

Aus dem Biochemisch-Pharmakologischen Zentrum,
Forschungsbereich für Translationale Entzündungsforschung und
Core Facility für Single Cell Multiomics
Leitung: Prof. Dr. Holger Garn
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Die pathophysiologische Rolle des Atemwegepithels und dessen
zielgerichtete Freisetzung kleiner nicht-kodierender RNAs in
extrazellulären Vesikeln bei Asthma bronchiale**

Kumulative Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
doctor medicinae (Dr. med.)

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Viktoria Elisabeth Maria Schindler
aus München

Marburg, 2023

Angenommen vom Fachbereich der Medizin der Philipps-Universität Marburg

am: 07.06.2023

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekanin: Prof. Dr. Denise Hilfiker-Kleiner

Referent: Prof. Dr. Holger Garn

Korreferent: Prof. Dr. Leon Schulte

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1 Zusammenfassung.....	9
2 Summary	11
3 Einleitung	13
3.1 Asthma	13
3.1.1 Epidemiologie.....	13
3.1.2 Klinik.....	13
3.1.3 Pathogenese und Pathophysiologie.....	15
3.1.3.1 Pathogenese.....	15
3.1.3.2 Pathophysiologie.....	15
3.1.3.3 Asthma Phäno- und Endotypen	16
3.1.3.4 Das Atemwegsepithel	18
3.2 Extrazelluläre Vesikel	19
3.2.1 Definition	19
3.2.2 Einteilung	19
3.2.3 Zusammensetzung von EVs	20
3.2.4 Biologische Funktion von EVs.....	21
3.2.5 EVs als Träger extrazellulärer RNA	22
4 Zusammenfassung der Veröffentlichungen und Darstellung des Eigenanteils an den Publikationen	24
4.1 Role of airway epithelial cells in the development of different asthma phenotypes.....	24
4.1.1 Zusammenfassung.....	24
4.1.1.1 Das Atemwegsepithel in T2 ^{HIGH} Asthma	24
4.1.1.2 Das Atemwegsepithel in T2 ^{LOW} Asthma	25
4.1.1.3 Epigenetische Regulation von Atemwegsepithelzellen in Asthma.....	26

Inhaltsverzeichnis

4.1.2	Darstellung des Eigenanteils.....	26
4.2	Directed release of differential exosomal small non-coding RNA profiles by bronchial epithelial cells from healthy and asthmatic subjects.....	27
4.2.1	Zusammenfassung.....	27
4.2.1.1	Einleitung	27
4.2.1.2	Zielsetzung und Hypothesen	27
4.2.1.3	Durchführung	28
4.2.1.4	Ergebnisse	28
4.2.2	Darstellung des Eigenanteils.....	30
5	Diskussion	31
5.1	Methodische Limitationen der EV Diagnostik.....	32
5.1.1	Ko-Isolation nicht-vesikulärer RNA-bindender Moleküle.....	32
5.1.1.1	Verunreinigung von EV Präparaten durch nicht-vesikuläre Bestandteile	32
5.1.1.2	ISEV-Einteilung der EV Isolationsmethoden anhand Spezifität und Ausbeute.....	33
5.1.2	Morphologische und inhaltliche Unterschiede verschiedener Vesikelpopulationen	34
5.1.2.1	Größenverteilung apikaler und basolateraler Partikel.....	35
5.1.2.2	Tetraspanin Expression verschiedener EV-Subtypen	35
5.1.2.3	Variable vesikuläre RNA Zusammensetzung in EV- Subtypen.....	36
5.2	Einordnung in den fachwissenschaftlichen Kontext	36
5.2.1	Die Rolle des Atemwegsepithels in der Entwicklung von Asthma.....	36
5.2.2	Extrazelluläre Vesikel in der Pathophysiologie von Asthma bronchiale	38
5.2.2.1	Differentiell exprimierte miRNA in basolateralen und apikalen EVs	38
5.2.2.2	Differentiell exprimierte miRNAs in EVs der gesunden und asthmatischen Kohorte	40
5.2.2.3	Zelluläre Alterungsprozesse in Asthma bronchiale.....	42

Inhaltsverzeichnis

5.3	Ausblick und Schlussfolgerung	43
6	Literaturverzeichnis	45
7	Anhang	65
7.1	Verzeichnis der Veröffentlichungen.....	65
7.2	Veröffentlichung 1	66
7.3	Veröffentlichung 2	75
7.4	Verzeichnis akademischer Lehrer	92
7.5	Danksagung	94

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

BAL	Bronchioalveoläre Lavage
BALF	Bronchioalveoläre Lavage Flüssigkeit
CCL	CC-Chemokin Ligand
CD	Cluster of Differentiation
COPD	Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung
CXCL	CXC-Chemokin Ligand
DAMP	Danger Associated Molecular Pattern
EMT	Epitheliale-Mesenchymale Transition
EV	Extrazelluläre Vesikel
FMT	Fibroblast-zu-Myofibroblast Transition
FOXO3	Forkhead-Box-Protein O3
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
HDL	High-Density Lipoprotein
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HSP	Hitzeschockprotein
IFN- γ	Interferon Gamma
IL	Interleukin
ILC	Innate Lymphoid Cell
ILV	Intraluminale Vesikel
IRF	Interferon Regulatorischer Faktor
ISEV	Internationale Gesellschaft für Extrazelluläre Vesikel
LDL	Low-Density Lipoprotein
lncRNA	Lange nicht kodierende RNA
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MHC	Major Histocompatibility Complex

Abkürzungsverzeichnis

miRNA	MicroRNA
mRNA	Messenger RNA
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
MUC5AC	Mucin 5AC
MVE	Multivesikuläre Endosomen
MYD88	Myeloid Differentiation Primary Response 88
NanoFCM	Nano Flow Cytometry
ncoRNA	Nukleoläre RNA
ncRNA	Nukleäre RNA
NETs	Neutrophile Extrazelluläre Traps
NF- κ b	Nukleärer Faktor κ b
NFKB1	Nukleärer Faktor B1
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NTA	Nanopartikel Tracking Analyse
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
piRNA	PIWI-interagierende RNA
PRR	Pattern Recognition Rezeptor
rRNA	Ribosomale RNA
RUNX3	Runt-Related Transkriptionsfaktor 3
SEC	Size Exclusion Chromatography
STAT6	Signal Transducer and Activator of Transcription 6
T2 ^{HIGH}	Typ-2-High
T2 ^{LOW}	Typ-2-Low
TGF- β	Transforming Growth Factor
TGFB1	Transforming Growth Factor B1
T _h -Zelle	T-Helferzelle

Abkürzungsverzeichnis

TLR	Toll-Like Rezeptor
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor α
TP53	Tumorsuppressorprotein 53
tRNA	Transfer RNA
TSLP	Thymic Stromal Lymphopoietin

Zusammenfassung

1 Zusammenfassung

Asthma bronchiale ist eine chronisch entzündliche Erkrankung mit heterogener Pathophysiologie. Das Atemwegsepithel nimmt eine zentrale pathophysiologische Rolle ein. Atemwegsepithelzellen weisen eine hohe strukturelle und funktionelle Diversität und Plastizität auf, die abhängig von den unterschiedlichen Asthma Phänotypen und Krankheitsstadien variiert. Sie sind pathophysiologisch nicht nur passiv von entzündlichen Veränderungen betroffen, sondern nehmen aktiv an immunologischen Prozessen teil. Eine wichtige Form der interzellulären Kommunikation zwischen Epithelzellen und anderen Immunzellen ist hierbei der Informationsaustausch mittels extrazellulärer Vesikel (EV). EVs werden von nahezu jeder Körperzelle produziert. Sie übertragen Moleküle der Ursprungszelle, wie Proteine, Lipide und Ribonukleinsäuren, auf die Zielzelle und können diese so direkt beeinflussen. MicroRNA sind kleine nicht-kodierende RNA, die über posttranskriptionale Modifikation an der Genregulation beteiligt sind. Über ihren Transport in EVs können sie die Zielzelle sowohl über Modifikation der Proteintranslation als auch über direkte Rezeptor-Interaktion immunologisch beeinflussen.

In dieser kumulativen Dissertationsarbeit soll anhand zweier Publikationen die pathophysiologische Rolle des Atemwegsepithels in Asthma bronchiale erläutert werden. Hierbei wird der Fokus insbesondere auf dessen zielgerichtete Freisetzung kleiner nicht-kodierender miRNA gelegt. In der Übersichtsarbeit mit dem Titel „Role of airway epithelial cells in the development of different asthma phenotypes“ werden die Unterschiede in den funktionellen und strukturellen Eigenschaften der Atemwegsepithelzellen anhand der verschiedenen Asthma Phänotypen und Krankheitsstadien dargestellt.

In der beiliegenden experimentellen Arbeit mit dem Titel „Side-Directed Release of Differential Extracellular Vesicle-associated microRNA Profiles from Bronchial Epithelial Cells of Healthy and Asthmatic Subjects“ wurden vesikuläre miRNA Profile von durch Atemwegsepithelzellen produzierten EVs abhängig vom jeweiligen Sezernierungsort untersucht. In dieser Arbeit konnten EVs sowohl aus der apikalen als auch basolateralen Domäne isoliert werden und unterschieden sich anhand ihrer Konzentration, Größe und Oberflächenmarkerexpression voneinander. Darüber hinaus wurden signifikante Unterschiede in den vesikulären miRNA Profilen der beiden Domänen nachgewiesen. Außerdem wichen die vesikulären miRNA Profile gesunder und asthmatischer Probanden innerhalb eines Kompartiments voneinander ab. Differentiell exprimierte

Zusammenfassung

miRNA waren abhängig vom Sezernierungsort mit unterschiedlichen Signalwegen assoziiert.

Zusammenfassend beschreibt diese Arbeit die zentrale Rolle des Atemwegsepithels in der Entstehung und Aufrechterhaltung von Asthma bronchiale. Insbesondere wurde dargelegt, dass sich das vesikuläre Profil kleiner nicht-kodierender RNAs in Gesunden und Asthmatikern voneinander unterscheidet. Die Identifizierung und Charakterisierung der verschiedenen Asthma Phänotypen ist für die Etablierung neuer, individualisierter Therapiestrategien zukünftig wichtig. Komplexe vesikuläre miRNA Profile können zur Identifikation und Phänotypisierung von Asthma beitragen sowie zur Erkennung von Krankheitsstadien und Therapieprädiktoren genutzt werden. Sie bergen damit großes diagnostisches und therapeutisches Potential in der Erkennung und Behandlung von Asthma bronchiale.

Summary

2 Summary

Bronchial asthma is a chronic inflammatory disease with a diverse pathophysiology. The airway epithelium plays a central part in the pathophysiology of Asthma. Airway epithelial cells display high structural and functional diversity and plasticity, each of which varies depending on the different asthma phenotypes and disease stages. Pathophysiologically, they are not only passively affected by inflammatory events, but actively participate in immunological activities. An important form of intercellular communication between epithelial cells and other immune cells in this context is the exchange of information by extracellular vesicles (EVs). EVs are produced by almost every cell in the body. They transfer molecules from the cell of origin, such as proteins, lipids, and ribonucleic acids, to the recipient cell and can thus directly influence it. MicroRNA are small non-coding RNA involved in gene regulation via post-transcriptional modification. Through transportation in EVs, they can immunologically influence the target cell by modifying protein translation as well as through direct receptor interaction.

In this cumulative dissertation, the pathophysiological role of the airway epithelium in bronchial asthma will be explained on the basis of two publications. In particular, the focus will be on the targeted release of small non-coding miRNA by airway epithelial cells. In the review "Role of airway epithelial cells in the development of different asthma phenotypes", the differences in the functional and structural properties of airway epithelial cells are presented based on the different asthma phenotypes and disease stages.

In the attached experimental article "Side-Directed Release of Differential Extracellular Vesicle-associated microRNA Profiles from Bronchial Epithelial Cells of Healthy and Asthmatic Subjects", vesicular miRNA profiles of EVs produced by airway epithelial cells are analyzed depending on their site of secretion. It is demonstrated that EVs can be isolated from both the apical and basolateral domains and differ from each other based on their concentration, size, and surface marker expression. Additionally, vesicular miRNA profiles show significant differences in the two domains. Furthermore, vesicular miRNA profiles of healthy and asthmatic subjects varied within the same compartment. Differentially expressed miRNA were associated with different signaling pathways depending on the site of secretion.

In summary, this work outlines the central role of the airway epithelium in the development and maintenance of bronchial asthma. In particular, it was demonstrated that the vesicular profile of small noncoding RNAs differed in healthy individuals and

Summary

asthmatics. The identification and characterization of different asthma phenotypes will be important for the future establishment of novel individualized therapeutic strategies. Complex vesicular miRNA profiles can contribute to the identification and phenotyping of asthma as well as be used to detect disease stages and treatment predictors. Thus, they hold great diagnostic and therapeutic potential in the detection and treatment of bronchial asthma.

3 Einleitung

3.1 Asthma

Asthma bronchiale ist eine heterogene, multifaktorielle, chronisch-entzündliche Erkrankung der Atemwege. Derzeit sind weltweit über 300 Millionen Menschen von der Erkrankung betroffen (Vos et al., 2016). 2015 war Asthma bronchiale und dessen Folgen vor allem in Entwicklungsländern für über 390.000 Todesfälle verantwortlich (Wang et al., 2016). Damit gehört Asthma zu einer der bedeutendsten Volkskrankheiten weltweit.

Die Erkrankung tritt häufig bereits im Kindesalter auf, ein Erstauftreten ist jedoch in jedem Lebensalter möglich (Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), 2018). Das klinische Erscheinungsbild ist gekennzeichnet durch bronchiale Hyperreagibilität und/oder reversible bronchiale Obstruktion von unterschiedlicher Intensität und zeitlichem Auftreten (Global Initiative for Asthma (GINA), 2019).

3.1.1 Epidemiologie

Weltweit schwanken die Prävalenzdaten stark, insgesamt ist eine Zunahme der Erkrankung vor allem in Entwicklungsländern zu beobachten (Pearce et al., 2007), während in Industrieländern die Asthma-Prävalenz allmählich stagniert (Sears, 2014). Dadurch nähern sich die niedrigeren Prävalenzraten in Entwicklungsländern denen der hochentwickelten westlichen Länder allmählich an (Anandan et al., 2010). Die Prävalenz für Asthma in Deutschland beträgt ca. 4% bei Kindern (Poethko-Müller et al., 2018) und ca. 8% bei Erwachsenen (Heidemann et al., 2021), womit Asthma zu einer der häufigsten Erkrankungen der deutschen Bevölkerung gehört.

3.1.2 Klinik

Das klinische Bild ist sehr variabel. Es reicht von mildereren Verläufen mit chronischem Husten und leichter Kurzatmigkeit bis hin zu akut lebensbedrohlichen Verläufen mit schwerer Dyspnoe und respiratorischer Erschöpfung. Die typische klinische Manifestation resultiert aus chronischen Entzündungsprozessen der Atemwege mit langfristig strukturellen Umbauprozessen, auch als *Airway-Remodeling* bezeichnet. Bei betroffenen Patienten kommt es nach Stimulus-Reiz zu einer bronchialen Hyperreagibilität und reversibler bronchialer Obstruktion (Global Initiative for Asthma (GINA), 2019). Verschiedene pathophysiologische Prozesse wie bronchiale Hypersekretion, neuromuskuläre Atemwegsobstruktion, Flüssigkeitseinlagerungen in

Einleitung

die Atemwege und *Airway-Remodeling* resultieren in der für die Erkrankung typischen Symptomatik. Unbehandelt führt die Erkrankung zu rezidivierenden Episoden anfallsartiger Atemnot, trockenem Husten mit nächtlicher und morgendlicher Betonung, thorakalem Engegefühl und Luftnot bis hin zu Erstickungsangst. Die Symptomatik kann sowohl in ihrer Intensität als auch in ihrem zeitlichem Auftreten variieren. Eine akute Zunahme der Symptomatik über das für den Patienten typische Krankheitsausmaß hinaus wird als Exazerbation oder akuter Asthmaanfall bezeichnet und erfordert eine Therapieänderung bzw. -intensivierung (Buhl et al., 2017). Exazerbationen variieren in ihrer Ausprägung und können durch frustrane Atemarbeit zu Zyanose, Bradykardie, Hypotonie, Erschöpfungszuständen bis hin zum Koma führen. Ein Asthmaanfall kann damit akut lebensbedrohlich verlaufen und intensivmedizinische Maßnahmen erfordern. Zwischen einzelnen Anfällen oder in frühen Stadien können lediglich unspezifische Symptome wie chronischer Husten, häufiges Räuspern und Kurzatmigkeit ohne die typischen Exazerbationen dominieren. (Global Initiative for Asthma (GINA), 2019). Auslöser für akute Asthmafälle sind unter anderem körperliche oder psychische Belastung, Allergenexposition, Atemwegsinfekte, Tabakrauch und andere inhalative Noxen (Jackson et al., 2008; Jayasinghe et al., 2015; Ritz et al., 2016; Sears et al., 2003; Thomson et al., 2004).

