, Rogers AJ, McElrath JM, Blish CA, Gottardo R, Smibert P, Satija R. Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell*. 2021;184(13):3573-87 e29. doi:10.1016/j.cell.2021.04.048.
133. Luecken MD, Theis FJ. Current best practices in single-cell RNA-seq analysis: a tutorial. *Mol Syst Biol*. 2019;15(6):e8746. doi:10.15252/msb.20188746.
134. Hafemeister C, Satija R. Normalization and variance stabilization of single-cell RNA-seq data using regularized negative binomial regression. *Genome Biol*. 2019;20(1):296. doi:10.1186/s13059-019-1874-1.
135. Blondel VD, Guillaume J-L, Lambiotte R, Lefebvre E. Fast unfolding of communities in large networks. *Journal of Statistical Mechanics: Theory and Experiment*. 2008;2008(10):P10008. doi:10.1088/1742-5468/2008/10/p10008.
136. Korsunsky I, Millard N, Fan J, Slowikowski K, Zhang F, Wei K, Baglaenko Y, Brenner M, Loh PR, Raychaudhuri S. Fast, sensitive and accurate integration of single-cell data with Harmony. *Nat Methods*. 2019;16(12):1289-96. doi:10.1038/s41592-019-0619-0.
137. McInnes L, Healy J, Melville J. UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction 2018 February 01, 2018:[arXiv:1802.03426 p.]. Available from: <https://ui.adsabs.harvard.edu/abs/2018arXiv180203426M>.
138. Franzen O, Gan LM, Bjorkegren JLM. PanglaoDB: a web server for exploration of mouse and human single-cell RNA sequencing data. *Database (Oxford)*. 2019;2019. doi:10.1093/database/baz046.
139. Zhang X, Lan Y, Xu J, Quan F, Zhao E, Deng C, Luo T, Xu L, Liao G, Yan M, Ping Y, Li F, Shi A, Bai J, Zhao T, Li X, Xiao Y. CellMarker: a manually curated resource of cell markers in human and mouse. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D721-D8. doi:10.1093/nar/gky900.

140. Han X, Wang R, Zhou Y, Fei L, Sun H, Lai S, Saadatpour A, Zhou Z, Chen H, Ye F, Huang D, Xu Y, Huang W, Jiang M, Jiang X, Mao J, Chen Y, Lu C, Xie J, Fang Q, Wang Y, Yue R, Li T, Huang H, Orkin SH, Yuan GC, Chen M, Guo G. Mapping the Mouse Cell Atlas by Microwell-Seq. *Cell*. 2018;172(5):1091-107 e17. doi:10.1016/j.cell.2018.02.001.
141. Cochain C, Vafadarnejad E, Arampatzi P, Pelisek J, Winkels H, Ley K, Wolf D, Saliba AE, Zerneck A. Single-Cell RNA-Seq Reveals the Transcriptional Landscape and Heterogeneity of Aortic Macrophages in Murine Atherosclerosis. *Circ Res*. 2018;122(12):1661-74. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.312509.
142. Dutertre CA, Becht E, Irac SE, Khalilnezhad A, Narang V, Khalilnezhad S, Ng PY, van den Hoogen LL, Leong JY, Lee B, Chevrier M, Zhang XM, Yong PJA, Koh G, Lum J, Howland SW, Mok E, Chen J, Larbi A, Tan HKK, Lim TKH, Karagianni P, Tzioufas AG, Malleret B, Brody J, Albani S, van Roon J, Radstake T, Newell EW, Ginhoux F. Single-Cell Analysis of Human Mononuclear Phagocytes Reveals Subset-Defining Markers and Identifies Circulating Inflammatory Dendritic Cells. *Immunity*. 2019;51(3):573-89 e8. doi:10.1016/j.immuni.2019.08.008.
143. Cohen M, Giladi A, Gorki AD, Solodkin DG, Zada M, Hladik A, Miklosi A, Salame TM, Halpern KB, David E, Itzkovitz S, Harkany T, Knapp S, Amit I. Lung Single-Cell Signaling Interaction Map Reveals Basophil Role in Macrophage Imprinting. *Cell*. 2018;175(4):1031-44 e18. doi:10.1016/j.cell.2018.09.009.
144. Travaglini KJ, Nabhan AN, Penland L, Sinha R, Gillich A, Sit RV, Chang S, Conley SD, Mori Y, Seita J, Berry GJ, Shrager JB, Metzger RJ, Kuo CS, Neff N, Weissman IL, Quake SR, Krasnow MA. A molecular cell atlas of the human lung from single-cell RNA sequencing. *Nature*. 2020;587(7835):619-25. doi:10.1038/s41586-020-2922-4.
145. Bolden JE, Lucas EC, Zhou G, O'Sullivan JA, de Graaf CA, McKenzie MD, Di Rago L, Baldwin TM, Shortt J, Alexander WS, Bochner BS, Ritchie ME, Hilton DJ, Fairfax KA. Identification of a Siglec-F+ granulocyte-macrophage progenitor. *J Leukoc Biol*. 2018;104(1):123-33. doi:10.1002/JLB.1MA1217-475R.
146. Feng W, Chen L, Nguyen PK, Wu SM, Li G. Single Cell Analysis of Endothelial Cells Identified Organ-Specific Molecular Signatures and Heart-Specific Cell Populations and Molecular Features. *Front Cardiovasc Med*. 2019;6:165. doi:10.3389/fcvm.2019.00165.

147. Liu X, Rowan SC, Liang J, Yao C, Huang G, Deng N, Xie T, Wu D, Wang Y, Burman A, Parimon T, Borok Z, Chen P, Parks WC, Hogaboam CM, Weigt SS, Belperio J, Stripp BR, Noble PW, Jiang D. Categorization of lung mesenchymal cells in development and fibrosis. *iScience*. 2021;24(6):102551. doi:10.1016/j.isci.2021.102551.
148. Abel AM, Yang C, Thakar MS, Malarkannan S. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front Immunol*. 2018;9:1869. doi:10.3389/fimmu.2018.01869.
149. Zhao Y, Li X, Zhao W, Wang J, Yu J, Wan Z, Gao K, Yi G, Wang X, Fan B, Wu Q, Chen B, Xie F, Wu J, Zhang W, Chen F, Yang H, Wang J, Xu X, Li B, Liu S, Hou Y, Liu X. Single-cell transcriptomic landscape of nucleated cells in umbilical cord blood. *Gigascience*. 2019;8(5). doi:10.1093/gigascience/giz047.
150. Le T, Phan T, Pham M, Tran D, Lam L, Nguyen T, Truong T, Vuong H, Luu T, Phung N, Pham N, Nguyen T, Pham O, Nguyen A, Nguyen H, Tran H, Tran L, Nguyen HA, Tran T, Nguyen N, Tran N, Boysen C, Nguyen U, Pham V, Kim T, Pham N, Gill T, Pham S. BBrowser: Making single-cell data easily accessible. *bioRxiv*. 2020:2020.12.11.414136. doi:10.1101/2020.12.11.414136.
151. Alquicira-Hernandez J, Powell JE. Nebulosa recovers single cell gene expression signals by kernel density estimation. *Bioinformatics*. 2021. doi:10.1093/bioinformatics/btab003.
152. McGinnis CS, Murrow LM, Gartner ZJ. DoubletFinder: Doublet Detection in Single-Cell RNA Sequencing Data Using Artificial Nearest Neighbors. *Cell Syst*. 2019;8(4):329-37 e4. doi:10.1016/j.cels.2019.03.003.
153. Cabello-Aguilar S, Alame M, Kon-Sun-Tack F, Fau C, Lacroix M, Colinge J. SingleCellSignalR: inference of intercellular networks from single-cell transcriptomics. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(10):e55. doi:10.1093/nar/gkaa183.
154. Wickham H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. New York, Springer-Verlag; 2016.
155. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol*. 2015;111:A3 B 1-A3 B doi:10.1002/0471142735.ima03bs111.
156. ThermoFisher. Fixable Viability Dyes for Flow Cytometry. Available from: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/flow-cytometry/flow-cytometry-assays-reagents/cell-viability-assays-flow-cytometry/fixable-viability-dyes-flow-cytometry.html>. Accessed October 31, 2021.

157. 10x Genomics. What is the expected size range of the final Single Cell DNA library? Available from: <https://kb.10xgenomics.com/hc/en-us/articles/360005109071-What-is-the-expected-size-range-of-the-final-Single-Cell-DNA-library->. Accessed October 31, 2021.
158. 10x Genomics. What is the recommended sequencing depth for Single Cell 3' and 5' Gene Expression libraries? . Available from: <https://kb.10xgenomics.com/hc/en-us/articles/115002022743-What-is-the-recommended-sequencing-depth-for-Single-Cell-3-and-5-Gene-Expression-libraries->. Accessed October 31, 2021.
159. Li O, Zheng P, Liu Y. CD24 expression on T cells is required for optimal T cell proliferation in lymphopenic host. *J Exp Med.* 2004;200(8):1083-9. doi:10.1084/jem.20040779.
160. O'Flanagan CH, Campbell KR, Zhang AW, Kabeer F, Lim JLP, Biele J, Eirew P, Lai D, McPherson A, Kong E, Bates C, Borkowski K, Wiens M, Hewitson B, Hopkins J, Pham J, Ceglia N, Moore R, Mungall AJ, McAlpine JN, Team CIGC, Shah SP, Aparicio S. Dissociation of solid tumor tissues with cold active protease for single-cell RNA-seq minimizes conserved collagenase-associated stress responses. *Genome Biol.* 2019;20(1):210. doi:10.1186/s13059-019-1830-0.
161. Tirosh I, Izar B, Prakadan SM, Wadsworth MH, 2nd, Treacy D, Trombetta JJ, Rotem A, Rodman C, Lian C, Murphy G, Fallahi-Sichani M, Dutton-Regester K, Lin JR, Cohen O, Shah P, Lu D, Genshaft AS, Hughes TK, Ziegler CG, Kazer SW, Gaillard A, Kolb KE, Villani AC, Johannessen CM, Andreev AY, Van Allen EM, Bertagnoli M, Sorger PK, Sullivan RJ, Flaherty KT, Frederick DT, Jane-Valbuena J, Yoon CH, Rozenblatt-Rosen O, Shalek AK, Regev A, Garraway LA. Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science.* 2016;352(6282):189-96. doi:10.1126/science.aad0501.
162. Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, Gilroy DW, Haslett C, O'Neill LA, Perretti M, Rossi AG, Wallace JL. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J.* 2007;21(2):325-32. doi:10.1096/fj.06-7227rev.
163. Quesnel C, Nardelli L, Piednoir P, Lecon V, Marchal-Somme J, Lasocki S, Bouadma L, Philip I, Soler P, Crestani B, Dehoux M. Alveolar fibroblasts in acute lung injury: biological behaviour and clinical relevance. *Eur Respir J.* 2010;35(6):1312-21. doi:10.1183/09031936.00074709.