In vielen Fällen geht die Krankheitsaktivität vom Kindesalter bis in das Erwachsenenalter deutlich zurück oder persistiert vollständig (Bisgaard and Bonnelykke, 2010). Eine Fixierung der Erkrankung mit nicht reversibler bronchialer Obstruktion und dauerhaft eingeschränkter Lungenfunktion ist vor allem bei unbehandeltem Asthma beobachtbar (Bousquet et al., 2000). Unter adäquater Therapie jedoch kann sich die Lebenserwartung von Asthmatikern deutlich verbessern (Suissa and Ernst, 2001).

Das klinische Erscheinungsbild und die Krankheitsausprägung variiert von Patient zu Patient teils stark. Es werden daher anhand der klinischen Merkmale eines Patienten verschiedene Asthma-Phänotypen definiert. Hierunter werden sowohl das klinische Erscheinungsbild als auch die Ausprägung spezifischer Biomarker und das Therapieansprechen zusammengefasst. Begrifflich müssen Phänotypen von den sogenannten Endotypen abgegrenzt werden (Kuruvilla et al., 2019). Letztere werden anhand der zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen definiert (s. Kapitel 3.1.3.3). In der Literatur werden die Begriffe häufig synonym verwendet.

3.1.3 Pathogenese und Pathophysiologie

3.1.3.1 Pathogenese

Die Ursache der Entstehung von Asthma bronchiale ist nicht abschließend geklärt und Grundlage aktueller Forschung. Die Pathogenese ist ein sehr komplexer und interaktiver Prozess, der sich wahrscheinlich aus zwei Hauptfaktoren zusammen setzt: interne Faktoren (Wirtsfaktoren) und externe Faktoren (Umweltfaktoren) (National Asthma Education and Prevention Program, 2007). Diese führen im Zusammenspiel häufig in jungen Lebensjahren zu einer veränderten Immunantwort des angeborenen und adaptiven Immunsystems, die die Entstehung von Asthma begünstigen können (Eder et al., 2006).

Unter den intrinsischen Faktoren spielen neben Geschlecht und Körpergewicht vor allem die genetische Veranlagung eine wesentliche Rolle in der Asthmaentstehung (Fuseini and Newcomb, 2017; Peters et al., 2018). Diese kann allerdings nicht auf einzelne auslösende Gene zurückgeführt werden und ist für die unterschiedlichen Asthma-Phänotypen sehr variabel (Meyers, 2010).

Zu den extrinsischen Faktoren zählen Allergenkontakt, respiratorische Infektionen im Kindesalter und Exposition gegen Umweltfaktoren wie z.B. Tabakrauch, Luftverschmutzung und Ernährung (Bønnelykke et al., 2015; Esposito et al., 2014; Illi et al., 2006; Ma et al., 2016; Polosa and Thomson, 2013; Sears et al., 2003). Die Reaktion des intrinsischen Systems, v.a. das gestörte Zusammenspiel von Atemwegsepithel und Immunsystem, auf extrinsische Faktoren führt zu den charakteristischen pathophysiologischen Ausprägungen von Asthma (Potaczek et al., 2020).

3.1.3.2 Pathophysiologie

Der wesentliche pathophysiologische Mechanismus ist eine chronische Entzündung der Atemwege mit reversibler bronchialer Obstruktion. Letztere entsteht aus der Kontraktion glatter Bronchialmuskulatur (Bronchospasmus), einem bronchialen Wandödem und bronchialer Hypersekretion. Bei unzureichender Therapie kann es durch die chronische Entzündung zum Atemwegs-Remodeling und damit zu einer Fixation der obstruktiven Symptomatik kommen. Aufgrund der bronchialen Hyperreagibilität auf externe und interne Stimuli kommt es bei betroffenen Patienten zu der Symptom-verursachenden Bronchokonstriktion (Global Initiative for Asthma (GINA), 2019).

Für die individuelle pathophysiologische Ausprägung ist das Zusammenspiel von Veränderungen folgender zellulärer Systeme der Atemwege relevant: Immunsystem, Gefäßsystem, neuromuskuläres System und epitheliales bzw. subepitheliales System.

Einleitung

Diese Mechanismen sind eng miteinander vernetzt und beeinflussen sich gegenseitig über z.B. Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren (Holgate and Davies, 2009). Die genaue Zusammensetzung der Veränderungen variiert zwischen den verschiedenen asthmatischen Phänotypen. Gemeinsamkeit aller Phänotypen ist eine neuromuskuläre Hyperreagibilität, Hyperviskosität des Atemwegsekrets, Atemwegsödem und -verdickung sowie langfristig struktureller Umbau der Atemwege (An et al., 2007; Wang et al., 2015).

3.1.3.3 Asthma Phäno- und Endotypen

Asthma ist eine pathophysiologisch heterogene Erkrankung. Wie bereits beschrieben werden daher verschiedene Endotypen anhand der Pathophysiologie unterschieden. Demographische und klinische Merkmale eines Patienten hingegen werden definierten Asthma-Phänotypen zugeordnet. Mittlerweile sind zahlreiche Asthma Phäno- und Endotypen beschrieben und nach wie vor Gegenstand intensiver Forschung. Eine der ältesten und bekanntesten Einteilungen ist die Unterscheidung zwischen allergischem bzw. extrinsischem und nicht-allergischem bzw. intrinsischem Asthma (Rackemann, 1947). Charakteristika des allergischen Asthmas sind der frühe Erkrankungsbeginn, begleitende Komorbiditäten bzw. eine familiäre Prädisposition für Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis. Hierzu gehören das atopische Ekzem, die allergische Rhinokonjunktivitis und die nachgewiesene Sensibilisierung gegen typische Allergene wie Pollen, Gräser oder Milben, und/oder Nahrungsmittelallergien. Patienten mit allergischem Asthma sprechen häufig gut auf inhalative Glukokortikoide an (Braido et al., 2018; Mathur and Viswanathan, 2014). Die Krankheitsentstehung beruht auf einer IgE-vermittelten allergischen Reaktion vom Soforttypen nach Allergenkontakt und auf einer nachfolgenden zellulären Reaktion vom Spättypen. In Sputum-Untersuchungen dieser Patienten findet sich häufig dominierend eine eosinophile Entzündung. Beim nicht-allergischen bzw. intrinsischen Asthma hingegen spielen verschiedene Zelltypen wie neutrophile oder eosinophile Granulozyten eine Rolle im Entzündungsprozess (Kuo et al., 2017). Dieser Phänotyp ist nicht mit einer atopischen Diathese und nicht mit dem Auftreten von Allergien assoziiert. Betroffene Patienten sprechen oft nur unzureichend auf eine Glukokortikoidtherapie an (Gauthier et al., 2015). Die Zuordnung zu einer der beiden Gruppen hat auch therapeutische Konsequenz. Bei Patienten mit nachgewiesener allergischer Komponente stehen spezifische Therapiemöglichkeiten wie neuen Biologikatherapien und die spezifische Immuntherapie zur Verfügung. Außerdem ist die Allergenvermeidung von nachgewiesener Wirksamkeit (Ingram and Kraft, 2012; Virchow et al., 2016).

Einleitung

Eine andere Einteilung richtet sich nach dem dominierenden Zytokinprofil und deren Ursprungszellen. Es werden zwei wesentliche Endotypen der Erkrankung anhand der in der Entzündung dominierenden T-Helferzell-Subtypen voneinander unterschieden: der häufigere Type-2-High ($T2^{\text{HIGH}}$) und der seltenere Type-2-Low ($T2^{\text{LOW}}$) Typ (Kuo et al., 2017). Die ursprüngliche Namensgebung von $T2^{\text{HIGH}}$ als „ T_h2 -Asthma“ bezog sich auf den erhöhten Nachweis der Zytokine Interleukin (IL)-2, -3, -4, -5, -13 und Granulozyten/Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) in bronchoalveolären Lavage (BAL)-Proben von Patienten mit allergischem Asthma. Diese ist durch eine Häufung CD4-positiver T2-Helferzellen (T_h2 -Zelle) und einem Shift in Richtung einer T_h2 -dominierten T-Zellantwort charakterisiert. Die T_h1 -Zellantwort ist nur gering ausgeprägt (Robinson et al., 1992). Allerdings können Zytokine nicht nur von Allergen-spezifischen T-Helferzellen (T_h -Zellen), sondern auch von Allergen-unspezifischen Zellen des angeborenen Immunsystems wie basophilen und eosinophilen Granulozyten oder Mastzellen gebildet werden, weshalb im aktuellen Sprachgebrauch die Bezeichnung „ $T2^{\text{HIGH}}$ “ bevorzugt werden sollte (O’Garra, 1998; Tindemans et al., 2014). Das charakteristische Merkmal der $T2^{\text{HIGH}}$ Entzündungsreaktion ist die Polarisierung in Richtung einer T_h2 -dominierten Immunantwort mit dem T_h2 -typischen oben beschriebenen Zytokinmilieu. Das Zusammenspiel von T_h2 -Zellen, B-Zellen und eosinophilen Granulozyten zur Abwehr parasitärer Erreger ist vergleichbar mit der in $T2^{\text{HIGH}}$ -Patienten beschriebenen überwiegend eosinophilen Entzündung bei diesem Asthma-Endotyp (Woodruff et al., 2009).

Allerdings ist eine T_h2 -Polarisation nicht bei allen Patienten zu finden. Die seltenere $T2^{\text{LOW}}$ -Gruppe ist durch eine Polarisierung in Richtung T_h1 - und T_h17 -Zellen charakterisiert. T_h1 -Zellen sind ursprünglich für die Bekämpfung intrazellulärer Erreger, T_h17 -Zellen für die Bekämpfung extrazellulärer Bakterien und Pilze zuständig (Wenzel et al., 1999). Der $T2^{\text{LOW}}$ -Typ beinhaltet variable Entzündungsbilder u.a. mit neutrophiler, eosinophiler oder gemischter Zellinvasion. Neutrophile Entzündungsreaktionen sind allerdings häufig mit einer dominanten T_h17 -Aktivität assoziiert (Holgate, 2012; McGrath et al., 2012; Moore et al., 2014; Wilson et al., 2009).

Die Einteilung von Patienten mit Asthma in eine dieser Gruppen hat nicht nur wissenschaftliche, sondern auch klinische Bedeutung. So wurde gezeigt, dass Patienten der $T2^{\text{LOW}}$ -Gruppe häufiger klinisch schwere Verlaufsformen zeigen und wesentlich schlechter auf eine inhalative Glukokortikoid-Therapie ansprechen, weshalb auf alternative Phänotyp/Endotyp-spezifische neue Therapeutika zurückgegriffen werden sollte (Busse et al., 2013; Green et al., 2002; De Luca et al., 2017; Raundhal et al., 2015).

Einleitung

3.1.3.4 *Das Atemwegsepithel*

Das Lungenepithel kann grob in zwei physiologische Funktionsabschnitte eingeteilt werden: (1) Das obere oder bronchiale Atemwegsepithel, welches eine physikalische Barriere zum Schutz vor inhalativen Noxen und Krankheitserregern bildet. Gleichzeitig wird über Mukusproduktion und Zilienbewegung für einen Abtransport dieser gesorgt, was als mukoziliäre Clearance bezeichnet wird. (2) Das untere oder alveoläre Lungenepithel, in dem der Gasaustausch stattfindet.

Das Lungenepithel setzt sich aus mindestens zehn verschiedenen Zelltypen zusammen. Im bronchialen Atemwegsepithel dominieren Basalzellen, Becherzellen und Zilien-tragende Zellen. Hier wird mithilfe Mukusproduktion durch Becherzellen und retrograden Zilienschlag des Flimmerepithels die mukoziliäre Clearance gewährleistet. In den Alveolen treten hauptsächlich Pneumozyten Typ 1, welche für den Gasaustausch, und Pneumozyten Typ 2, welche für die Surfactant-Produktion verantwortlich sind, auf (Mercer et al., 1994). Zusätzlich zu epithelialen Zellen beinhaltet Lungengewebe eine Vielzahl weiterer Zelltypen. Das Lungenparenchym wird aus Stromazellen, wie Fibroblasten, Myofibroblasten und Endothelzellen gebildet. Immunzellen der myeloischen Reihe wie Makrophagen, Mastzellen, dendritische Zellen und neutrophile Granulozyten und der lymphatischen Reihe wie T-Zellen, B-Zellen und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind in den Atemwegen und im Lungenparenchym vertreten (Vieira Braga et al., 2019).

Neben der reinen Barriere- und Reinigungsfunktion des respiratorischen Epithels wurde in den vergangenen Jahren zunehmend seine komplexe Rolle in entzündlichen Prozessen erkannt. Einerseits kommunizieren Epithelzellen über die Sekretion löslicher Mediatoren, wie Zytokine und Chemokine, extrazellulärer Vesikel und über direkten Zell-zu-Zell-Kontakt intensiv miteinander und mit Zellen des Immunsystems und beeinflussen so die Immunreaktion auf Antigene. Umgekehrt sind Zellen des Immunsystems in der Lage über ähnliche Mechanismen Phänotyp und Funktion von Epithelzellen zu wandeln. Andererseits besitzen Epithelzellen eigene intrinsische immunologische Funktionen (Hewitt and Lloyd, 2021). Diese reichen von der Sekretion antimikrobieller Peptide, über die Erkennung und Beseitigung apoptotischer Zellen (Juncadella et al., 2013) bis hin zu der Entwicklung eines immunologischen Gedächtnis (Ordovas-Montanes et al., 2018) und einer immunologischen Zirkadianik (Gibbs et al., 2009).

3.2 Extrazelluläre Vesikel

3.2.1 Definition

Interzelluläre Kommunikation in multizellulären Organismen findet hauptsächlich über die Sekretion extrazellulärer Moleküle wie Lipide, Nukleotide, Peptide oder Proteine durch eine Zelle und deren Rezeptorinteraktion einer anderen Zelle statt. Vor über 30 Jahren wurde allerdings eine weitere Art der interzellulären Kommunikation entdeckt: die Kommunikation über extrazelluläre Vesikel (EVs). Bei Erstentdeckung in Thrombozyten als „Thrombozytenstaub“ wurden extrazelluläre Vesikel initial lediglich als Zellschrott oder als Nebenprodukt des Zelluntergangs angesehen (Harding et al., 1983; Sharrow et al., 1981; Wolf, 1967). Erst 1996 mit der Entdeckung, dass EVs, die von EBV-veränderten B-Lymphozyten sezerniert wurden, Major-Histocompatibility-Complex-Moleküle der Klasse 2 (MHC-II) auf ihrer Oberfläche tragen und so Antigen-spezifische T-Zell-Antworten induzieren können, ist das Interesse an extrazellulären Vesikeln exponentiell gestiegen (Raposo, 1996).

Der Begriff EV umfasst eine Gruppe heterogener sphärischer Strukturen mit komplexem Aufbau. Eine äußere Lipiddoppelschicht, ähnlich der einer Zellmembran, durchzogen von Transmembranproteinen umhüllt wasserlösliche zytosolische Bestandteile, u.a. Proteine, Lipide und Nukleinsäuren der Ursprungszelle (Théry, 2011).