164. Hwang I. Cell-cell communication via extracellular membrane vesicles and its role in the immune response. *Mol Cells*. 2013;36(2):105-11. doi:10.1007/s10059-013-0154-2.
165. Travaglini KJ, Nabhan AN, Penland L, Sinha R, Gillich A, Sit RV, Chang S, Conley SD, Mori Y, Seita J, Berry GJ, Shrager JB, Metzger RJ, Kuo CS, Neff N, Weissman IL, Quake SR, Krasnow MA. A molecular cell atlas of the human lung from single cell RNA sequencing. *bioRxiv*. 2020:742320. doi:10.1101/742320.
166. Li Y, Li K, Zhu L, Li B, Zong D, Cai P, Jiang C, Du P, Lin J, Qu K. Development of double-positive thymocytes at single-cell resolution. *Genome Med*. 2021;13(1):49. doi:10.1186/s13073-021-00861-7.
167. Winkels H, Ghosheh Y, Kobiyama K, Kiosses WB, Orecchioni M, Ehinger E, Suryawanshi V, Herrera-De La Mata S, Marchovecchio P, Riffelmacher T, Thiault N, Kronenberg M, Wolf D, Seumois G, Vijayanand P, Ley K. Thymus-Derived CD4(+)CD8(+) Cells Reside in Mediastinal Adipose Tissue and the Aortic Arch. *J Immunol*. 2021;207(11):2720-32. doi:10.4049/jimmunol.2100208.
168. Kannan S, Miyamoto M, Lin BL, Zhu R, Murphy S, Kass DA, Andersen P, Kwon C. Large Particle Fluorescence-Activated Cell Sorting Enables High-Quality Single-Cell RNA Sequencing and Functional Analysis of Adult Cardiomyocytes. *Circ Res*. 2019;125(5):567-9. doi:10.1161/CIRCRESAHA.119.315493.
169. 10x Genomics. What are the best practices for flow sorting cells for 10x Genomics assays? Available from: <https://kb.10xgenomics.com/hc/en-us/articles/360048826911>. Accessed October 31, 2021.
170. Nouailles G, Wyler E, Pennitz P, Postmus D, Vladimirova D, Kazmierski J, Pott F, Dietert K, Muelleder M, Farztdinov V, Obermayer B, Wienhold SM, Andreotti S, Hoefler T, Sawitzki B, Drosten C, Sander LE, Suttorp N, Ralser M, Beule D, Gruber AD, Goffinet C, Landthaler M, Trimpert J, Witzernath M. Temporal omics analysis in Syrian hamsters unravel cellular effector responses to moderate COVID-19. *Nat Commun*. 2021;12(1):4869. doi:10.1038/s41467-021-25030-7.
171. Wyler E, Adler JM, Eschke K, Teixeira Alves G, Peidli S, Pott F, Kazmierski J, Michalick L, Kershaw O, Bushe J, Andreotti S, Pennitz P, Abdelgawad A, Postmus D, Goffinet C, Kreye J, Reincke SM, Pruss H, Bluthgen N, Gruber AD, Kuebler WM, Witzernath M, Landthaler M, Nouailles G, Trimpert J. Key benefits of dexamethasone and antibody treatment in COVID-19 hamster models revealed by

- single-cell transcriptomics. *Mol Ther.* 2022;30(5):1952-65. doi:10.1016/j.ymthe.2022.03.014.
172. Ebenig A, Muraleedharan S, Kazmierski J, Todt D, Auste A, Anzaghe M, Gomer A, Postmus D, Gogesch P, Niles M, Plesker R, Miskey C, Gellhorn Serra M, Breithaupt A, Horner C, Kruij C, Ehmann R, Ivics Z, Waibler Z, Pfaender S, Wyler E, Landthaler M, Kupke A, Nouailles G, Goffinet C, Brown RJP, Muhlebach MD. Vaccine-associated enhanced respiratory pathology in COVID-19 hamsters after T(H)2-biased immunization. *Cell Rep.* 2022;40(7):111214. doi:10.1016/j.celrep.2022.111214.
173. Nouailles G, Adler JM, Pennitz P, Peidli S, Teixeira Alves LG, Baumgardt M, Bushe J, Voss A, Langenhagen A, Langner C, Martin Vidal R, Pott F, Kazmierski J, Ebenig A, Lange MV, Muhlebach MD, Goekeri C, Simmons S, Xing N, Abdelgawad A, Herwig S, Cichon G, Niemeyer D, Drosten C, Goffinet C, Landthaler M, Bluthgen N, Wu H, Witzernath M, Gruber AD, Praktiknjo SD, Osterrieder N, Wyler E, Kunec D, Trimpert J. Live-attenuated vaccine sCPD9 elicits superior mucosal and systemic immunity to SARS-CoV-2 variants in hamsters. *Nat Microbiol.* 2023. doi:10.1038/s41564-023-01352-8.
174. Workel HH, van Rooij N, Plat A, Spierings DCJ, Fehrmann RSN, Nijman HW, de Bruyn M. Transcriptional Activity and Stability of CD39+CD103+CD8+ T Cells in Human High-Grade Endometrial Cancer. *Int J Mol Sci.* 2020;21(11). doi:10.3390/ijms21113770.
175. Ward PA, Hunninghake GW. Lung inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157(4 Pt 2):S123-9. doi:10.1164/ajrccm.157.4.nhlbi-10.
176. Warszawska JM, Gawish R, Sharif O, Sigel S, Doninger B, Lakovits K, Mesteri I, Nairz M, Boon L, Spiel A, Fuhrmann V, Strobl B, Muller M, Schenk P, Weiss G, Knapp S. Lipocalin 2 deactivates macrophages and worsens pneumococcal pneumonia outcomes. *J Clin Invest.* 2013;123(8):3363-72. doi:10.1172/JCI67911.
177. Becker PM, Kazi AA, Wadgaonkar R, Pearse DB, Kwiatkowski D, Garcia JG. Pulmonary vascular permeability and ischemic injury in gelsolin-deficient mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;28(4):478-84. doi:10.1165/rcmb.2002-0024OC.
178. Witzernath M, Gutbier B, Schmeck B, Tenor H, Seybold J, Kuelzer R, Greutzmann G, Hatzelmann A, van Laak V, Tschernig T, Mitchell TJ, Schudt C, Rosseau S, Suttorp N, Schutte H. Phosphodiesterase 2 inhibition diminished acute lung injury

- in murine pneumococcal pneumonia. *Crit Care Med.* 2009;37(2):584-90. doi:10.1097/CCM.0b013e3181959814.
179. Wolpe SD, Sherry B, Juers D, Davatelis G, Yurt RW, Cerami A. Identification and characterization of macrophage inflammatory protein 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(2):612-6. doi:10.1073/pnas.86.2.612.
180. Lentini G, Fama A, Biondo C, Mohammadi N, Galbo R, Mancuso G, Iannello D, Zummo S, Giardina M, De Gaetano GV, Teti G, Beninati C, Midiri A. Neutrophils Enhance Their Own Influx to Sites of Bacterial Infection via Endosomal TLR-Dependent Cxcl2 Production. *J Immunol.* 2020;204(3):660-70. doi:10.4049/jimmunol.1901039.
181. Letsiou E, Teixeira Alves LG, Fatykhova D, Felten M, Mitchell TJ, Muller-Redetzky HC, Hocke AC, Witzernath M. Microvesicles released from pneumolysin-stimulated lung epithelial cells carry mitochondrial cargo and suppress neutrophil oxidative burst. *Sci Rep.* 2021;11(1):9529. doi:10.1038/s41598-021-88897-y.
182. Witzernath M, Pache F, Lorenz D, Koppe U, Gutbier B, Tabelaing C, Reppe K, Meixenberger K, Dorhoi A, Ma J, Holmes A, Trendelenburg G, Heimesaat MM, Bereswill S, van der Linden M, Tschopp J, Mitchell TJ, Suttorp N, Opitz B. The NLRP3 inflammasome is differentially activated by pneumolysin variants and contributes to host defense in pneumococcal pneumonia. *J Immunol.* 2011;187(1):434-40. doi:10.4049/jimmunol.1003143.
183. Paton JC, Ferrante A. Inhibition of human polymorphonuclear leukocyte respiratory burst, bactericidal activity, and migration by pneumolysin. *Infect Immun.* 1983;41(3):1212-6. doi:10.1128/iai.41.3.1212-1216.1983.
184. Parker D, Martin FJ, Soong G, Harfenist BS, Aguilar JL, Ratner AJ, Fitzgerald KA, Schindler C, Prince A. *Streptococcus pneumoniae* DNA initiates type I interferon signaling in the respiratory tract. *mBio.* 2011;2(3):e00016-11. doi:10.1128/mBio.00016-11.
185. Koppe U, Hogner K, Doehn JM, Muller HC, Witzernath M, Gutbier B, Bauer S, Pribyl T, Hammerschmidt S, Lohmeyer J, Suttorp N, Herold S, Opitz B. *Streptococcus pneumoniae* stimulates a STING- and IFN regulatory factor 3-dependent type I IFN production in macrophages, which regulates RANTES production in macrophages, cocultured alveolar epithelial cells, and mouse lungs. *J Immunol.* 2012;188(2):811-7. doi:10.4049/jimmunol.1004143.

186. Strehlitz A, Goldmann O, Pils MC, Pessler F, Medina E. An Interferon Signature Discriminates Pneumococcal From Staphylococcal Pneumonia. *Front Immunol.* 2018;9:1424. doi:10.3389/fimmu.2018.01424.
187. Rouillard AD, Gundersen GW, Fernandez NF, Wang Z, Monteiro CD, McDermott MG, Ma'ayan A. The harmonizome: a collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins. *Database (Oxford).* 2016;2016. doi:10.1093/database/baw100.
188. Takele Assefa A, Vandesompele J, Thas O. On the utility of RNA sample pooling to optimize cost and statistical power in RNA sequencing experiments. *BMC Genomics.* 2020;21(1):312. doi:10.1186/s12864-020-6721-y.
189. BioLegend. TotalSeq™-A Antibodies and Cell Hashing with 10x Single Cell 3' Reagent Kit v3 or v3.1 (Single Index) Protocol. Available from: <https://www.biolegend.com/en-us/protocols/totalseq-a-antibodies-and-cell-hashing-with-10x-single-cell-3-reagent-kit-v3-3-1-protocol>. Accessed October 31, 2021.
190. Stoeckius M, Zheng S, Houck-Loomis B, Hao S, Yeung BZ, Mauck WM, 3rd, Smibert P, Satija R. Cell Hashing with barcoded antibodies enables multiplexing and doublet detection for single cell genomics. *Genome Biol.* 2018;19(1):224. doi:10.1186/s13059-018-1603-1.
191. VanderWeele TJ, Mathur MB. Some Desirable Properties of the Bonferroni Correction: Is the Bonferroni Correction Really So Bad? *Am J Epidemiol.* 2019;188(3):617-8. doi:10.1093/aje/kwy250.
192. O'Reilly MA. Giving New Identities to Alveolar Epithelial Type I Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2017;56(3):277-8. doi:10.1165/rcmb.2016-0383ED.
193. Young MD, Behjati S. SoupX removes ambient RNA contamination from droplet-based single-cell RNA sequencing data. *Gigascience.* 2020;9(12). doi:10.1093/gigascience/giaa151.
194. Yang S, Corbett SE, Koga Y, Wang Z, Johnson WE, Yajima M, Campbell JD. Decontamination of ambient RNA in single-cell RNA-seq with DecontX. *Genome Biol.* 2020;21(1):57. doi:10.1186/s13059-020-1950-6.
195. Baccin C, Al-Sabah J, Velten L, Helbling PM, Grunschlager F, Hernandez-Malmierca P, Nombela-Arrieta C, Steinmetz LM, Trumpp A, Haas S. Combined single-cell and spatial transcriptomics reveal the molecular, cellular and spatial bone marrow niche organization. *Nat Cell Biol.* 2020;22(1):38-48. doi:10.1038/s41556-019-0439-6.



196. Sia SF, Yan LM, Chin AWH, Fung K, Choy KT, Wong AYL, Kaewpreedee P, Perera R, Poon LLM, Nicholls JM, Peiris M, Yen HL. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature*. 2020;583(7818):834-8. doi:10.1038/s41586-020-2342-5.
197. Trimpert J, Vladimirova D, Dietert K, Abdelgawad A, Kunec D, Dokel S, Voss A, Gruber AD, Bertzbach LD, Osterrieder N. The Roborovski Dwarf Hamster Is A Highly Susceptible Model for a Rapid and Fatal Course of SARS-CoV-2 Infection. *Cell Rep*. 2020;33(10):108488. doi:10.1016/j.celrep.2020.108488.
198. Gruber AD, Firsching TC, Trimpert J, Dietert K. Hamster models of COVID-19 pneumonia reviewed: How human can they be? *Vet Pathol*. 2022;59(4):528-45. doi:10.1177/03009858211057197.
199. Lee JS, Koh JY, Yi K, Kim YI, Park SJ, Kim EH, Kim SM, Park SH, Ju YS, Choi YK, Park SH. Single-cell transcriptome of bronchoalveolar lavage fluid reveals sequential change of macrophages during SARS-CoV-2 infection in ferrets. *Nat Commun*. 2021;12(1):4567. doi:10.1038/s41467-021-24807-0.
200. Speranza E, Williamson BN, Feldmann F, Sturdevant GL, Perez-Perez L, Meade-White K, Smith BJ, Lovaglio J, Martens C, Munster VJ, Okumura A, Shaia C, Feldmann H, Best SM, de Wit E. Single-cell RNA sequencing reveals SARS-CoV-2 infection dynamics in lungs of African green monkeys. *Sci Transl Med*. 2021;13(578). doi:10.1126/scitranslmed.abe8146.
201. Method of the Year 2019: Single-cell multimodal omics. *Nature Methods*. 2020;17(1):1-. doi:10.1038/s41592-019-0703-5.
202. Szabo PA, Levitin HM, Miron M, Snyder ME, Senda T, Yuan J, Cheng YL, Bush EC, Dogra P, Thapa P, Farber DL, Sims PA. Single-cell transcriptomics of human T cells reveals tissue and activation signatures in health and disease. *Nat Commun*. 2019;10(1):4706. doi:10.1038/s41467-019-12464-3.
203. Koenitzer JR, Wu H, Atkinson JJ, Brody SL, Humphreys BD. Single-Nucleus RNA-Sequencing Profiling of Mouse Lung. Reduced Dissociation Bias and Improved Rare Cell-Type Detection Compared with Single-Cell RNA Sequencing. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2020;63(6):739-47. doi:10.1165/rcmb.2020-0095MA.
204. Wu H, Kirita Y, Donnelly EL, Humphreys BD. Advantages of Single-Nucleus over Single-Cell RNA Sequencing of Adult Kidney: Rare Cell Types and Novel Cell States Revealed in Fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2019;30(1):23-32. doi:10.1681/ASN.2018090912.