3.2.2 Einteilung

EVs werden anhand ihres Sezernierungsmechanismus und ihres intrazellulären Ursprungs eingeteilt. Ein Sezernierungsmechanismus ist das sogenannte „*Membrane-Budding*“ bzw. „*Membrane-Shedding*“. Beim *Budding*, was „Knospung“ oder „Sprossung“ bedeutet, kommt es zu einer Ausstülpung der Plasmamembran eukaryotischer Zellen in den extrazellulären Raum und anschließend zu der Abschnürung eines sphärischen Vesikels, dem EV, von der zellulären Membran. Auf diese Weise können verschiedene EVs entstehen: Membranpartikel mit einer Größe von <100nm; Mikrovesikel, mit einer Größe von 100-1000nm und Ektosomen mit einer Größe von 200-1000nm. Die EVs unterscheiden sich jeweils in ihrem exakten *Budding*-Mechanismus und in der Zusammensetzung z.B. hinsichtlich ihrer Marker-Proteine und Lipidbestandteile (Gasser et al., 2003; Heijnen et al., 1999; Marzesco, 2005).

Ein zweiter Mechanismus EVs zu sezernieren ist über die Fusion intrazellulärer Kompartimente mit der Plasmamembran. Dieser Prozess involviert multivesikuläre Endosomen (MVEs) genannte späte endozytische Kompartimente, deren intrazellulärer

Einleitung

Ursprung nicht abschließend geklärt ist (Pan and Johnstone, 1983). Durch Einwärtsstülpung endosomaler Membranen und Integration transmembranärer Proteine entstehen zahlreiche 50-100nm große intraluminale Vesikel (ILV) in den MVEs. ILVs enthalten zytosolische Bestandteile und werden nach Fusion des MVE mit der Zellmembran in den Extrazellularraum freigesetzt (Van Niel et al., 2006). Diese freigesetzten Vesikel werden als Exosomen bezeichnet und sind 50-150nm groß (Tkach and Théry, 2016). Sie teilen ähnliche biochemische und biophysikalische Eigenschaften mit den Vesikeln innerhalb der MVEs (Harding et al., 1983; Johnstone et al., 1987; Pan et al., 1985).

Eine dritte Gruppe extrazellulärer membranöser Vesikel bilden apoptotische Vesikel, die während des Zelltods von der apoptotischen Zelle freigesetzt werden und dadurch von oben genannten EVs abzugrenzen sind (Caruso and Poon, 2018).

3.2.3 Zusammensetzung von EVs

EVs beinhalten Lipide, Peptide, Proteine und Nukleinsäuren in variabler Zusammensetzung. Sie lassen sich aus nahezu allen Körperflüssigkeiten inklusive Blut, Sputum und Urin in vivo isolieren und können von fast allen Körperzellen auch in vitro produziert werden. Entgegen früherer Annahmen enthalten EVs nicht eine zufällige Zusammensetzung intrazellulärer Proteine, sondern spezifische Proteinfamilien. Hierzu gehören unter anderem zytoskellatale, zytosolische, Hitzeschockproteine (HSP), Plasmamembran- und vesikuläre Transportproteine, aber zu einem geringeren Anteil auch Proteine aus intrazellulären Zellkompartimenten wie dem Nukleus, dem endoplasmatischen Retikulum oder dem Golgi-Apparat (Yáñez-Mó et al., 2015). Die genaue Proteinzusammensetzung variiert je nach Subtyp und Ursprung des EVs. Am besten untersucht ist bislang die Proteinzusammensetzung von Exosomen. Proteine, die auf der Oberfläche der meisten Exosomen exprimiert werden, können als Markermoleküle verwendet werden. Hierzu gehören Proteine aus der Gruppe der Tetraspanine (CD9, CD63 und CD81), MHC, HSP (HSP-70 und HSP-90), Alix und andere (Escola et al., 1998; Simpson et al., 2012). Die Expression dieser Oberflächenmarker wird für den Nachweis und für die Isolierung von Exosomen genutzt. Allerdings können diese Marker auch auf anderen EV-Subtypen wie z.B. Mikrovesikeln exprimiert werden. Zudem ist noch unklar, inwieweit deren Expression auf bestimmte Subgruppen von Exosomen begrenzt ist (Willms et al., 2018). Die heterogene Expression vesikulärer Proteine kann möglicherweise auf die Lokalisation des Vesikels, die Ursprungszelle oder den Sezernierungsmechanismus rückschließen. Zusätzlich

Einleitung

beeinflussen Umweltfaktoren, Zelltopographie (z.B. basolaterale oder apikale Lokalisation) und zelluläre Stimuli wie Zytokine die Proteinexpression in EVs. (Aatonen et al., 2014; Mathivanan et al., 2010; Østergaard et al., 2012; Tauro et al., 2013). Letztlich können EVs Krankheits-spezifische Markermoleküle enthalten, die Rückschlüsse auf zugrundeliegende Erkrankungen wie z.B. Krebserkrankungen liefern können. EVs und deren Bestandteile können daher in der Diagnostik als Biomarker als sogenannte „*Liquid-Biopsies*“ eingesetzt werden (Barile and Vassalli, 2017).

3.2.4 Biologische Funktion von EVs

EVs agieren über verschiedene Mechanismen als Kommunikationsmodul zwischen Zellen. Zum einen geschieht dies über einfache Interaktion zwischen Liganden und Rezeptoren. Hierfür präsentieren EVs Liganden in Form von Peptiden, Lipiden oder Nukleotiden auf der Vesikelmembran. Diese interagieren mit Rezeptoren auf der Zelloberfläche und regulieren somit intrazelluläre Signalkaskaden (Ratajczak et al., 2006). Ein zweiter Mechanismus der Informationsübertragung ist über den Austausch von Oberflächenrezeptoren. Während der Synthese von EVs inkorporieren die Vesikel einige Oberflächenrezeptoren ihrer Ursprungszelle in der Vesikelmembran. Nach Fusion des Vesikels mit der Membran einer Rezeptorzelle werden die Rezeptoren der Ursprungszelle auf der Zielzelle exprimiert und somit der Zellphänotyp der Zielzelle verändert (Janowska-Wieczorek et al., 2001; Kahn et al., 2017; Mack et al., 2000). Zum anderen kann der gesamte Vesikelkomplex von Zielzellen etwa durch Phagozytose, Endozytose, Mikropinozytose oder durch direkte Membranfusion in die Zielzelle aufgenommen werden. Im Zellinneren entlädt das EV seinen Inhalt, wodurch seine Information direkt intrazellulär verarbeitet werden kann (Fitzner et al., 2011; Morelli et al., 2004).

Somit können EVs komplexe Informationen zwischen Zellen in unmittelbarer Umgebung und durch systemische Verteilung in Körperflüssigkeiten auch über weitere Strecken überbringen (Takahashi et al., 2013; Willekens et al., 2005).

Bislang sind keine Möglichkeiten vorhanden, um von einem isolierten EV eindeutig auf dessen Ursprungszelle zurückzuschließen. Aus Körperflüssigkeiten isolierte EVs können somit unterschiedlichsten Ursprungs sein, in BAL Flüssigkeit (BALF) beispielsweise aus verschiedenen Immunzellen, Epithelzellen oder Stromazellen.

3.2.5 EVs als Träger extrazellulärer RNA

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass EVs nicht nur Proteine und Lipide, sondern auch Nukleinsäuren wie DNA und RNA transportieren können. Neben kodierender Messenger-RNA (mRNA), struktureller ribosomaler RNA (rRNA) und Transfer RNA (tRNA) enthalten EVs auch nicht-kodierende kleine RNA-Subtypen (*small RNA*) (Huang et al., 2013; Thakur et al., 2014). Small RNA sind kurze RNA-Sequenzen mit einer Länge von 20-30 Nukleotiden. Die bekanntesten Vertreter sind microRNA (miRNA), PIWI-interagierende RNA (piRNA), nukleäre RNA (ncRNA), nukleoläre RNA (ncoRNA), zudem gibt es lange nicht kodierende RNA (lncRNA). MiRNA haben eine Länge von ca. 22 Nukleotiden und spielen auf posttranskriptionaler Ebene eine bedeutende Rolle in der Genregulation. Durch Bindung an bestimmte Sequenzen von mRNA verhindern sie entweder deren Translation oder bewirken durch Zerschneiden eine Degradation der Ziel-mRNA und inhibieren damit die Proteinsynthese (Bartel, 2004; Guo et al., 2010).

Small RNAs kommen sowohl im Inneren einer Zelle als auch als extrazelluläre RNA vor. Ungebundene, extrazelluläre Nukleinsäuren werden in Körperflüssigkeiten allerdings durch Enzyme, sogenannte RNasen, abgebaut. Sie benötigen somit für ein Überleben außerhalb der Zelle EVs oder Trägermoleküle wie Lipoproteine (HDL, LDL) oder bestimmte Proteinkomplexe (Arroyo et al., 2011; Tsui et al., 2002; Wagner et al., 2013). Die Lipiddoppelschicht von EVs bietet einen Schutz vor extrazellulärer RNA-Degradation und ermöglicht den Transport sensitiver Moleküle außerhalb der Zelle. Vesikuläre RNA wird aktiv als Möglichkeit des Informationsaustauschs zwischen Zellen genutzt, indem z.B. in EVs enthaltene mRNA von Zielzellen aufgenommen und dort in die kodierten Proteine translatiert wird (Ratajczak et al., 2006; Valadi et al., 2007). Vesikuläre *small RNA* können über zwei verschiedene Hauptmechanismen die Zielzelle beeinflussen: (1) wie bereits beschrieben über Regulation der Proteintranslation (2) über direkte Interaktionen mit Rezeptoren der Zielzelle. Nach Endozytose des EVs durch die Zielzelle gelangt vesikuläre *small RNA* in das Endosom. Hier können bestimmte miRNA endosomale Toll-Like-Rezeptoren (TLR) aktivieren. TLR sind eine Rezeptorfamilie, die relevant für die Erkennung körperfremder Strukturen sind. Nach Aktivierung von TLR können miRNA proinflammatorische Signale in der Zielzelle induzieren (Bayraktar et al., 2019; Buonfiglioli et al., 2019; Fabbri et al., 2012).

Die Charakterisierung von EVs bzw. vesikulärer RNA birgt über deren Einsatz als Biomarker großes diagnostisches Potential. Zudem können mit dem wachsenden Verständnis ihrer pathophysiologischen Bedeutung miRNAs möglicherweise therapeutisch eingesetzt werden. In der vorliegenden kumulativen Dissertation wird

Einleitung

anhand der beiden vorliegenden Publikationen die Rolle des Atemwegsepithels und speziell der von Epithelzellen gebildeten EVs mit Fokus auf vesikuläre miRNAs Profile dargestellt.

4 Zusammenfassung der Veröffentlichungen und Darstellung des Eigenanteils an den Publikationen

4.1 Role of airway epithelial cells in the development of different asthma phenotypes

4.1.1 Zusammenfassung

Asthma bronchiale beschreibt ein Syndrom einer Erkrankung, das nach heutigem Kenntnisstand verschiedene Krankheitsphänotypen umfasst. Allen gemeinsam ist eine chronische entzündliche Reaktion des Lungengewebes, den Mittelpunkt des entzündlichen Geschehens bildet hierbei das bronchiale Atemwegsepithel. Entgegen bisheriger Annahmen spielen Atemwegsepithelzellen nicht nur eine passive Rolle, sondern auch eine aktive pathophysiologische Rolle bei der Entstehung, Aufrechterhaltung und letztlich auch Chronifizierung der Erkrankung. Somit können Veränderungen des Atemwegsepithels nicht nur als Folge immunologischer Prozesse, sondern auch als aktiver Treiber pathologischer Veränderungen verstanden werden.

Ziel dieser systematischen Übersichtsarbeit war eine Zusammenfassung des bisherigen wissenschaftlichen Kenntnisstands hinsichtlich der Rolle des Atemwegsepithels in der Pathophysiologie unterschiedlicher Asthma-Phänotypen.

Hierfür wird zu Anfang des Artikels die Zusammensetzung und der Aufbau des Atemwegsepithels detailliert geschildert und dessen Funktionen wie die Bildung einer mechanischen Barriere oder die Produktion bestimmter Moleküle z.B. antimikrobielle Peptide oder Zytokine erläutert. Dabei wird insbesondere auf die immunologischen Funktionen des Atemwegsepithels als Teil des angeborenen Immunsystems eingegangen. Im Anschluss werden die Asthma Phänotypen kurz vorgestellt, für die Arbeit entschieden wir uns dabei für die am häufigsten angewandte Einteilung in eine $T2^{HIGH}$ und $T2^{LOW}$ wie bereits in Kapitel 1.1.3.3 erläutert (Koczulla et al., 2017; Kuruvilla et al., 2019). Wir beschreiben nachfolgend die Rolle von Lungenepithelzellen unter dem Einfluss der jeweiligen Zytokine in den unterschiedlichen Asthma Phänotypen.

4.1.1.1 Das Atemwegsepithel in $T2^{HIGH}$ Asthma

Wie bereits beschrieben fungiert das Atemwegsepithel als Teil der angeborenen Immunantwort und bildet eine Brücke zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem. Atemwegsepithelzellen können Chemokine und proinflammatorische Zytokine produzieren, zu denen unter anderem die sogenannten Alarmine wie IL-25,

Zusammenfassung der Veröffentlichungen und Darstellung des Eigenanteils an den Publikationen

Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) und IL-33 gehören (Lloyd and Saglani, 2015). Diese werden nach Allergenkontakt vermehrt exprimiert und spielen eine wichtige Rolle in der Aktivierung von lymphoiden Zellen des angeborenen Immunsystems des Typs 2 (ILC2), welche Hauptproduzenten von Typ-2 Zytokinen, v.a. IL-4, IL-5 und IL-13 darstellen. Hierdurch wird die Stimulation und Akkumulation von Eosinophilen, Mastzellen, Th2- und Th9-Zellen induziert (Kato, 2019). Zusätzlich sind Typ-2 Zytokine mit der Programmierung von Epithelzellen in Richtung Hypersekretion und Becherzell-Metaplasie, Bildung Mukus-produzierender zilienträger Zellen („mucous ciliated cells“) und MUC5AC-Überexpression assoziiert (Turner et al., 2011; Tyner et al., 2006; Vieira Braga et al., 2019). Darüber hinaus gibt es Hinweise für eine langfristige proinflammatorische Prägung von Epithelzellen durch Typ-2 Zytokine im Sinne eines immunologischen Gedächtnisses (Ordoñas-Montanes et al., 2018).

4.1.1.2 Das Atemwegsepithel in T2^{LOW} Asthma

Die zugrundeliegenden Mechanismen des Typ-T2^{LOW} Phänotyps in Asthma wurden bislang nur unzureichend untersucht. Im Zentrum steht eine neutrophile Entzündungsreaktion, in der T_H-17-vermittelte Entzündungsreaktionen und die Produktion von IL-8 wesentlich sind. Atemwegsepithelzellen können z.B. getriggert durch Zigarettenrauch IL-8 produzieren und dadurch zur Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die Lunge beitragen (Ordoñez et al., 2000). Neutrophile können im Gewebe sogenannte „*neutrophil extracellular traps (NETs)*“ freisetzen, welche wiederum Mastzellen und Eosinophile aktivieren. Hierdurch kommt es zur Freisetzung von Toxinen und damit zu Förderung der Entzündungsreaktion und Schädigung der Epithelstruktur mit folglich erhöhter Permeabilität des Epithels (Pham et al., 2017; Wright et al., 2016).

Zusätzlich sind IL-1 β (Inflammasom-assoziiert) und IL-17 (T_H-17 assoziiert) mit der Aktivierung von Neutrophilen und neutrophiler Invasion in Type-T2^{LOW} Asthma assoziiert (Fogli et al., 2013; Rossios et al., 2018; Simpson et al., 2014). Während IL-1 β und IL-17 zu einer gesteigerten Mukusproduktion und erhöhten Permeabilität des Epithels führen (Chen et al., 2003; Fujisawa et al., 2011), wird dem Typ-1 Zytokin Interferon- γ (IFN- γ) aufgrund seiner Assoziation mit reduzierter MUC5AC Expression und Inhibition der T_H-2 Zellantwort ein regulatorischer Effekt bei Asthma zugeschrieben (Mitchell et al., 2011; Oyanagi et al., 2017).

Eine Sonderform des T2^{LOW} Phänotypen stellt das Adipositas-assoziierte Asthma dar. Hierbei kommt es zu vermehrter Produktion proinflammatorischer Mediatoren wie Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α), IL-6, IFN- γ und IL-17 durch das Fettgewebe und damit zu

Zusammenfassung der Veröffentlichungen und Darstellung des Eigenanteils an den Publikationen

einer niedriggradigen, chronischen, systemischen Entzündungsreaktion (Miethe et al., 2018). Pulmonale Epithelzellen weisen in übergewichtigen Asthmatikern im Vergleich zu normalgewichtigen Asthmatikern zudem Abweichungen im Zellmetabolismus auf (Winnica et al., 2019). Eine wichtige Rolle spielen Adipokine wie Leptin, welches Atemwegsepithelzellen aktiviert und die Zytokin- und Chemokinproduktion von lokalen Zellen triggert (Watanabe et al., 2019).

4.1.1.3 Epigenetische Regulation von Atemwegsepithelzellen in Asthma

Im letzten Teil der Übersichtsarbeit gehen wir auf epigenetische Mechanismen der Epithelzellfunktion in Asthma ein. Hierbei werden insbesondere die drei Hauptmechanismen epigenetischer Regulation beachtet: DNA-Methylierung, Histon-Modifikation und nicht-kodierende RNAs, wie miRNAs. Die Rolle nicht-kodierender RNA wird am Beispiel von miR-19 und miR-744 erläutert. MiR-19 ist in bronchialen Epithelzellen von Patienten mit schwerem Asthma signifikant überexprimiert, während die Expression von miR-744 signifikant reduziert ist. Beiden wird eine relevante Bedeutung in der Fehlregulation epithelialer Funktionen bei Asthmatikern beigemessen (Haj-Salem et al., 2015; Huang et al., 2019).

4.1.2 Darstellung des Eigenanteils

Diese Übersichtsarbeit wurde durch die Autoren Daniel P. Potaczek, Sarah Miethe, Viktoria E. M. Schindler, Fahd Alhamdan und Holger Garn recherchiert und verschriftlich.

Für diese Arbeit führte ich eine systematische Literaturrecherche durch und fertigte das Kapitel „Plasticity of lung epithelial cells under the adverse influence of type 1 and type 2 inflammation“ an. Zusätzlich wirkte ich an der Korrektur der Gesamtarbeit mit und trug wesentlich zu der Entwicklung der Abbildungen (v.a. Abbildungen 2 und 3) bei.

Die Arbeit wurde im Mai 2020 in der Zeitschrift „*Cellular Signalling*“ (ISSN 18733913, Volume 69, Special Issue epithelial cells_lung, Pages 109523) veröffentlicht (Potaczek et al., 2020). Der Artikel ist unter doi:10.1016/j.cellsig.2019.109523 einsehbar und ist dieser Arbeit im Anhang unter Punkt 7.2. beigefügt.

Zusammenfassung der Veröffentlichungen und Darstellung des Eigenanteils an den Publikationen

4.2 Directed release of differential exosomal small non-coding RNA profiles by bronchial epithelial cells from healthy and asthmatic subjects

4.2.1 Zusammenfassung

In dieser wissenschaftlichen Arbeit wurde das Expressionsprofil kleiner nicht-kodierender RNAs in von Atemwegsepithelzellen gesunder und asthmatischer Probanden freigesetzten EVs in Abhängigkeit vom Sezernierungsort untersucht.

4.2.1.1 Einleitung

In einem Epithel liegen Zellen entlang einer Längsachse polarisiert vor, hieraus lassen sich zwei Zellpole definieren. Am basalen Zellpol hat die Zelle Kontakt zu dem körpereigenen Milieu (meist eine Basallamina), während am apikalen Pol die Zelle häufig Kontakt zum Außenmilieu hat. Untereinander sind die Zellen eines Epithels an ihrer seitlichen bzw. lateralen Fläche i.d.R. über Adhäsionsproteine fest miteinander verbunden und bilden somit eine semi- oder auch nicht permeable Einheit. Im Bronchialepithel ist der basale Zellpol über Adhäsionsmoleküle mit einer Basallamina verbunden. Am apikalen Zellpol hat die Zelle Kontakt zum Lumen der Atemwege und damit zur eingeatmeten Luft. Die Zellpole beschreiben nicht nur eine strikte räumliche Trennung, sondern bilden auch eine komplexe funktionelle Einheit mit abweichender Zusammensetzung der Zellmembran, des Zytoskeletts und des Zytosols. Es wird deshalb funktionell zwischen einer apikalen und basolateralen Domäne unterschieden, wobei die basolaterale Domäne sowohl die basale Membran mit Kontakt zur Basallamina, als auch laterale Membran mit Kontakt zur Nachbarzelle beschreibt. (Hasan et al., 2018; Simons and Mlodzik, 2008).

Bisher liegen einige Studien zur Charakterisierung von durch Atemwegsepithelzellen produzierte EVs vor. Bislang wurde allerdings nicht untersucht ob sich die molekulare Zusammensetzung von EVs in Abhängigkeit ihres Sezernierungsorts voneinander unterscheidet.

4.2.1.2 Zielsetzung und Hypothesen

Ziel der vorliegenden Arbeit war eine Charakterisierung von durch Atemwegsepithelzellen gebildeten EVs und deren miRNA Expressionsprofil von Patienten mit Asthma bronchiale im Vergleich zu gesunden Probanden.

Folgende Hypothesen wurden hierfür formuliert:

Zusammenfassung der Veröffentlichungen und Darstellung des Eigenanteils an den Publikationen

1. EVs lassen sich sowohl an der basolateralen, als auch an ihrer apikalen Domäne von Epithelzellen isolieren
2. Sezernierte EVs innerhalb eines Phänotyps (Gesund oder Asthma) der basolateralen Domäne unterscheiden sich von EVs der apikalen Domäne hinsichtlich ihrer Vesikelcharakteristika und ihres miRNA Expressionsprofils
3. Sezernierte EVs unterscheiden sich unabhängig von einer Domäne zwischen gesunden und asthmatischen Probanden hinsichtlich ihrer Vesikelcharakteristika und ihres miRNA Expressionsprofils
4. Sezernierte EVs innerhalb einer Domäne unterscheiden sich zwischen gesunden und asthmatischen Probanden hinsichtlich ihrer Vesikelcharakteristika und ihres miRNA Expressionsprofils

4.2.1.3 Durchführung

Hierfür wurden die Vesikel bezüglich ihrer Konzentration, ihrer morphologischen Eigenschaften (Größenverteilung und Expression von Oberflächenmarkern) und ihres Expressionsprofils kleiner nicht-kodierender RNAs mit Fokus auf das miRNA Expressionsprofil untersucht. Zusätzlich wurde zwischen EVs unterschiedlichen Sezernierungsorts (apikale oder basolaterale Domäne) unterschieden. Um zwischen Vesikeln der apikalen und der basolateralen Domäne unterscheiden zu können, wurde eine kommerziell erhältliche Air-Liquid-Interface Gewebekultur von bronchialem Atemwegsepithel (@MucilAir, Epithelix) von jeweils drei gesunden und drei asthmatischen Patienten verwendet. Somit konnte sowohl Material von der basolateralen Seite in Form von Zellkulturmedium, als auch von der apikalen Seite nach einer Spülung des Epithels von apikal entnommen und die EVs hieraus separat isoliert werden. Isolierte Vesikel wurden mittels Nano-Flow-Zytometrie (NanoFCM) und Bead-basierter Durchflusszytometrie charakterisiert. Das RNA Expressionsprofil wurde mittels *small RNA* Sequenzierung erhoben und bioinformatisch ausgewertet. MiRNA assoziierte Funktionen und Zielstrukturen wurden mittels Gen Annotation und miRNA Netzwerkanalysen basierend auf den Daten der Sequenzierung erhoben. Für weitere Informationen kann die detaillierte Methodik der beiliegenden Publikation entnommen werden (siehe Anlage 7.3) (Schindler et al., 2022)

4.2.1.4 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden Unterschiede in EVs der beiden Zellkompartimente hinsichtlich ihrer Vesikelcharakteristika und ihres miRNA Expressionsprofils verdeutlicht. Innerhalb

Zusammenfassung der Veröffentlichungen und Darstellung des Eigenanteils an den Publikationen

der Kompartimente konnten zudem abweichende miRNA Expressionsprofile zwischen gesunden Kontrollen und Asthma-Patienten beobachtet werden.

Am apikalen Zellpol wurden EVs in höheren Konzentrationen als am basolateralen Zellpol isoliert. Apikale EVs waren zudem deutlich kleiner als basolaterale EVs und lagen mit einer medianen Größe von 75 nm im typischen Größenbereich von Exosomen. Basolaterale EVs hingegen waren mit einer medianen Größe von 169 nm hinsichtlich der Partikelgröße eher Mikrovesikeln zuzuordnen. In den jeweiligen Kompartimenten wurden zwischen der gesunden und asthmatischen Gruppe keine Unterschiede in Vesikelkonzentration oder -größe beobachtet (Schindler et al., 2022, Figure 2). Mittels Bead-basierter Durchflusszytometrie konnte in allen Vesikelpräparationen die Expression von Tetraspaninen nachgewiesen werden, wobei Unterschiede in der Expression der Tetraspanine CD9 und CD81 beobachtet wurden (Schindler et al., 2022, Figure 3).

Darüber hinaus wurden in der *small RNA* Sequenzieranalyse relevante Unterschiede in der Expression kleiner nicht-kodierender RNAs der verschiedenen Gruppen aufgezeigt. So unterschied sich die RNA-Zusammensetzung in EVs der apikalen und basolateralen Fraktion wesentlich voneinander. Während miRNA mit 37,3% neben lncRNA (33,3%) in apikalen EVs den häufigsten RNA-Typen darstellten, lag in der basolateralen Fraktion lediglich ein miRNA Anteil von 2,3% vor. Mit weiterem Fokus auf die miRNA-Zusammensetzung konnten apikale und basolaterale EVs klar als zwei unterschiedliche Populationen voneinander getrennt werden. Insgesamt sind 236 miRNAs in Abhängigkeit vom Zellpol (unabhängig vom Phänotypen Gesund vs. Asthma) unterschiedlich exprimiert (Schindler et al., 2022, Figure 5). Darüber hinaus waren innerhalb dieser zwei Populationen (apikal vs. basolateral) zwei Cluster erkennbar, die entweder den gesunden oder asthmatischen Zustand repräsentierten. Im apikalen Kompartiment wurden 32 miRNAs, im basolateralen Kompartiment 23 miRNAs mit unterschiedlichen Expressionsprofilen in der gesunden und asthmatischen Gruppe identifiziert (Schindler et al., 2022, Figure 7). In der KEGG Pfadanalyse wurden MAP-Kinasen (MAPK) und *Mammalian Target of Rapamycin* (mTOR) Signalwege als potentielle Zielstrukturen apikal dominanter miRNAs prognostiziert. Präferentiell basolateral sezernierte miRNAs hingegen waren u.a. mit Prozessen von B- und T-Zell-Rezeptorsignalwegen assoziiert (Schindler et al., 2022, Figure 6).

Zusammenfassung der Veröffentlichungen und Darstellung des Eigenanteils an den Publikationen

4.2.2 Darstellung des Eigenanteils

An dieser Arbeit wirkten die Autoren Viktoria E.M. Schindler, Fahd Alhamdan, Christian Preußner, Lukas Hintz, Bilal Alashkar Alhamwe, Andrea Nist, Thorsten Stiewe, Elke Pogge von Strandmann, Daniel P. Potaczek, Clemens Thölken und Holger Garn mit.

Am Studiendesign wirkte ich grundlegend mit. Zudem pflegte ich die Zellkulturen, isolierte das Material, führte die Vesikel- und RNA-Isolation sowie die FACS-Analyse durch. Das Manuskript wurde in geteilter Arbeit von mir und Fahd Alhamdan verschriftlicht.

Die Studie wurde im März 2022 in der Zeitschrift „*Biomedicines* (ISSN 22279059, Volume 10(3), Special Issue Pathogenesis and Novel Therapeutics in Asthma, Pages 622)“ veröffentlicht (Schindler et al., 2022). Der Artikel ist unter doi: 10.3390/biomedicines.10030622 Open Access verfügbar und ist dieser Arbeit im Anhang unter Punkt 7.3. beigelegt.

5 Diskussion

In den vergangenen Jahren wurde zunehmend die Bedeutung von EVs als Informationsvermittler in einer Vielzahl von Erkrankungen erkannt. Über vesikuläre *small RNAs* kann die Proteintranslation in der Zielzelle und somit der zelluläre Phänotyp beeinflusst werden (O'Brien et al., 2020). Vesikuläre *small RNA* konnten mittels RNA Sequenzierung in nahezu allen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden, unter anderem auch in Sputum und Blutplasma. Erkenntnisse über Krankheits-spezifische *small RNA*-Profile bieten einen potentiellen Baustein für funktionelle Studien. Darüber hinaus bergen vesikuläre *small RNA* Profile großes Potential als minimal-invasive Biomarker in der Krankheitsdiagnostik. Der große Vorteil der vesikulären RNA Diagnostik ist, dass über EVs Rückschlüsse auf Ursprungszellen gezogen werden können ohne die Zelle selbst mittels einer invasiven Biopsie isolieren zu müssen. Es gibt bereits zahlreiche Ansätze für die klinische Anwendung des sogenannten Prinzips der „Liquid Biopsies“ für u.a. onkologische, kardiovaskuläre oder entzündliche Erkrankungen (de Miguel Pérez et al., 2020; Trino et al., 2021; Zhou et al., 2020).

Auch in der Krankheitsentstehung und -aufrechterhaltung von Asthma wird zunehmend die Rolle von EVs untersucht. Es liegen bereits eine Vielzahl an Studien vor, die das vesikuläre miRNA Profil von Patienten mit Asthma mit gesunden Kontrollen vergleichen (Bahmer et al., 2021; Kho et al., 2016; Levänen et al., 2013; Milger et al., 2017; Rodrigo-Muñoz et al., 2019). Einige Studien konzentrieren sich hierbei explizit auf Atemwegsepithelzellen als Produzent vesikulärer *small RNA* (Bartel et al., 2020; Jardim et al., 2012; Solberg et al., 2012). Zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit lag jedoch lediglich eine Publikation vor, die miRNA Profile in polarisierten Epithelzellen untersuchte und hierbei die Richtung der EV Sekretion, und damit den potentiellen Aktionsort der EVs berücksichtigte (Bartel et al., 2020).

Im ersten Teil der Diskussion soll der Fokus primär auf der kritischen Auseinandersetzung mit Methoden der Isolation und Charakterisierung von EVs liegen. Hierfür ist unsere im Journal Biomedicines veröffentlichte Publikation wesentlich (Schindler et al., 2022). In dieser Arbeit wurden erstmals Vesikelcharakteristika und vesikuläre miRNA Expressionsprofile von EVs aus polarisierten Epithelzellen gesunder und asthmatischer Probanden abhängig von der Richtung der Vesikelsekretion mittels *small RNA* Sequenzierung erhoben. Eine solche Charakterisierung vesikulärer RNA könnte zum Verständnis der pathophysiologischen Rolle von EVs in Asthma beitragen und eine Grundlage für die Weiterentwicklung von Biomarkern bilden.

Diskussion

Fokus des zweiten Teils ist eine Einordnung beider Studien in den vorherrschenden wissenschaftlichen Konsens, hier wurden auch Studien berücksichtigt, welche zum Publikationszeitpunkt noch nicht veröffentlicht waren.

5.1 Methodische Limitationen der EV Diagnostik

EV Diagnostik ist ein relativ neues biomedizinisches Feld, das noch vor einigen technologischen Herausforderungen steht. Weitere Optimierungsprozesse in der Vesikel-Isolation und -Charakterisierung werden benötigt bis diese Methoden Einzug in eine standardisierte, klinische Anwendung finden können. Ein großes bislang ungelöstes Problem ist der Mangel an Standardisierung und ein hohes Maß an methodischem Bias bei einer gleichzeitig großen Anzahl an zur Verfügung stehenden methodischen Optionen. Dies führt zu mangelnder Kohärenz, Konsistenz und Reproduzierbarkeit der Daten einzelner Studien und stellt somit ein großes Problem in der klinischen Etablierung von EVs als Biomarker dar. Multiple Schritte in der Aufbereitung des Materials, der EV Isolation, RNA Isolation und Charakterisierung können potentiell das Ergebnis einer *small RNA* Analyse beeinflussen (Fritz et al., 2016). Die Ergebnisse einer Analyse sind daher immer im Kontext der verwendeten Methodik zu interpretieren.