205. 10x Genomics. Spatially resolved biology. Novel insights about your tissue. Visualized. Available from: <https://www.10xgenomics.com/spatial-transcriptomics>. Accessed November 03, 2021.
206. Honzke K, Obermayer B, Mache C, Fathykova D, Kessler M, Dokel S, Wyler E, Baumgardt M, Lova A, Hoffmann K, Graff P, Schulze J, Mieth M, Hellwig K, Demir Z, Biere B, Brunotte L, Mecate-Zambrano A, Bushe J, Dohmen M, Hinze C, Elezkurtaj S, Tonnies M, Bauer TT, Eggeling S, Tran HL, Schneider P, Neudecker J, Ruckert JC, Schmidt-Ott KM, Busch J, Klauschen F, Horst D, Radbruch H, Radke J, Heppner F, Corman VM, Niemeyer D, Muller MA, Goffinet C, Mothes R, Pascual-Reguant A, Hauser AE, Beule D, Landthaler M, Ludwig S, Suttorp N, Witzernath M, Gruber AD, Drosten C, Sander LE, Wolff T, Hippenstiel S, Hocke AC. Human lungs show limited permissiveness for SARS-CoV-2 due to scarce ACE2 levels but virus-induced expansion of inflammatory macrophages. *Eur Respir J.* 2022;60(6). doi:10.1183/13993003.02725-2021.

## 10. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Peter Pennitz, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchung der pulmonalen Genexpression auf Einzelzellebene in der (Pneumokokken)-Pneumonie / Investigation of pulmonary gene expression at the single cell level in (pneumococcal) pneumonia“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet. Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## 11. Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

**Peter Pennitz hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:**

### Publikation 1:

Goekeri C, **Pennitz P**, Groenewald W, Behrendt U, Kirsten H, Zobel CM, Berger S, Heinz GA, Mashreghi MF, Wienhold SM, Dietert K, Dorhoi A, Gruber AD, Scholz M, Rohde G, Suttorp N, CAPNETZ Study Group, Witzenrath M<sup>#</sup>, Nouailles G<sup>#</sup>. MicroRNA-223 Dampens Pulmonary Inflammation during Pneumococcal Pneumonia. *Cells*. 2023 Mar 21;12(6):959. doi: 10.3390/cells12060959. <sup>#</sup>: geteilte Letztautorenschaft.

Beitrag im Einzelnen: Bei der in dieser Dissertation beschriebenen Isolation von Lungenzellen zur Einzelzell-Sequenzierung wurde eine vierte Versuchsgruppe von mit *Streptococcus pneumoniae* (*S. pn*) infizierten MicroRNA-223-/- (miR 223-/-) *Knockout*-Mäusen mitgeführt (Abbildung 7, zweite Pipettenspitze). Der sequenzierte Datensatz dieser Versuchsgruppe wurde mit der *S. pn*-infizierten Versuchsgruppe dieser Arbeit sowie der mit Phosphatpuffer (PBS) scheininfizierten Kontrollgruppe integriert. Alle Aussagen das Transkriptom der miR-223-/- *Knockout*-Mäuse betreffend wurden auf Grundlage des Vergleichs zu den in dieser Dissertation beschriebenen Gruppen getroffen. UMAP-Darstellungen enthalten die Zellen der oben beschriebenen Versuchsgruppen dieser Dissertation. Insbesondere betrifft das die Abbildungen 5 sowie S5 und S6 der Veröffentlichung, die sich mit der Analyse der Einzelzell-Sequenzierungsdaten befassen. Ich war außerdem an der Planung, Organisation und Durchführung der Experimente, der Datenanalyse sowie Finalisierung des Manuskripts und Abbildungen beteiligt.

Publikation 2: **Pennitz P\***, Goekeri C\*, Trimpert J, Wyler E, Ebenig A, Weissfuss C, Mühlebach MD, Witzenrath M, Nouailles G. Protocol for dissociation of murine and hamster derived lung tissue for single-cell transcriptome analysis. *STAR Protoc*. 2022;4(1):101957. doi: 10.1016/j.xpro.2022.101957. <sup>\*</sup>: geteilte Erstautorenschaft.

Beitrag im Einzelnen: Das in dieser Dissertation optimierte und validierte Protokoll zur Isolation von Lungenzellen zur Einzelzell-Sequenzierung im infektiologischen Kontext wurde, inklusive der mikroskopischen Zellzahlbestimmung und durchflusszytometrischen Qualitätskontrolle, als Schritt für Schritt Protokoll mit beispielhaft dargestellten zu erwartenden Ergebnissen publiziert. Die in Abbildung 5 dargestellten Lungenzellen entspre-

chen denen der Kontrollgruppe (Scheininfection der Versuchstiere mit PBS) dieser Dissertation. Ich war an der Planung und Erstellung des Manuskripts, der Abbildungen sowie der Anwendung der bioinformatischen Analyse wesentlich beteiligt.