5.1.1 Ko-Isolation nicht-vesikulärer RNA-bindender Moleküle

5.1.1.1 Verunreinigung von EV Präparaten durch nicht-vesikuläre Bestandteile

Wie in Kapitel 1.2.5 beschrieben kann extrazelluläre RNA nicht nur über EVs transportiert werden, sondern kommt auch Protein- (z.B. Argonaut 2) oder Lipoprotein-gebunden vor. Die spezifische RNA Zusammensetzung ist abhängig vom extrazellulären Transportmechanismus. Proteine, Ribonukleoproteine bzw. Lipoproteine zeigen dementsprechend eine andere Zusammensetzung von *small RNA* als EVs. In einer Subgruppenanalyse waren nach Trennung einer vesikulären und einer nicht-vesikulären Fraktion mittels Dichtegradientenfractionierung viele der am stärksten vertretenen extrazellulären miRNA sogar eher mit der nicht-vesikulären als mit der vesikulären Fraktion assoziiert (Jeppesen et al., 2019). Die alleinige Detektion extrazellulärer miRNA lässt daher nicht den Rückschluss zu, dass diese vesikulären Ursprungs sind. Während der Vesikelisolation ist es nicht unüblich, dass aufgrund ihrer den Vesikeln ähnlichen Größe als Nebenprodukt Protein-RNA-Komplexe ebenfalls isoliert werden. Dies wurde für viele verschiedene Isolationsmethoden u.a. für Ultrazentrifugation, *Size Exclusion Chromatographie* (SEC) und Membranaffinitäts-basierte Methoden gezeigt (Arroyo et al., 2011; Benedikter et al., 2017; Stranska et al., 2018; Tang et al., 2017). Es ist deshalb

Diskussion

gut möglich, dass die im Anschluss isolierte und charakterisierte RNA nicht spezifisch vesikulären Ursprungs ist, obwohl sie in vielen Publikationen als solche bezeichnet wird.

In dieser Arbeit wurde die kommerziell erhältliche Membranaffinitäts-basierte Methode exoEasy von Qiagen verwendet. Diese ermöglicht eine schnelle Isolation der Vesikel mit einfacher Handhabung. Allerdings wird die Nutzung kommerziell erhältlicher Kits mit Membranaffinitäts-basierter EV Isolierung aufgrund ihres vergleichsweise schlechteren Abschneidens in der Reinheit des Isolationsprodukts kritisch diskutiert. Im Vergleich zu der EV Isolation mittels SEC, wiesen die mittels exoEasy isolierten EV Populationen insgesamt einen geringeren Reinheitsgrad auf und zeigten eine höhere Kontamination mit Plasma- und Lipoproteinen. Die Verunreinigung mit *Low-Density-Lipoprotein* (LDL) hingegen war in der SEC Gruppe höher. Beide Methoden schnitten bei der nachfolgenden RNA Isolation allerdings bezüglich der RNA-Konzentration und des hohen Anteils an *small RNA* gleichwertig ab. Unterschiede in *small RNA* Expressionsprofilen sind hierbei jedoch nicht berücksichtigt worden (Stranska et al., 2018). In der initialen Evaluation des exoEasy Kits durch Enderle et al. ist keine Kontrolle des Reinheitsgrads bzw. der Proteinkontamination erfolgt (Enderle et al., 2015).

5.1.1.2 ISEV-Einteilung der EV Isolationsmethoden anhand Spezifität und Ausbeute

Die internationale Gesellschaft für extrazelluläre Vesikel (ISEV) empfiehlt eine Einteilung der Isolationsmethoden anhand ihrer Spezifität (hinsichtlich Ko-Isolation nicht-vesikulärer Bestandteilen) und Ausbeute. Hierdurch werden vier Gruppen unterschieden: (1) Hohe Ausbeute - geringe Spezifität. Charakteristisch für diese Gruppe ist eine maximale Ausbeute an isoliertem extrazellulären Material einschließlich vesikulärer, aber auch nicht-vesikulärer Bestandteile. Hierzu werden Präzipitations-basierte Methoden, sowie High-Speed Ultrazentrifugation und Ultrafiltration ohne zusätzliche Schritte gezählt. (2) Mittlere Ausbeute - mittlere Spezifität. Hier werden Methoden zusammengefasst, die gemischte EV Populationen zusammen mit einer eingeschränkten Menge an nicht-vesikulärem Material isolieren. Hierunter fallen die SEC, differentielle Ultrazentrifugation und Membranaffinitäts-basierte Methoden. (3) Geringe Ausbeute - hohe Spezifität. Diese Gruppe beinhaltet u.a. kombinierte Verfahren aus Filtrationsschritten und SEC, Dichtegradienten- oder Immunoaffinitäts-basierte Methoden, die EV-Subpopulationen bei möglichst geringer Kontamination mit nicht-vesikulärem Material isolieren. (4) Hohe Ausbeute, hohe Spezifität. Für diese Gruppe besteht bis dato keine valide Methodik zur Verfügung (Théry et al., 2018).

Diskussion

Da es aktuell keine generell optimale Methodik zur EV Isolation gibt, empfiehlt die ISEV die Wahl des Verfahrens abhängig von der jeweiligen Fragestellung und der geplanten Verwendung der EVs zu machen. Membranaffinitäts-basierte Methoden werden zu der Gruppe mit mittlerer Ausbeute bei mittlerer Spezifität gezählt. In der nachgeschalteten RNA Isolation erzielt dieses Verfahren eine vergleichsweise hohe RNA Konzentration und bessere Library Qualität in der Sequenzierung. Anhand der erhobenen RNA Sequenzierprofile konnte zuverlässiger zwischen unterschiedlichen Patientenpopulationen unterschieden werden als bei EV Aufreinigung mittels differentieller Ultrazentrifugation und SEC. Letztere erzielten weniger komplexe Libraries und eine geringere Anzahl an miRNA Ablesungen und schnitten schlechter in der Differenzierung zwischen Patientenpopulationen ab (Buschmann et al., 2018). Demzufolge könnte die Reinheit der EV Aufbereitung nur beschränkten Einfluss auf die Qualität der RNA Profile haben, wenn die primäre Absicht einer Studie die Erkennung potentieller Biomarker ist (Deregibus et al., 2016; Quek et al., 2017). Wichtige Eigenschaften einer Methode zur Bestimmung eines Biomarkers sind deren Durchführbarkeit, Reproduzierbarkeit und ein hoher prädiktiver Wert. Ziel der vorliegenden experimentellen Arbeit war primär der Vergleich von miRNA Expressionsprofilen in unterschiedlichen EV Populationen, weshalb die verwendete Methode gewählt wurde. Allerdings müssen die Ergebnisse der EV Charakterisierung mit Vorsicht interpretiert werden, da diese nicht als primäre Ziele der Arbeit definiert wurden. Auch Interpretationen möglicher pathophysiologischer Bedeutungen der miRNA müssen stets in dem Wissen erfolgen, dass es sich hierbei wahrscheinlich nicht um reine EV Präparationen handelt.

5.1.2 Morphologische und inhaltliche Unterschiede verschiedener Vesikelpopulationen

Es gibt unterschiedliche Ansätze zur EV Charakterisierung: die Einteilung anhand (1) der Vesikelgröße mittels Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA) oder Nanopartikel-adaptierter Durchflusszytometrie (*Nanoparticle Flow Cytometry*, NanoFCM) (2) der Expressionsanalyse von Oberflächenmarkern mittels Western Blot oder Durchflusszytometrie oder (3) der Bestimmung der molekularen Zusammensetzung mittels „Omics-Analysen“ z.B. *Proteomics*, *Transcriptomics* oder *Lipidomics* (Ratajczak and Ratajczak, 2020).

Diskussion

5.1.2.1 Größenverteilung apikaler und basolateraler Partikel

In der vorliegenden Studie fanden sich Unterschiede in der Konzentration und Größenverteilung isolierter Partikel. Apikal isolierte Partikel entsprachen in der Partikelgröße eher Exosomen, basolateral isolierte Partikel entsprachen hinsichtlich ihrer Größe eher Mikrovesikeln. An dieser Stelle muss nochmals auf zwei Punkte aufmerksam gemacht werden. Zum einen differenziert die verwendete Methodik in der Größenbestimmung nicht zwischen Partikeltypen (z.B. EVs, Proteine, Lipoproteine u.a.). Zum anderen muss die Größenauswertung mit Vorsicht interpretiert werden, da in den Messungen lediglich Eichgrade von 40-200 nm abgedeckt sind. Daher sind Messungenauigkeiten insbesondere bei den basolateralen Vesikeln aufgrund der großen Partikelgröße nicht auszuschließen.

5.1.2.2 Tetraspanin Expression verschiedener EV-Subtypen

Mittels FACS-Analyse konnten wir eine Expression der Tetraspanine CD9, CD63 und CD81 in basolateral und apikal isolierten Partikeln nachweisen. In der Annahme exosomaler Spezifität sind diese Moleküle in der Vergangenheit als exosomale Marker verwendet worden. Allerdings konnte diese These durch mehrere Studien widerlegt werden, nachdem diese Marker teils auch in Mikrovesikeln nachgewiesen wurde (Andreu and Yáñez-Mó, 2014; Crescitelli et al., 2013). Sowohl CD9 als auch CD63 sind demnach in Exosomen und Mikrovesikeln nachweisbar. Kowal et al. zeigte zudem eine mit Mikrovesikeln assoziierte Expression von CD9 und CD81 bei gleichzeitig reduzierter Expression von CD63. Die Ko-Expression von CD63, CD9 und/oder CD81 hingegen wurde eher mit Exosomen assoziiert (Kowal et al., 2016). Auch Mathieu et al. wiesen eine Expression von CD9 und CD81 bei nur geringer Expression von CD63 in Mikrovesikeln nach, während Exosomen vermehrt CD63 und nur in geringem Maße CD9 exprimierten (Mathieu et al., 2021). Interessanterweise waren apikal isolierte EVs in unserer Studie im Median kleiner als basolateral isolierte Partikel. Gleichzeitig wurden in apikal isolierten Partikeln signifikant mehr CD9 und CD81 nachgewiesen als in basolateral isolierten Partikeln. Dies lässt vermuten, dass EVs am apikalen Zellpol anhand beschriebener Charakteristika eher exosomale Charakteristika aufweisen, während EVs basolateralen Ursprungs Charakteristika von Mikrovesikeln aufwiesen. Die Expression von CD63 unterschied sich hingegen nicht in beiden Gruppen.

Abschließend kann anhand dieser Daten nicht zwischen unterschiedlichen Vesikeltypen unterschieden werden, weshalb generell der Überbegriff EV verwendet und von einer weiteren Spezifizierung abgesehen wurde. EVs unterschiedlicher Größe und molekularer Zusammensetzung sind in Körperflüssigkeiten präsent und bislang existiert

Diskussion

keine validierte Methodik zur gezielten Isolation einzelner EV Populationen (Théry et al., 2018). Für eine Untersuchung potentiell biologischer Effekte dieser unterschiedlichen EVs müssen diese zur bestmöglichen Annäherung an die in vivo Situation in ihrer Gesamtheit betrachtet werden (Ratajczak and Ratajczak, 2020).

5.1.2.3 Variable vesikuläre RNA Zusammensetzung in EV-Subtypen

Insgesamt scheinen reinere EV Populationen eine geringere Ausbeute an RNA zu liefern als Präparate mit höherer Proteinkontamination. In einer Studie wurde sogar die Zahl eines miRNA-Moleküls in einem isolierten EV auf weniger als eine Kopie pro Vesikel geschätzt (Chevillet et al., 2014; Jeppesen et al., 2019). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist eine abweichende RNA Zusammensetzung spezifischer EV-Subtypen. Bestimmte EVs mit gemeinsamen Merkmalen könnten somit spezifische miRNA exprimieren, welche in anderen EV-Subpopulationen in der Vesikelpräparation nicht vertreten sind (Mateescu et al., 2017). Da in der vorliegenden Arbeit nicht zwischen EV Populationen unterschieden worden ist, wurde dieser Aspekt jedoch nicht weiter berücksichtigt oder diskutiert.

5.2 Einordnung in den fachwissenschaftlichen Kontext

5.2.1 Die Rolle des Atemwegsepithels in der Entwicklung von Asthma

Initial wurde bronchialen Epithelzellen eine hauptsächlich passive pathophysiologische Rolle in Asthma zugesprochen. In dieser Hypothese steht zu Beginn der Krankheitsentstehung die pathologische Aktivierung der Th2-Immunantwort durch Allergenexposition. Hierauf folgt eine Dysregulation des Atemwegsepithels und des subepithelialen Systems. Demgegenüber steht die neuere Hypothese, die das Atemwegsepithel als Ort der primären Krankheitsentstehung postuliert. Erst durch eine vorangehende gestörte Permeabilität des Epithels kommt es nachfolgend durch Kontakt zu Toxinen, Allergenen oder Viren zu einer pathologischen Immunreaktion (Holgate, 2011).

In asthmatischen Patienten ist eine Reihe struktureller Veränderungen des Atemwegsepithels beschrieben. Hierzu gehört eine erhöhte Dichte von Becherzellen und muköser Drüsen, Becherzellhyper- und -metaplasie und eine veränderte Mukus-Zusammensetzung. Dies führt zu einer Überproduktion von zähem Mukus und durch gestörte mukosale Clearance zu Mukus-Akkumulation in den Atemwegen, auch *Mucus-Plugging* genannt (Frey et al., 2020). Zusätzlich sind bei schweren Asthmatikern eine gesteigerte Epithelzellproliferation und Apoptoserate beschrieben (Cohen et al., 2007).

Diskussion

Epithelzellen exprimieren auf ihrer Oberfläche *Pattern Recognition* Rezeptoren (PRR), über welche sie in der Lage sind Pathogene (über *Pathogen Associated Molecular Patterns*, PAMPs) bzw. Alarmine (*Danger Associated Molecular Patterns*, DAMPs) zu erkennen und entsprechend zu reagieren. Sie bilden somit einen Teil des angeborenen Immunsystems (Frey et al., 2020). Der Kontakt von PAMPs oder DAMPs zu PRR auf der Oberfläche von Epithelzellen führt über intrazelluläre Signalwege zu der Aktivierung von Nukleärem Faktor κ b (NF- κ b), Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) und Interferon Regulatorischem Faktor 3 (IRF-3) und damit zur Produktion von Zytokinen und Chemokinen in Atemwegsepithelzellen (Lambrecht and Hammad, 2012). Epithelzellen können eine Reihe proinflammatorischer Zytokine produzieren, u.a. IL-1 β , IL-6, IL-25, IL-33, CXC-Chemokin Ligand (CXCL)-8, GM-CSF und TNF. Hierdurch werden wiederum Immunzellen wie dendritische Zellen, B- und T-Lymphozyten, Mastzellen, eosinophile und neutrophile Granulozyten angezogen bzw. aktiviert (Frey et al., 2020). In Asthma können bestimmte epithelial gebildete Zytokine wie IL-13, IL-25, IL-33 oder TSLP, Chemokine wie CC-Chemokin Ligand (CCL) 7, CCL17 oder CCL22, Wachstumsfaktoren wie GM-CSF oder *Transforming Growth Factor* Beta (TGF- β) und extrazelluläre Matrixbestandteile die Entzündungsreaktion direkt beeinflussen (Chung, 2016). Viele dieser Zytokine induzieren zudem einen Shift in Richtung T2-Helferzellantwort in T2^{HIGH} Asthma (Ziegler and Artis, 2010). Epitheliale Zytokine können außerdem zur Modulation subepithelialer Stroma-Zellen mit gesteigerter Kollagenablagerung, Basalmembranverdickung und Hyperplasie glatter Muskelfasern führen. Das resultierende Atemwegs-Remodeling führt häufig zu der klassischen Symptomatik der bronchialen Obstruktion (Frey et al., 2020; Wang et al., 2008).

Darüber hinaus wird die gesteigerte Zytokinproduktion epithelialer Zellen kausal mit einer gestörten Barrierefunktion des respiratorischen Epithels in Verbindung gebracht. Durch die gesteigerte Zytokinsekretion wird die mukosale Permeabilität für Fremdstoffe erhöht. Somit kommt es zu einer gesteigerten Aktivierung von Epithelzellen, lymphatischen und dendritischen Zellen und damit zur Induktion einer Entzündungsreaktion (Gon and Hashimoto, 2018).

Zusammenfassend ist am ehesten eine parallele und interaktive Dysregulation sowohl epithelialer als auch immunologischer Zellen für die Krankheitsentstehung und -aufrechterhaltung in Asthmatikern entscheidend wie in unserer Übersichtsarbeit erläutert wird (Potaczek et al., 2020).