Publikation 3:

**Pennitz P\***, Kirsten H\*, Friedrich VD, Wyler E, Goekeri C, Obermayer B, Heinz GA, Mashreghi MF, Büttner M, Trimpert J, Landthaler M, Suttorp N, Hocke AC, Hippenstiel S, Tönnies M, Scholz M, Kuebler WM, Witzenrath M, Hoenzke K, Nouailles G. A pulmonologist's guide to perform and analyse cross-species single-lung-cell transcriptomics. *Eur Respir Rev.* 2022;31(165):220056. doi: 10.1183/16000617.0056-2022. \*: geteilte Erstautorenschaft.

Beitrag im Einzelnen: Der im Rahmen dieser Dissertation entstandene Sequenzierungsdatensatz der Kontrollgruppe (Scheininfection der Versuchstiere mit PBS) wurde mit dem Datensatz der Kontrollgruppe aus der von Nouailles *et al.* 2021 und Kontrollgruppen aus humanen Einzelzell-Sequenzierungsdaten unseres Instituts (Honzke *et al.* 2022) sowie Einzelzell-Sequenzierungs-Datensätzen der Publikationen von Travaglini *et al.* 2020, Raredon *et al.* 2019 und Speranza *et al.* 2021 integriert, um in einem speziesübergreifenden Vergleich die Möglichkeiten der Einzelzell-Sequenzierung für die pneumologische Forschung aufzuzeigen [115, 144, 170, 200, 206]. Die in Abbildung 2 mit *Mouse* bezeichneten Frequenzen des Kreisdiagramms, die so bezeichnete UMAP-Darstellung und der *Stress-Score* entsprechen den Daten der Kontrollgruppe dieser Dissertation. Des Weiteren entspricht die in Tabelle 1 beschriebene Methodik der Spezies Maus dem in dieser Dissertation etablierten und vorgestellten Protokoll. Ich war außerdem an der Erstellung des Manuskripts, der Abbildungen sowie der Festlegung der bioinformatischen Analysestrategie und deren Durchführung und Interpretation wesentlich beteiligt.

---

Unterschrift des Doktoranden

---

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

## **12. Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## 13. Publikationsliste

### Veröffentlichungen:

Nouailles G\*, Adler JM\*, **Pennitz P**, Teixeira Alves LG, Peidli S, Baumgart M, Bushe J, Voss A, Langenhagen A, Pott F, Kazmierski J, Goekeri G, Praktiknjo SD, Simmons S, Xing N, Langner C, Vidal RM, Abdelgawad A, Cichon G, Corman VM, Niemeyer D, Blüthgen N, Wu H, Gruber AD, Goffinet C, Osterrieder N, Landthaler M, Witzernath M, Wyler E#, Kunec D#, Trimpert J#. Live-attenuated vaccine sCPD9 elicits superior mucosal and systemic immunity to SARS-CoV-2 variants in hamsters. *Nat Microbiol.* 2023. doi: 10.1038/s41564-023-01352-8. \*: geteilte Erstautorenschaft, #: geteilte Letztautorenschaft.

Goekeri C, **Pennitz P**, Groenewald W, Behrendt U, Kirsten H, Zobel CM, Berger S, Heinz GA, Mashreghi MF, Wienhold SM, Dietert K, Dorhoi A, Gruber AD, Scholz M, Rohde G, Suttorp N, CAPNETZ Study Group, Witzernath M#, Nouailles G#. MicroRNA-223 Dampens Pulmonary Inflammation during Pneumococcal Pneumonia. *Cells.* 2023 Mar 21;12(6):959. doi: 10.3390/cells12060959. #: geteilte Letztautorenschaft.

**Pennitz P\***, Goekeri C\*, Trimpert J, Wyler E, Ebenig A, Weissfuss C, Mühlebach MD, Witzernath M, Nouailles G. Protocol for dissociation of murine and hamster derived lung tissue for single-cell transcriptome analysis. *STAR Protoc.* 2022;4(1):101957. doi: 10.1016/j.xpro.2022.101957. \*: geteilte Erstautorenschaft.

**Pennitz P\***, Kirsten H\*, Friedrich VD, Wyler E, Goekeri C, Obermayer B, Heinz GA, Mashreghi MF, Büttner M, Trimpert J, Landthaler M, Suttorp N, Hocke AC, Hippenstiel S, Tönnies M, Scholz M, Kuebler WM, Witzernath M, Hoenzke K, Nouailles G. A pulmonologist's guide to perform and analyse cross-species single-lung-cell transcriptomics. *Eur Respir Rev.* 2022;31(165):220056. doi: 10.1183/16000617.0056-2022. \*: geteilte Erstautorenschaft.

Wyler E\*, Adler JM\*, Eschke K, Teixeira Alves G, Peidli S, Pott F, Kazmierski J, Michalick L, Kershaw O, Bushe J, Andreotti S, **Pennitz P**, Abdelgawad A, Postmus D, Goffinet C,

## Publikationsliste

Kreye J, Reincke SM, Prüss H, Blüthgen N, Gruber AD, Kuebler WM, Witzentrath M, Landthaler M, Nouailles G<sup>#</sup>, Trimpert J<sup>#</sup>. Key benefits of dexamethasone and antibody treatment in COVID-19 hamster models revealed by single-cell transcriptomics. *Mol Ther.* 2022;30(5):1952-1965. doi: 10.1016/j.ymthe.2022.03.014. \*: geteilte Erstautorenschaft, #: geteilte Letztautorenschaft.

Nouailles G\*, Wyler E\*, **Pennitz P**, Postmus D, Vladimirova D, Kazmierski J, Pott F, Dietert K, Muelleder M, Farztdinov V, Obermayer B, Wienhold SM, Andreotti S, Hoefler T, Sawitzki B, Drosten C, Sander LE, Suttorp N, Ralser M, Beule D, Gruber AD, Goffinet C, Landthaler M, Trimpert J<sup>#</sup>, Witzentrath M<sup>#</sup>. Temporal omics analysis in Syrian hamsters unravel cellular effector responses to moderate COVID-19. *Nat Commun.* 2021;12(1):4869. doi:10.1038/s41467-021-25030-7. \*: geteilte Erstautorenschaft, #: geteilte Letztautorenschaft.