5.2.2 Extrazelluläre Vesikel in der Pathophysiologie von Asthma bronchiale

In den vergangenen Jahren wurde zunehmend die bedeutende Rolle von EVs in der Pathogenese von Asthma bronchiale erkannt (Sastre et al., 2017). EVs können in der Lunge durch eine Vielzahl von Zellen produziert werden, unter anderem von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, B-Lymphozyten und von Lungenepithelzellen selbst (Mohan et al., 2020). In Asthmatikern konnte sowohl eine Veränderung in der EV Konzentration, als auch in der molekularen Zusammensetzung von EVs im Vergleich zu Gesunden gezeigt werden (Hough et al., 2018; Torregrosa Paredes et al., 2012). Auch das miRNA Expressionsprofil unterschied sich in EVs von asthmatischen Patienten im Vergleich zu Gesunden (Levänen et al., 2013; Suzuki et al., 2016). Für einige dieser miRNA-Subtypen konnten sogar direkte pro- bzw. antiinflammatorische Effekte auf Immun-, Stroma- oder Epithelzellen nachgewiesen werden (Jude et al., 2012; Kumar et al., 2011; Lu et al., 2009). Aus Nasensekret von Asthmatikern isolierte EVs konnten einen direkten chemotaktischen Effekt auf Monozyten, NK-Zellen und Neutrophile ausüben (Lässer et al., 2016). Kulshreshtha et al. wiesen nach, dass EVs aus Atemwegsepithelzellen nach Stimulation mit IL-13 eine verstärkende Wirkung auf Proliferation und Chemotaxis von Monozyten haben (Kulshreshtha et al., 2013). Ax et al. zeigten, dass polarisierte Atemwegsepithelzellen nach Stimulation mit Th2- oder Th17-Zytokinen vermehrt apikale EVs sezernierten. Zudem wiesen stimulierte EVs veränderte Transkriptom- und Proteom-Profile auf. Th17 stimulierte EVs wurden mit aktivierenden Signalwegen in der Rekrutierung von Neutrophilen in Verbindung gebracht. In dieser Studie wurde auch eine Air-Liquid-Interface Zellkultur von Atemwegsepithelien verwendet, interessanterweise waren hier allerdings keine EVs aus dem basolateralen Kompartiment nachweisbar (Ax et al., 2020). Zusätzlich konnten EVs aus alveolären Epithelzellen mit asthmatischem Phänotypen den Phänotypen von bronchialen Epithelzellen verändern (Gupta et al., 2019).

5.2.2.1 Differentiell exprimierte miRNA in basolateralen und apikalen EVs

Die miRNA Signaturen in basolateralen und apikalen Vesikeln unterscheiden sich unabhängig vom Phänotyp (Asthma vs. Gesund) wesentlich voneinander. Apikale und Basolaterale Vesikel ließen sich somit anhand ihres miRNA Profils als zwei unterschiedliche Populationen voneinander abgrenzen.

Diskussion

Insgesamt waren 236 vesikuläre miRNAs in apikalen und basolateralen Vesikeln unterschiedlich exprimiert. Unter anderem wurde eine vermehrte Expression von miRNAs der Let-7 Familie in apikalen EVs im Vergleich zu basolateralen EVs nachgewiesen. In basolateralen EVs unterschied sich zudem die Let-7 Expression zwischen gesunden und asthmatischen Probanden, während dies in apikalen EVs nicht der Fall war. Im Gegensatz hierzu stehen Daten von Levänen et al., in denen eine signifikante Herunterregulierung von miRNA der Let-7 Familie in BALF festgestellt wurde (Levänen et al., 2013). Interessanterweise waren in unserer Studie Let-7c und Let-7d in EVs aus asthmatischen Probanden in geringerem Maß exprimiert als in der gesunden Kontrolle, während für Let-7a ein umgekehrter Effekt beobachtet wurde. Die miRNAs der Let-7-Familie sind eine der am besten untersuchten vesikulären miRNAs in Asthma bronchiale (Mendes et al., 2019). So liegen Hinweise auf einen EV-vermittelten Transfer von Let-7 miRNA zwischen Immunzellen mit modulierender Wirkung von bzw. auf Treg-Zellen vor (Kimura et al., 2018; Okoye et al., 2014).

MAPK und mTOR Signalwege wurden als potentielle Ziele für differentiell exprimierte vesikuläre miRNAs apikaler EVs identifiziert. Der proinflammatorische IL-4/IL-13/STAT6 Signalweg gilt als einer der Schlüsselmodulatoren in der Pathophysiologie von Asthma bronchiale. *Signal Transducer and Activator of Transcription 6* (STAT6) ist ein Transkriptionsfaktor, der nach Stimulation durch Zytokine wie z.B. IL-4 oder IL-13 aktiviert wird. Die Aktivierung von STAT6 führt wiederum zu einer Aktivierung von Genen proinflammatorischer Moleküle. mTOR ist eine Serinkinase und wirkt über Phosphorylierung von Proteinen an der Regulation von Signalkaskaden mit. Sie wirkt auch als Aktivator von STAT6 und entfaltet somit proinflammatorische Wirkung. Die Aktivierung von mTOR wurde mit einer zunehmenden Brüchigkeit von *Tight Junctions* im Atemwegsepithel und mit der sogenannten epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) in Verbindung gebracht (Athari, 2019). Letzteres bezeichnet den Übergang epithelialer Zellen in Zellen mit Eigenschaften mesenchymaler Zellen. Dies wiederum führt zu Störungen der Zelladhärenz und -polarisierung und somit zu einer Einschränkung der epithelialen Barrierefunktion (Thiery et al., 2009). Die Aktivierung von mTOR ist mit Atemwegs-Remodeling in Asthma bronchiale assoziiert worden (Gong et al., 2014; Saito et al., 2020). MAPK sind eine Gruppe von Proteinkinasen, die verschiedene Zielsubstrate phosphorylieren und eine essentielle Rolle im Zellstoffwechsel spielen. Auch STAT6 kann durch MAPK aktiviert werden (Pesu et al., 2002). MAPK-Signalwege haben über Kontrolle der Genexpression proinflammatorischer Faktoren wie IL-6 und TNF- α regulatorische Funktionen in Asthma

Diskussion

bronchiale (Athari, 2019). Die Hemmung von MAPK-Signalwegen kann zu einer relevanten Reduktion allergischer Inflammation in den Atemwegen führen (Alam and Gorska, 2011).

Im basolateralen Kompartiment waren differentiell exprimierte miRNAs in der KEGG-Pfadanalyse unter anderem mit B- und T-Rezeptorsignalwegen assoziiert.

5.2.2.2 Differentiell exprimierte miRNAs in EVs der gesunden und asthmatischen Kohorte

In unserer Studie konnten Unterschiede in EV-assoziierten miRNA Profilen von Atemwegsepithelzellen in gesundem und asthmatischem Zustand beobachtet werden. Interessanterweise waren diese Unterschiede wesentlich deutlicher, wenn hierbei das Zellkompartiment berücksichtigt wurde, also zwischen basolateral und apikal sezernierten EVs unterschieden wurde. Eine kürzlich publizierte PCR-basierte Studie von Bartel et al. verglich die Expression einzelner miRNAs in basolateral und apikal sezernierten EVs aus humanen Atemwegsepithelzellen nach Stimulation mit IL-13 (Bartel et al., 2020). Interessanterweise gab es einige Überlappungen zu unseren Daten, allerdings konnten viele differentiell exprimierte miRNAs aus dieser Studie in unserer Analyse nicht beobachtet werden.

Eine der miRNAs mit signifikanter Hochregulation sowohl im basolateralen als auch apikalem Kompartiment in der Asthma Kohorte ist miR-21. In Patienten mit schwerem Asthma sind erhöhte Serum-Level für miR-21 beschrieben (Sawant et al., 2015). Zudem ist der Nachweis erhöhter Serum-Level mit einem schlechteren therapeutischen Ansprechen auf Steroide in Verbindung gebracht worden (Elbehidy et al., 2016; Kim et al., 2017). miR-21 wird aufgrund dessen bereits als potentieller Biomarker für schweres Asthma bronchiale und als Prädiktor für steroidrefraktäre Verläufe diskutiert. Der Einsatz eines miR-21 spezifischen Antagomirs führte im Mausmodell zu einer verringerten Hypersensitivität der Atemwege und zu einem verbessertem Ansprechen auf Steroide (Lee et al., 2017). In einem Mausmodell der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) wiesen Kim et al. ebenso erhöhte miR-21 Level nach, welche mit einer Hochregulation von NF- κ b (über eine miR-21/SATB1/S100A9/NF- κ b Achse) assoziiert wurde. So wurde durch einen miR-21 Antagomir eine reduzierte Aktivität von NF- κ b erzielt (Kim et al., 2021).

miR-99a wurde erst kürzlich als Treiber allergischer Th2-getriebener Atemwegsentszündung identifiziert (Entwistle et al., 2021). Nach Induktion durch NF- κ b reduzierte miR-99a die Bildung proinflammatorischer Zytokine, vermutlich in einer

Diskussion

negativen Feedbackschleife über mTOR Suppression (Bao et al., 2016). Warth et al. beobachtete darüber hinaus, dass sich die Überexpression von miR99a in CD4-positiven T-Zellen positiv auf die Differenzierung regulatorischer T-Zellen auswirkte und leicht supprimierend auf Th17-Zellen wirkte (Warth et al., 2015; Zhu et al., 2019). MiR-99a war sowohl im apikalen als auch basolateralen Kompartiment in Asthmatikern im Vergleich zu Gesunden herunter reguliert. Weitere funktionelle Studien zur Rolle von miR-99a in der Pathophysiologie von Asthma werden mit Spannung erwartet.

Einer der in unserer Studie mit Asthma assoziierten Signalwege in der KEGG-Pfadanalyse war der TGF- β Signalweg. TGF- β 1 wird in den Atemwegen hauptsächlich von Atemwegsepithelzellen und Eosinophilen gebildet. In Patienten mit Asthma sind erhöhte Konzentrationen an TGF- β in BALF nachweisbar. TGF- β kann abhängig vom jeweiligen Signalweg sowohl pro- als auch antifibrotische Effekte haben (Al-Alawi et al., 2014). In Asthma ist TGF- β durch seine profibrogene Wirkung am Atemwegs-Remodeling über EMT sowie über Fibroblast-zu-Myofibroblast Transition (FMT) und damit der subepithelialen Fibrosierung beteiligt (Wnuk et al., 2020). Außerdem wurde nach Exposition gegenüber TGF- β die miR-21 Expression in pulmonalen Fibroblasten induziert, was eine Rolle von miR-21 bei Lungenerkrankungen über Beeinflussung von Fibroblasten nahe legt (Ong et al., 2017). Für MiR-375-3p hingegen wurde in humanen Fibroblasten eine protektive Wirkung in FMT nachgewiesen. In dieser Studie verhinderte miR-375-3p FMT und Kollagensynthese durch Blockade des p38 Signalwegs (Zhang et al., 2020). In unseren Ergebnissen war miR-375-3p in basolateralen EVs von Asthmatikern runterreguliert, was prinzipiell die Theorie einer protektiven Rolle dieser miRNA im *Airway-Remodeling* unterstützt. Auch neutrophile Granulozyten, die eine wichtige pathophysiologische Rolle insbesondere bei schwerem Asthma spielen, können TGF- β produzieren. Neutrophile können über TGF- β die EMT in Atemwegsepithelien treiben und somit zur Pathophysiologie von Asthma beitragen (Haddad et al., 2019). Eine assoziierte biologische Funktion differentiell exprimierter miRNAs in unserer Studie ist interessanterweise neben EMT auch die Differenzierung von Neutrophilen. Hier muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass keine Informationen zum Asthma-Phänotypen der Spender vorliegen. Somit ist nicht bekannt, ob bei den involvierten Asthmatikern eine neutrophile oder eosinophile entzündliche Komponente vordergründig ist.

Als potentielle biologische Funktion der miRNAs mit differentieller Expression in der asthmatischen versus der gesunden Kohorte wurde u.a. die Regulation von NF- κ b-

Diskussion

Signalwegen identifiziert. NF- κ b umfasst eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die zahlreiche Genome mit immunologischer Funktion regulieren. Diese spielen eine wichtige Rolle in entzündlichen Prozessen über Induktion proinflammatorischer Gene in Zellen des angeborenen Immunsystems oder Regulation der T-Zell-Funktion. In vielen chronisch entzündlichen Erkrankungen kann eine Dysregulation des NF- κ b Signalwegs beobachtet werden (Liu et al., 2017). In Asthma bronchiale ist eine erhöhte Aktivität von NF- κ b in mehreren in vivo Studien beschrieben (Poynter et al., 2002, 2004; Tully et al., 2013). Ein in unserer Arbeit identifiziertes mögliches Target-Protein differentiell exprimierter miRNA in Asthma ist NF κ B1, ein Bestandteil des NF- κ b-Protein-Komplexes.

IL-5 ist ein Th2-Zytokin mit Wirkung auf die Proliferation, Differenzierung und Aktivierung von eosinophilen Granulozyten. In T2^{HIGH} Asthma spielt IL-5 durch Induktion eosinophiler Inflammation eine wichtige pathophysiologische Rolle. Eine differentiell exprimierte miRNA in Asthmatikern ist MiR-1248. Diese kann die IL-5 Expression posttranskriptionell hochregulieren und somit eine T2-vermittelte Immunantwort bestärken (Panganiban et al., 2016).

In der mRNA-miRNA Netzwerk Analyse sind differentiell exprimierte miRNA beider Kompartimente mit relevanten Genen des IL-4/IL-13 Signalwegs assoziiert. Im apikalen Kompartiment wurde außerdem eine Assoziation für Gene mit transkriptioneller Regulation durch Runt-Related Transkriptionsfaktor 3 (RUNX3) gezeigt. Diesem wird eine regulatorische Bedeutung in der Differenzierung unterschiedlicher Immunzellen inklusive in der Th1/Th2-Balance in Asthma bronchiale beigemessen (Yu et al., 2018).

5.2.2.3 Zelluläre Alterungsprozesse in Asthma bronchiale

In den vorhergesagten potentiellen biologischen Funktionen differentiell exprimierter miRNAs bei Asthma überwiegen Funktionen, die mit dem Zellzyklus wie Stammzelldifferenzierung und -regulation, Zellzyklus, Zellproliferation, Zelldifferenzierung, DNA Damage Response (also zelluläre Mechanismen als Reaktion auf DNA Schaden), Wundheilung, Alterungsprozesse, Zelltod und Apoptose assoziiert sind. Es ist bekannt, dass zelluläre Alterungsprozesse in der Entstehung chronischer Lungenerkrankungen wie COPD oder Asthma bronchiale eine Rolle spielen (Wang et al., 2020).

Im basolateralen Kompartiment wurden unter anderem potentielle Target-Gene mit Regulation durch Tumorsuppressorprotein 53 (TP53) identifiziert. TP53 kodiert für den Transkriptionsfaktor p53 mit regulatorischer Funktion im Zellzyklus und hat unter

Diskussion

anderem die Funktion eines Tumorsuppressors. Aufgrund der höheren Mutationswahrscheinlichkeit in zunehmendem Alter wird TP53 populärwissenschaftlich auch als Altersgen bezeichnet. Altersgene wie Forkhead-Box-Protein O3 (FOXO3), *Transforming Growth Factor B1* (TGFB1) und TP53 sind wichtige Bestandteile der Signaltransduktion bei chronischen Lungenerkrankungen wie Asthma oder COPD. So weisen diese Gene in Patienten mit Asthma und COPD eine differentielle Expression auf (Amarin et al., 2017; Hur and Broide, 2019; Yang et al., 2021). TP53 wird eine Rolle in der Induktion zellulärer Alterungsprozesse in COPD zugesprochen. Die Hochregulierung von TP53 führte darüber hinaus zu einer Zunahme des Lungenemphysems in Patienten mit COPD (Hu et al., 2018). Dem Transkriptionsfaktor FOXO3 wird eine Beteiligung in der Pathogenese von Asthma und COPD zugesprochen. So wurde ein FOXO3 Polymorphismus mit einer vermehrten Aktivierung von Mastzellen, Herunterregulation antiinflammatorischer Moleküle und Produktion proinflammatorischer Zytokine assoziiert (Barkund et al., 2015). Zudem wird eine Defizienz des FOXO3 Transkriptionsfaktors mit einer signifikant erhöhten Anfälligkeit für pulmonale Inflammation und Schädigung des Lungenparenchyms in Verbindung gebracht (Hwang et al., 2011). Einer der in unseren Beobachtungen angereicherten Signalwege in Asthma war der FOXO-Signalweg in der KEGG Pfadanalyse.