### Abstracts:

**Pennitz P**, Kirsten H, Wyler E, Goekeri C, Obermayer B, Heinz GA, Mashreghi MF, Trimpert J, Landthaler M, Suttorp N, Hocke AC, Hippenstiel S, Tönnies M, Scholz M, Kuebler WM, Witzentrath M, Hoenzke K, Nouailles G. Integrational approaches for cross-species analysis of lung pathologies at single-cell resolution [Abstract]. *Pneumologie.* 2022; 76(S 01): S59-S60. doi: 10.1055/s-0042-1747823

Nouailles G, Wyler E, **Pennitz P**, Postmus D, Vladimirova D, Kazmierski J, Pott F, Dietert K, Muelleder M, Farztdinov V, Obermayer B, Wienhold SM, Andreotti S, Hoefler T, Sawitzki B, Drosten C, Sander LE, Suttorp N, Ralser M, Beule D, Gruber AD, Goffinet C, Landthaler M, Trimpert J, Witzentrath M. Single-cell-sequencing in SARS-COV-2-infected hamsters sheds light on endothelial cell involvement in COVID-19 [Abstract]. *European Respiratory Journal* 2021; 58: Suppl. 65, PA2355. doi: 10.1183/13993003.congress-2021.PA2355

**Pennitz P**, Goekeri C, Behrendt U, Gutbier B, Wienhold SM, Witzentrath M, Nouailles G (2020). Lung Tissue Dissociation and Viable Single Cell Preparation for Single-Cell RNA-Seq – First Steps towards a Murine Pneumonia Atlas [Abstract]. *Pneumologie.* 2020; 74(S01): 21 – 21. doi:10.1055/s-0039-3403106.



**Konferenzbeiträge:**

Vortrag:

63. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V.  
29. März – 1. April 2023, Düsseldorf.

**Pennitz P**, Friedrich VD, Wyler E, Adler JM, Postmus D, Andreotti S, Teixeira-Alves LG, Kazmierski J, Pott F, Hoefler T, Goekeri C, Landthaler M, Goffinet C, Trimpert J, Scholz M, Witzenrath M, Kirsten H, Nouailles G. Interspecies analysis to dissect cellular transcriptomic signatures of humans and hamsters in COVID-19.

Vortrag:

26. Symposium: “Infection and Immune Defense“ of the DGfI and DGHM Study Group  
Infection Immunology, 22. – 24. März 2023, Burg Rothenfels.

**Pennitz P**, Friedrich VD, Wyler E, Adler JM, Postmus D, Andreotti S, Teixeira-Alves LG, Kazmierski J, Pott F, Hoefler T, Goekeri C, Landthaler M, Goffinet C, Trimpert J, Scholz M, Witzenrath M, Kirsten H, Nouailles G. Interspecies analysis to dissect cellular transcriptomic signatures of humans and hamsters in COVID-19.

Flashtalk & Poster

e:Med Meeting 2022 on Systems Medicine, 28. – 30. November 2022, Heidelberg.

**Pennitz P**, Kirsten H, Friedrich VD, Wyler E, Goekeri C, Obermayer B, Heinz GA, Mashreghi MF, Büttner M, Trimpert J, Landthaler M, Suttorp N, Hocke AC, Hippenstiel S, Tönnies M, Scholz M, Kuebler WM, Witzenrath M, Hoenzke K, Nouailles G. Integrational approaches for cross-species analysis of lung pathologies at single-cell resolution

Vortrag:

DZL Academy Symposium 2022: “Lung development, repair and regeneration”, 21. – 23. November 2022, Schloss Rauischholzhausen

**Pennitz P**, Kirsten H, Friedrich VD, Wyler E, Goekeri C, Obermayer B, Heinz GA, Mashreghi MF, Büttner M, Trimpert J, Landthaler M, Suttorp N, Hocke AC, Hippenstiel S, Tönnies M, Scholz M, Kuebler WM, Witzenrath M, Hoenzke K, Nouailles G.

Integrational approaches for cross-species analysis of lung pathologies at single-cell resolution

## Publikationsliste

### Poster:

SCOG Conference “Single Cell Omics in Clinical Applications”, 07. – 09. November 2022, Bonn.

**Pennitz P**, Friedrich VD, Wyler E, Adler JM, Postmus D, Andreotti S, Teixeira-Alves LG, Kazmierski J, Pott F, Hoefler T, Goekeri C, Landthaler M, Goffinet C, Trimper J, Scholz M, Witzernath M, Kirsten H, Nouailles G. Interspecies analysis to dissect cellular transcriptomic signatures of humans and hamsters in COVID-19.

### Poster:

21st International Conference on Systems Biology, 08. – 12. Oktober 2022, Berlin.

**Pennitz P**, Kirsten H, Friedrich VD, Wyler E, Goekeri C, Obermayer B, Heinz GA, Mashreghi MF, Büttner M, Trimper J, Landthaler M, Suttorp N, Hocke AC, Hippenstiel S, Tönnies M, Scholz M, Kuebler WM, Witzernath M, Hoenzke K, Nouailles G. Integrational approaches for cross-species analysis of lung pathologies at single-cell resolution

### Poster:

3rd International Conference „Innate Immunity of the Lung – Improving Pneumonia Outcome”, 8. – 10. September 2022, Berlin.

**Pennitz P**, Friedrich VD, Wyler E, Adler JM, Postmus D, Andreotti S, Teixeira-Alves LG, Kazmierski J, Pott F, Hoefler T, Goekeri C, Landthaler M, Goffinet C, Trimper J, Scholz M, Witzernath M, Kirsten H, Nouailles G. Interspecies analysis to dissect cellular transcriptomic signatures of humans and hamsters in COVID-19.

### Vortrag:

62. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. 25. – 28. Mai 2022, Leipzig.

**Pennitz P**, Kirsten H, Wyler E, Goekeri C, Obermayer B, Heinz GA, Mashreghi MF, Trimper J, Landthaler M, Suttorp N, Hocke AC, Hippenstiel S, Tönnies M, Scholz M, Kuebler WM, Witzernath M, Hoenzke K, Nouailles G. Integrational approaches for cross-species analysis of lung pathologies at single-cell resolution

### Vortrag & Poster:

Herbsttagung 2021 der Sektion Zellbiologie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. 12. – 13. November 2021, Hannover.

**Pennitz P**, Kirsten H, Goekeri C, Behrendt U, Gutbier B, Heinz G, Mashreghi MF, Wienhold SM, Scholz M, Witzernath M, Nouailles G. Single-cell RNA-seq to improve the pathomechanistical understanding of community acquired pneumonia.

Poster:

e:Med Virtual Meeting 2021 on Systems Medicine, 20 – 22 September 2021, digital.

**Pennitz P**, Kirsten H, Goekeri C, Behrendt U, Gutbier B, Heinz G, Mashreghi MF, Wienhold SM, Witzernath M, Scholz M, Nouailles G. Single-cell RNA-seq for a murine pneumonia lung atlas improving pathomechanistical understanding of community acquired pneumonia.

Poster:

61. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. 25. – 28. März 2020, Leipzig.

**Pennitz P**, Goekeri C, Behrendt U, Gutbier B, Wienhold SM, Witzernath M, Nouailles G. Lung Tissue Dissociation and Viable Single Cell Preparation for Single-Cell RNA-Seq – First Steps towards a Murine Pneumonia Lung Atlas.

Aufgrund der anhaltenden Coronaviruspandemie wurde der Kongress auf 02. – 05. Juni 2021 verlegt und fand als online Veranstaltung statt. Die Poster-Vorstellung wurde als Kurzvortrag durchgeführt.

Vortrag:

Herbsttagung 2019 der Sektion Zellbiologie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. 29. – 30. November 2019, Berlin.

**Pennitz P**, Goekeri C, Behrendt U, Gutbier B, Wienhold SM, Witzernath M, Nouailles G. Lung Tissue Dissociation and Viable Single Cell Preparation for Single-Cell RNA-Seq – First Steps towards a Murine Pneumonia Lung Atlas

## 14. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen danksagen, ohne die es nicht möglich gewesen wäre, diese Dissertation zu verwirklichen.

Meinem Doktorvater Herrn Professor Martin Witzernath möchte ich für die Überlassung des Themas, die herausragende wissenschaftliche Beratung und Förderung während der gesamten Arbeit und darüber hinaus danken, ebenso wie für die Möglichkeit jederzeit Feedback zu erhalten sowie die zur Verfügung Stellung sämtlicher benötigter Infrastruktur.

Frau Dr. Geraldine Nouailles danke ich für die exzellente Betreuung und Möglichkeit der Rücksprache zu allen Belangen, ob direkt oder indirekt, die mit dieser Arbeit verbunden waren. Für die Möglichkeit des tiefen Eintauchens in das Feld der Immunologie inklusive der Einschätzung und Bewertung wissenschaftlicher Erkenntnisse und spannenden Diskussionen neu erschieener Veröffentlichungen, was mir insbesondere auch im Rahmen der anhaltenden Pandemiesituation durch COVID-19 einmalige Einblicke ermöglicht hat. Vielen Dank für Deinen umfassenden Zeitaufwand und Deine Motivation.

Herrn Dr. Holger Kirsten von der Universität Leipzig danke ich für eine grandiose und spannende Zusammenarbeit und viele umfangreiche Gelegenheiten in die Welt der Bioinformatik eintauchen zu können, ein Feld, das mir bis zum Erhalt der Sequenzierungsdaten gänzlich fremd war, ich aber sehr zu schätzen gelernt habe, insbesondere zu verstehen, wie Sätze und Argumente formuliert werden müssen, um von einem Computer Gewünschtes und an Stelle einer Fehlermeldung zu erhalten. Des Weiteren danke ich Frau Dr. Birgitt Gutbier und Frau Dr. Sandra Wienhold, ohne die ein reibungsloser Laboralltag, wie wir Doktoranden ihn gewohnt sind und schätzen, nicht möglich wäre. Außerdem danke ich den Technischen Assistentinnen Ulrike Behrendt, Silke Dusatko und Denise Barthel sowie Herrn Dr. Cengiz Goekeri. Liebe Ulrike, lieber Cengiz, vielen Dank für Eure Geduld bei der Einarbeitung in neue Methoden und Protokolle. Ich danke Herrn Dr. Holger Müller-Redetzky, der mir schon während des Studiums den Weg in die Welt der experimentellen Wissenschaft ermöglicht hat, sowie allen weiteren Mitarbeitern des Instituts und der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie und allen Mit-Doktoranden unseres Instituts, durch die eine familiäre Stimmung selbst an stressigen Tagen bestand. Frau Dr. Gitta Anne Heinz, Herrn Dr. Mir-Farzin Mashreghi und Herrn Dr. Frederik Heinrich vom DRFZ sowie Herrn Dr. Ilias Angelidis und Herrn Dr. Herbert Schiller von der AG Schiller des Helmholtz Zentrums München danke ich für die umfassende Beratung und Unterstützung bei der Planung unserer ersten Einzelzell-Sequenzierungs-Experimente inklusive der Sequenzierung und Alignierung (DRFZ) sowie der Überlassung ihres Zellisoliationsprotokolls für die Etablierung (AG Schiller). Meiner Familie danke ich für die endlose Unterstützung während meines gesamten Studiums und der Promotionszeit sowie allen meinen Freunden/Freundinnen.

# 15. Bescheinigung Statistik



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBiKE)

Direktor: Prof. Dr. Frank Konietzschke

Name, Vorname: Pennitz, Peter  
Emailadresse: [REDACTED]  
Matrikelnummer: [REDACTED]  
PromotionsbetreuerIn: Prof. Dr. Martin Witzenzath  
Promotionsinstitution/Klinik: Klinik für Pneumologie, Beatmungs-  
medizin und Intensivmedizin, mit Arbeitsbereich Schlafmedizin

Postanschrift:  
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin  
Besucheranschrift:  
Reinhardtstr. 58 | 10117 Berlin  
Tel. +49 (0)30 450 562171  
frank.konietzschke@charite.de  
<https://biometrie.charite.de/>



## Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass Herr Peter Pennitz innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBiKE) bei mir eine statistische Beratung zu einem Promotionsvorhaben wahrgenommen hat. Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

- Termin 1: 05.06.2023

Diese Bescheinigung garantiert nicht die richtige Umsetzung der in der Beratung gemachten Vorschläge, die korrekte Durchführung der empfohlenen statistischen Verfahren und die richtige Darstellung und Interpretation der Ergebnisse. Die Verantwortung hierfür obliegt allein dem Promovierenden. Das Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie übernimmt hierfür keine Haftung.

Datum: 23.06.2023

Name der Beraterin: [REDACTED]

Unterschrift Beraterin, Institutsstempel