5.3 Ausblick und Schlussfolgerung

In der vorliegenden kumulativen Dissertation wird die Rolle des Atemwegsepithels in der Pathophysiologie von Asthma bronchiale dargestellt. Grundlage dafür ist die in dem Journal „*Cellular Signalling*“ publizierte Übersichtsarbeit. In der Originalarbeit im Journal „*Biomedicines*“ wird der Fokus auf vesikuläre miRNA Expressionsprofile in polarisierten humanen Atemwegsepithelien gesunder und asthmatischer Probanden gelegt. Hierbei wird insbesondere zwischen Vesikeln der basolateralen und apikalen Domäne unterschieden.

Das Atemwegsepithel gilt als ein wichtiger pathophysiologischer Bestandteil in der Entstehung und Aufrechterhaltung von Asthma bronchiale. Epithelzellen üben hierbei eine Vielzahl immunologischer Funktionen aus. Die Identifizierung der detaillierten pathophysiologischen Mechanismen, die hierbei eine Rolle spielen, ist ein essentieller Baustein, um die Pathogenese von Asthma zukünftig besser zu verstehen. Dadurch können möglicherweise Angriffspunkte für neue Therapien identifiziert werden.

Das zunehmende Interesse in der miRNA Forschung hat zu einer Flut an neuen Informationen geführt und lange Listen differentiell exprimierter miRNA für verschiedene

Diskussion

Erkrankungen hervorgebracht. Letztlich ist dabei das komplexe Netzwerk von miRNA Expressionsprofilen wahrscheinlich wesentlich bedeutender als einzelne differentiell exprimierte miRNA. Durch diese Expressionsprofile können verschiedene Erkrankungen, Krankheitsphänotypen, Krankheitsstadien oder Therapieprädiktoren leichter identifiziert werden (Kho et al., 2016; Milger et al., 2017; Panganiban et al., 2016; Rodrigo-Muñoz et al., 2019; Yu et al., 2011). miRNA Expressionsprofile als Biomarker haben somit eine wichtige diagnostische Funktion. Des Weiteren rückt die gezielte Hemmung einzelner miRNAs über sogenannte Antagomire als zukünftige Therapiestrategie zunehmend in den Fokus (Collison et al., 2011b, 2011a; Lee et al., 2017; Li et al., 2015; Mattes et al., 2009; Qin et al., 2012).

Asthma ist eine komplexe Erkrankung mit sehr variablen Phänotypen. Etablierte Therapiestrategien berücksichtigen bisher kaum die unterschiedlichen Krankheitsphänotypen und sind teils nur unzureichend in der Lage die Erkrankung adäquat zu kontrollieren. Deshalb werden neue individualisierte Therapien dringend gesucht und mit Spannung erwartet.

6 Literaturverzeichnis

- Aatonen, M.T., Öhman, T., Nyman, T.A., Laitinen, S., Grönholm, M., and Siljander, P.R.-M. (2014). Isolation and characterization of platelet-derived extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles* 3, 24692.
- Al-Alawi, M., Hassan, T., and Chotirmall, S.H. (2014). Transforming growth factor β and severe asthma: A perfect storm. *Respir. Med.* 108, 1409–1423.
- Alam, R., and Gorska, M.M. (2011). Mitogen-activated protein kinase signalling and ERK1/2 bistability in asthma. *Clin. Exp. Allergy* 41, 149–159.
- Amarin, J.Z., Naffa, R.G., Suradi, H.H., Alsaket, Y.M., Obeidat, N.M., Mahafza, T.M., and Zihlif, M.A. (2017). An intronic single-nucleotide polymorphism (rs13217795) in FOXO3 is associated with asthma and allergic rhinitis: A case-case-control study. *BMC Med. Genet.* 18, 132.
- An, S.S., Bai, T.R., Bates, J.H.T., Black, J.L., Brown, R.H., Brusasco, V., Chitano, P., Deng, L., Dowell, M., Eidelman, D.H., et al. (2007). Airway smooth muscle dynamics: A common pathway of airway obstruction in asthma. *Eur. Respir. J.* 29, 834–860.
- Anandan, C., Nurmatov, U., Van Schayck, O.C.P., and Sheikh, A. (2010). Is the prevalence of asthma declining? Systematic review of epidemiological studies. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 65, 152–167.
- Andreu, Z., and Yáñez-Mó, M. (2014). Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front. Immunol.* 5, 442.
- Arroyo, J.D., Chevillet, J.R., Kroh, E.M., Ruf, I.K., Pritchard, C.C., Gibson, D.F., Mitchell, P.S., Bennett, C.F., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Stirewalt, D.L., et al. (2011). Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 5003–5008.
- Athari, S.S. (2019). Targeting cell signaling in allergic asthma. *Signal Transduct. Target. Ther.* 4, 45.
- Ax, E., Ax, E., Jevnikar, Z., Cvjetkovic, A., Malmhäll, C., Olsson, H., Rådinger, M., and Lässer, C. (2020). T2 and T17 cytokines alter the cargo and function of airway epithelium-derived extracellular vesicles. *Respir. Res.* 21, 155.
- Bahmer, T., Krauss-Etschmann, S., Buschmann, D., Behrends, J., Watz, H., Kirsten, A.M., Pedersen, F., Waschki, B., Fuchs, O., Pfaffl, M.W., et al. (2021). RNA-seq-based profiling of extracellular vesicles in plasma reveals a potential role of miR-122-5p in asthma. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 76, 366–371.

Literaturverzeichnis

- Bao, M.H., Li, J.M., Luo, H.Q., Tang, L., Lv, Q.L., Li, G.Y., and Zhou, H.H. (2016). NF- κ B-regulated MIR-99a modulates endothelial cell inflammation. *Mediators Inflamm.* 2016, 5308170.
- Barile, L., and Vassalli, G. (2017). Exosomes: Therapy delivery tools and biomarkers of diseases. *Pharmacol. Ther.* 174, 63–78.
- Barkund, S., Shah, T., Ambatkar, N., Gadgil, M., and Joshi, K. (2015). FOXO3a Gene Polymorphism Associated with Asthma in Indian Population. *Mol. Biol. Int.* 2015, 1–6.
- Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs. *Cell* 116, 281–297.
- Bartel, S., La Grutta, S., Cilluffo, G., Perconti, G., Bongiovanni, A., Giallongo, A., Behrends, J., Kruppa, J., Hermann, S., Chiang, D., et al. (2020). Human airway epithelial extracellular vesicle miRNA signature is altered upon asthma development. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 75, 346–356.
- Bayraktar, R., Bertilaccio, M.T.S., and Calin, G.A. (2019). The interaction between two worlds: MicroRNAs and Toll-like receptors. *Front. Immunol.* 10, 1053.
- Benedikter, B.J., Bouwman, F.G., Vajen, T., Heinzmann, A.C.A., Grauls, G., Mariman, E.C., Wouters, E.F.M., Savelkoul, P.H., Lopez-Iglesias, C., Koenen, R.R., et al. (2017). Ultrafiltration combined with size exclusion chromatography efficiently isolates extracellular vesicles from cell culture media for compositional and functional studies. *Sci. Rep.* 7, 15297.
- Bisgaard, H., and Bonnelykke, K. (2010). Long-term studies of the natural history of asthma in childhood. *J. Allergy Clin. Immunol.* 126, 187–197.
- Bønnelykke, K., Vissing, N.H., Sevelsted, A., Johnston, S.L., and Bisgaard, H. (2015). Association between respiratory infections in early life and later asthma is independent of virus type. *J. Allergy Clin. Immunol.* 136, 81-86.e4.
- Bousquet, J., Jeffery, P.K., Busse, W.W., Johnson, M., and Vignola, A.M. (2000). Asthma: From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161, 1720–1745.
- Braido, F., Tiotiu, A., Kowal, K., Mihaicuta, S., Novakova, P., and Oguzulgen, I.K. (2018). Phenotypes/endotypes-driven treatment in asthma. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 18, 184–189.
- Buhl, R., Bals, R., Baur, X., Berdel, D., Criée, C.-P., Gappa, M., Gillissen, A., Greulich, T., Haidl, P., Hamelmann, E., et al. (2017). Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit Asthma 2005, Update 2017. Dtsch. Gesellschaft Für Pneumol. Und Beatmungsmedizin; Dtsch. Atemwegsliga 101, 60–64.

Literaturverzeichnis

Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), A. der W.M.F. (AWMF) (2018). Nationale VersorgungsLeitlinie Asthma – Langfassung, 3. Auflage. Version 1. 3, 270.

Buonfiglioli, A., Efe, I.E., Guneykaya, D., Ivanov, A., Huang, Y., Orłowski, E., Krüger, C., Deisz, R.A., Markovic, D., Flüh, C., et al. (2019). let-7 MicroRNAs Regulate Microglial Function and Suppress Glioma Growth through Toll-Like Receptor 7. *Cell Rep.* 29, 3460-3471.e7.

Buschmann, D., Kirchner, B., Hermann, S., Märte, M., Wurmser, C., Brandes, F., Kotschote, S., Bonin, M., Steinlein, O.K., Pfaffl, M.W., et al. (2018). Evaluation of serum extracellular vesicle isolation methods for profiling miRNAs by next-generation sequencing. *J. Extracell. Vesicles* 7, 1481321.

Busse, W.W., Holgate, S., Kerwin, E., Chon, Y., Feng, J.Y., Lin, J., and Lin, S.L. (2013). Randomized, double-blind, placebo-controlled study of brodalumab, a human anti-IL-17 receptor monoclonal antibody, in moderate to severe asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 188, 1294–1302.

Caruso, S., and Poon, I.K.H. (2018). Apoptotic Cell-Derived Extracellular Vesicles: More Than Just Debris. *Front. Immunol.* 9, 1486.

Chen, Y., Thai, P., Zhao, Y.H., Ho, Y.S., DeSouza, M.M., and Wu, R. (2003). Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop. *J. Biol. Chem.* 278, 17036–17043.

Chevillet, J.R., Kang, Q., Ruf, I.K., Briggs, H.A., Vojtech, L.N., Hughes, S.M., Cheng, H.H., Arroyo, J.D., Meredith, E.K., Gallichotte, E.N., et al. (2014). Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 14888–14893.

Chung, K.F. (2016). Asthma phenotyping: A necessity for improved therapeutic precision and new targeted therapies. *J. Intern. Med.* 279, 192–204.

Cohen, L., E, X., Tarsi, J., Ramkumar, T., Horiuchi, T.K., Cochran, R., DeMartino, S., Schechtman, K.B., Hussain, I., Holtzman, M.J., et al. (2007). Epithelial Cell Proliferation Contributes to Airway Remodeling in Severe Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 176, 138–145.

Collison, A., Mattes, J., Plank, M., and Foster, P.S. (2011a). Inhibition of house dust mite-induced allergic airways disease by antagonism of microRNA-145 is comparable to glucocorticoid treatment. *J. Allergy Clin. Immunol.* 128, 160-167.e4.

Collison, A., Herbert, C., Siegle, J.S., Mattes, J., Foster, P.S., and Kumar, R.K. (2011b). Altered expression of microRNA in the airway wall in chronic asthma: miR-126 as a potential

Literaturverzeichnis

therapeutic target. *BMC Pulm. Med.* 11, 29.

Crescitelli, R., Lässer, C., Szabó, T.G., Kittel, A., Eldh, M., Dianzani, I., Buzás, E.I., and Lötvall, J. (2013). Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: Apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *J. Extracell. Vesicles* 2, 20677.

Deregibus, M.C., Figliolini, F., D'Antico, S., Manzini, P.M., Pasquino, C., De Lena, M., Tetta, C., Brizzi, M.F., and Camussi, G. (2016). Charge-based precipitation of extracellular vesicles. *Int. J. Mol. Med.* 38, 1359–1366.

Eder, W., Ege, M.J., and von Mutius, E. (2006). The Asthma Epidemic. *N. Engl. J. Med.* 355, 2226–2235.

Elbehidy, R.M., Youssef, D.M., El-Shal, A.S., Shalaby, S.M., Sherbiny, H.S., Sherief, L.M., and Akeel, N.E. (2016). MicroRNA-21 as a novel biomarker in diagnosis and response to therapy in asthmatic children. *Mol. Immunol.* 71, 107–114.

Enderle, D., Spiel, A., Coticchia, C.M., Berghoff, E., Mueller, R., Schlumpberger, M., Sprenger-Haussels, M., Shaffer, J.M., Lader, E., Skog, J., et al. (2015). Characterization of RNA from exosomes and other extracellular vesicles isolated by a novel spin column-based method. *PLoS One* 10, e0136133.

Entwistle, L., Aegerter, H., Czieso, S., Amaniti, E., Guidi, R., Sesay, A., Nikolov, N., Chakravaty, P., Huynh, A., Mills, J., et al. (2021). Inhibition of miR-99a-5p prevents allergen-driven airway exacerbations without compromising type-2 memory responses in the intestine following helminth infection. *Mucosal Immunol.* 14, 912–922.

Escola, J.M., Kleijmeer, M.J., Stoorvogel, W., Griffith, J.M., Yoshie, O., and Geuze, H.J. (1998). Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 273, 20121–20127.

Esposito, S., Tenconi, R., Lelii, M., Preti, V., Nazzari, E., Consolo, S., and Patria, M.F. (2014). Possible molecular mechanisms linking air pollution and asthma in children. *BMC Pulm. Med.* 14, 31.

Fabbri, M., Paone, A., Calore, F., Galli, R., Gaudio, E., Santhanam, R., Lovat, F., Fadda, P., Mao, C., Nuovo, G.J., et al. (2012). MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E2110-6.

Fitzner, D., Schnaars, M., van Rossum, D., Krishnamoorthy, G., Dibaj, P., Bakhti, M., Regen, T., Hanisch, U.-K., and Simons, M. (2011). Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *J. Cell Sci.* 124, 447–458.

Literaturverzeichnis

- Fogli, L.K., Sundrud, M.S., Goel, S., Bajwa, S., Jensen, K., Derudder, E., Sun, A., Coffre, M., Uyttenhove, C., Van Snick, J., et al. (2013). T Cell–Derived IL-17 Mediates Epithelial Changes in the Airway and Drives Pulmonary Neutrophilia. *J. Immunol.* *191*, 3100–3111.
- Frey, A., Lunding, L.P., Ehlers, J.C., Weckmann, M., Zissler, U.M., and Wegmann, M. (2020). More Than Just a Barrier: The Immune Functions of the Airway Epithelium in Asthma Pathogenesis. *Front. Immunol.* *11*, 761.
- Fritz, J. V., Heintz-Buschart, A., Ghosal, A., Wampach, L., Etheridge, A., Galas, D., and Wilmes, P. (2016). Sources and Functions of Extracellular Small RNAs in Human Circulation. *Annu. Rev. Nutr.* *36*, 301–336.
- Fujisawa, T., Chang, M.M.J., Velichko, S., Thai, P., Hung, L.Y., Huang, F., Phuong, N., Chen, Y., and Wu, R. (2011). NF- κ B mediates IL-1 β - and IL-17A-induced MUC5B expression in airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *45*, 246–252.
- Fuseini, H., and Newcomb, D.C. (2017). Mechanisms Driving Gender Differences in Asthma. *Curr. Allergy Asthma Rep.* *17*, 19.
- Gasser, O., Hess, C., Miot, S., Deon, C., Sanchez, J.C., and Schifferli, J.A. (2003). Characterisation and properties of ectosomes released by human polymorphonuclear neutrophils. *Exp. Cell Res.* *285*, 243–257.
- Gauthier, M., Ray, A., and Wenzel, S.E. (2015). Evolving concepts of asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *192*, 660–668.
- Gibbs, J.E., Beesley, S., Plumb, J., Singh, D., Farrow, S., Ray, D.W., and Loudon, A.S.I. (2009). Circadian timing in the lung; A specific role for bronchiolar epithelial cells. *Endocrinology* *150*, 268–276.
- Global Initiative for Asthma (GINA) (2019). Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *31*, 143–178.
- Gon, Y., and Hashimoto, S. (2018). Role of airway epithelial barrier dysfunction in pathogenesis of asthma. *Allergol. Int.* *67*, 12–17.
- Gong, J.H., Cho, I.H., Shin, D., Han, S.Y., Park, S.H., and Kang, Y.H. (2014). Inhibition of airway epithelial-to-mesenchymal transition and fibrosis by kaempferol in endotoxin-induced epithelial cells and ovalbumin-sensitized mice. *Lab. Investig.* *94*, 297–308.
- Green, R.H., Brightling, C.E., Woltmann, G., Parker, D., Wardlaw, A.J., and Pavord, I.D. (2002). Analysis of induced sputum in adults with asthma: Identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. *Thorax* *57*, 875–879.

Literaturverzeichnis

- Guo, H., Ingolia, N.T., Weissman, J.S., and Bartel, D.P. (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466, 835–840.
- Gupta, R., Radicioni, G., Abdelwahab, S., Dang, H., Carpenter, J., Chua, M., Mieczkowski, P.A., Sheridan, J.T., Randell, S.H., and Kesimer, M. (2019). Intercellular communication between airway epithelial cells is mediated by exosome-like vesicles. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 60, 209–220.
- Haddad, A., Gaudet, M., Plesa, M., Allakhverdi, Z., Mogas, A.K., Audusseau, S., Baglolle, C.J., Eidelman, D.H., Olivenstein, R., Ludwig, M.S., et al. (2019). Neutrophils from severe asthmatic patients induce epithelial to mesenchymal transition in healthy bronchial epithelial cells. *Respir. Res.* 20, 234.
- Haj-Salem, I., Fakhfakh, R., Bérubé, J.C., Jacques, E., Plante, S., Simard, M.J., Bossé, Y., and Chakir, J. (2015). MicroRNA-19a enhances proliferation of bronchial epithelial cells by targeting TGF β R2 gene in severe asthma. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 70, 212–219.
- Harding, C., Heuser, J., and Stahl, P. (1983). Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J. Cell Biol.* 97, 329–339.
- Hasan, S., Sebo, P., and Osicka, R. (2018). A guide to polarized airway epithelial models for studies of host–pathogen interactions. *FEBS J.* 285, 4343–4358.
- Heidemann, C., Scheidt-Nave, C., Beyer, A., Baumert, J., and Thamm, R. (2021). Gesundheitliche Lage von Erwachsenen in Deutschland – Ergebnisse zu ausgewählten Indikatoren der Studie GEDA 2019/2020-EHIS. *J. Heal. Monit.* 6, 3–27.
- Heijnen, H.F.G., Schiel, A.E., Fijnheer, R., Geuze, H.J., and Sixma, J.J. (1999). Activated Platelets Release Two Types of Membrane Vesicles: Microvesicles by Surface Shedding and Exosomes Derived From Exocytosis of Multivesicular Bodies and α -Granules. *Blood* 94, 3791–3799.
- Hewitt, R.J., and Lloyd, C.M. (2021). Regulation of immune responses by the airway epithelial cell landscape. *Nat. Rev. Immunol.* 21, 347–362.
- Holgate, S.T. (2011). The sentinel role of the airway epithelium in asthma pathogenesis. *Immunol. Rev.* 242, 205–219.
- Holgate, S.T. (2012). Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat. Med.* 18, 673–683.
- Holgate, S.T., and Davies, D.E. (2009). Rethinking the Pathogenesis of Asthma. *Immunity* 31, 362–367.

Literaturverzeichnis

- Hough, K.P., Wilson, L.S., Trevor, J.L., Strenkowski, J.G., Maina, N., Kim, Y. II, Spell, M.L., Wang, Y., Chanda, D., Dager, J.R., et al. (2018). Unique Lipid Signatures of Extracellular Vesicles from the Airways of Asthmatics. *Sci. Rep.* 8, 10340.
- Hu, W.P., Zeng, Y.Y., Zuo, Y.H., and Zhang, J. (2018). Identification of novel candidate genes involved in the progression of emphysema by bioinformatic methods. *Int. J. COPD* 13, 3733–3747.
- Huang, H., Lu, H., Liang, L., Zhi, Y., Huo, B., Wu, L., Xu, L., and Shen, Z. (2019). MicroRNA-744 inhibits proliferation of bronchial epithelial cells by regulating smad3 pathway via targeting transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in severe asthma. *Med. Sci. Monit.* 25, 2159–2168.
- Huang, X., Yuan, T., Tschannen, M., Sun, Z., Jacob, H., Du, M., Liang, M., Dittmar, R.L., Liu, Y., Liang, M., et al. (2013). Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC Genomics* 14, 319.
- Hur, G.Y., and Broide, D.H. (2019). Genes and pathways regulating decline in lung function and airway remodeling in asthma. *Allergy, Asthma Immunol. Res.* 11, 604–621.
- Hwang, J., Rajendrasozhan, S., Yao, H., Chung, S., Sundar, I.K., Huyck, H.L., Pryhuber, G.S., Kinnula, V.L., and Rahman, I. (2011). FOXO3 Deficiency Leads to Increased Susceptibility to Cigarette Smoke-Induced Inflammation, Airspace Enlargement, and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J. Immunol.* 187, 987–998.
- Illi, S., von Mutius, E., Lau, S., Niggemann, B., Grüber, C., and Wahn, U. (2006). Perennial allergen sensitisation early in life and chronic asthma in children: a birth cohort study. *Lancet* 368, 763–770.
- Ingram, J.L., and Kraft, M. (2012). IL-13 in asthma and allergic disease: Asthma phenotypes and targeted therapies. *J. Allergy Clin. Immunol.* 130, 829–842.
- Jackson, D.J., Gangnon, R.E., Evans, M.D., Roberg, K.A., Anderson, E.L., Pappas, T.E., Printz, M.C., Lee, W.M., Shult, P.A., Reisdorf, E., et al. (2008). Wheezing rhinovirus illnesses in early life predict asthma development in high-risk children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 178, 667–672.
- Janowska-Wieczorek, A., Majka, M., Kijowski, J., Baj-Krzyworzeka, M., Reza, R., Robert Turner, A., Ratajczak, J., Emerson, S.G., Anna Kowalska, M., and Ratajczak, M.Z. (2001). Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment. *Blood* 98, 3143–3149.
- Jardim, M.J., Dailey, L., Silbajoris, R., and Diaz-Sanchez, D. (2012). Distinct microRNA expression in human airway cells of asthmatic donors identifies a novel asthma-associated

Literaturverzeichnis

gene. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 47, 536–542.

Jayasinghe, H., Kopsaftis, Z., and Carson, K. (2015). Asthma Bronchiale and Exercise-Induced Bronchoconstriction. *Respiration* 89, 505–512.

Jeppesen, D.K., Fenix, A.M., Franklin, J.L., Higginbotham, J.N., Zhang, Q., Zimmerman, L.J., Liebler, D.C., Ping, J., Liu, Q., Evans, R., et al. (2019). Reassessment of Exosome Composition. *Cell* 177, 428-445.e18.

Johnstone, R.M., Adam, M., Hammond, J.R., Orr, L., and Turbide, C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J. Biol. Chem.* 262, 9412–9420.

Jude, J.A., Dileepan, M., Subramanian, S., Solway, J., Panettieri, R.A., Panettieri, R.A., Walseth, T.F., and Kannan, M.S. (2012). MiR-140-3p regulation of TNF- α -induced CD38 expression in human airway smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 303, L460-8.

Juncadella, I.J., Kadl, A., Sharma, A.K., Shim, Y.M., Hochreiter-Hufford, A., Borish, L., and Ravichandran, K.S. (2013). Apoptotic cell clearance by bronchial epithelial cells critically influences airway inflammation. *Nature* 493, 547–551.

Kahn, R., Mossberg, M., Ståhl, A. Ie, Johansson, K., Lopatko Lindman, I., Heijl, C., Segelmark, M., Mörgelin, M., Leeb-Lundberg, L.M.F., and Karpman, D. (2017). Microvesicle transfer of kinin B1-receptors is a novel inflammatory mechanism in vasculitis. *Kidney Int.* 91, 96–105.

Kato, A. (2019). Group 2 Innate Lymphoid Cells in Airway Diseases. *Chest* 156, 141–149.

Kho, A.T., Sharma, S., Davis, J.S., Spina, J., Howard, D., McEnroy, K., Moore, K., Sylvia, J., Qiu, W., Weiss, S.T., et al. (2016). Circulating microRNAs: Association with lung function in asthma. *PLoS One* 11, e0157998.

Kim, R.Y., Horvat, J.C., Pinkerton, J.W., Starkey, M.R., Essilfie, A.T., Mayall, J.R., Nair, P.M., Hansbro, N.G., Jones, B., Haw, T.J., et al. (2017). MicroRNA-21 drives severe, steroid-insensitive experimental asthma by amplifying phosphoinositide 3-kinase-mediated suppression of histone deacetylase 2. *J. Allergy Clin. Immunol.* 139, 519–532.

Kim, R.Y., Sunkara, K.P., Bracke, K.R., Jarnicki, A.G., Donovan, C., Hsu, A.C., Ieni, A., Beckett, E.L., Galvão, I., Wijnant, S., et al. (2021). A microRNA-21-mediated SATB1/S100A9/NF- κ B axis promotes chronic obstructive pulmonary disease pathogenesis. *Sci. Transl. Med.* 13.

Kimura, K., Hohjoh, H., Fukuoka, M., Sato, W., Oki, S., Tomi, C., Yamaguchi, H., Kondo, T., Takahashi, R., and Yamamura, T. (2018). Circulating exosomes suppress the induction of

Literaturverzeichnis

regulatory T cells via let-7i in multiple sclerosis. *Nat. Commun.* 9, 17.

Koczulla, A.R., Vogelmeier, C.F., Garn, H., and Renz, H. (2017). New concepts in asthma: clinical phenotypes and pathophysiological mechanisms. *Drug Discov. Today* 22, 388–396.

Kowal, J., Arras, G., Colombo, M., Jouve, M., Morath, J.P., Primdal-Bengtson, B., Dingli, F., Loew, D., Tkach, M., and Théry, C. (2016). Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, E968–E977.

Kulshreshtha, A., Ahmad, T., Agrawal, A., and Ghosh, B. (2013). Proinflammatory role of epithelial cell-derived exosomes in allergic airway inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 131, 1194–1203, 1203.e1-14.

Kumar, M., Ahmad, T., Sharma, A., Mabalirajan, U., Kulshreshtha, A., Agrawal, A., and Ghosh, B. (2011). Let-7 microRNA-mediated regulation of IL-13 and allergic airway inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 128, 1077-85.e1-10.

Kuo, C.H.S., Pavlidis, S., Loza, M., Baribaud, F., Rowe, A., Pandis, I., Sousa, A., Corfield, J., Djukanovic, R., Lutter, R., et al. (2017). T-helper cell type 2 (Th2) and non-Th2 molecular phenotypes of asthma using sputum transcriptomics in U-BIOPRED. *Eur. Respir. J.* 49, 1602135.

Kuruville, M.E., Lee, F.E.-H., and Lee, G.B. (2019). Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 56, 219–233.

Lambrecht, B.N., and Hammad, H. (2012). The airway epithelium in asthma. *Nat. Med.* 18, 684–692.

Lässer, C., O’Neil, S.E., Shelke, G. V., Sihlbom, C., Hansson, S.F., Gho, Y.S., Lundbäck, B., and Lötvall, J. (2016). Exosomes in the nose induce immune cell trafficking and harbour an altered protein cargo in chronic airway inflammation. *J. Transl. Med.* 14, 181.

Lee, H.Y., Lee, H.Y., Choi, J.Y., Hur, J., Kim, I.K., Kim, Y.K., Kang, J.Y., and Lee, S.Y. (2017). Inhibition of MicroRNA-21 by an antagomir ameliorates allergic inflammation in a mouse model of asthma. *Exp. Lung Res.* 43, 109–119.

Levänen, B., Bhakta, N.R., Torregrosa Paredes, P., Barbeau, R., Hiltbrunner, S., Pollack, J.L., Sköld, C.M., Svartengren, M., Grunewald, J., Gabrielsson, S., et al. (2013). Altered microRNA profiles in bronchoalveolar lavage fluid exosomes in asthmatic patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* 131, 894–903.

Li, J.J., Tay, H.L., Maltby, S., Xiang, Y., Evers, F., Hatchwell, L., Zhou, H., Toop, H.D., Morris,

Literaturverzeichnis

- J.C., Nair, P., et al. (2015). MicroRNA-9 regulates steroid-resistant airway hyperresponsiveness by reducing protein phosphatase 2A activity. *J. Allergy Clin. Immunol.* *136*, 462–473.
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., and Sun, S.C. (2017). NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* *2*, 17023.
- Lloyd, C.M., and Saglani, S. (2015). Epithelial cytokines and pulmonary allergic inflammation. *Curr. Opin. Immunol.* *34*, 52–58.
- Lu, T.X., Munitz, A., and Rothenberg, M.E. (2009). MicroRNA-21 Is Up-Regulated in Allergic Airway Inflammation and Regulates IL-12p35 Expression. *J. Immunol.* *182*, 4994–5002.
- De Luca, A., Pariano, M., Cellini, B., Costantini, C., Vilella, V.R., Jose, S.S., Palmieri, M., Borghi, M., Galosi, C., Paolicelli, G., et al. (2017). The IL-17F/IL-17RC Axis Promotes Respiratory Allergy in the Proximal Airways. *Cell Rep.* *20*, 1667–1680.
- Ma, J., Strub, P., Lv, N., Xiao, L., Camargo, C.A., Buist, A.S., Lavori, P.W., Wilson, S.R., Nadeau, K.C., and Rosas, L.G. (2016). Pilot randomised trial of a healthy eating behavioural intervention in uncontrolled asthma. *Eur. Respir. J.* *47*, 122–132.
- Mack, M., Kleinschmidt, A., Brühl, H., Klier, C., Nelson, P.J., Cihak, J., Plachý, J., Stangassinger, M., Erfle, V., and Schlöndorff, D. (2000). Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: A mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nat. Med.* *6*, 769–775.
- Marzesco, A.-M. (2005). Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. *J. Cell Sci.* *118*, 2849–2858.
- Mateescu, B., Kowal, E.J.K., van Balkom, B.W.M., Bartel, S., Bhattacharyya, S.N., Buzás, E.I., Buck, A.H., de Candia, P., Chow, F.W.N., Das, S., et al. (2017). Obstacles and opportunities in the functional analysis of extracellular vesicle RNA - an ISEV position paper. *J. Extracell. Vesicles* *6*, 1286095.
- Mathieu, M., Névo, N., Jouve, M., Valenzuela, J.I., Maurin, M., Verweij, F.J., Palmulli, R., Lankar, D., Dingli, F., Loew, D., et al. (2021). Specificities of exosome versus small ectosome secretion revealed by live intracellular tracking of CD63 and CD9. *Nat. Commun.* *12*, 4389.
- Mathivanan, S., Ji, H., and Simpson, R.J. (2010). Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *J. Proteomics* *73*, 1907–1920.
- Mathur, S.K., and Viswanathan, R.K. (2014). Relevance of allergy in adult asthma topical collection on allergens. *Curr. Allergy Asthma Rep.* *14*, 437.

Literaturverzeichnis

- Mattes, J., Collison, A., Plank, M., Phipps, S., and Foster, P.S. (2009). Antagonism of microRNA-126 suppresses the effector function of T H2 cells and the development of allergic airways disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 18704–18709.
- McGrath, K.W., Icitovic, N., Boushey, H.A., Lazarus, S.C., Sutherland, E.R., Chinchilli, V.M., and Fahy, J. V. (2012). A large subgroup of mild-to-moderate asthma is persistently noneosinophilic. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *185*, 612–619.
- Mendes, F.C., Paciência, I., Ferreira, A.C., Martins, C., Rufo, J.C., Silva, D., Cunha, P., Farraia, M., Moreira, P., Delgado, L., et al. (2019). Development and validation of exhaled breath condensate microRNAs to identify and endotype asthma in children. *PLoS One* *14*, e0224983.
- Mercer, R.R., Russell, M.L., Roggli, V.L., and Crapo, J.D. (1994). Cell number and distribution in human and rat airways. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *10*, 613–624.
- Meyers, D.A. (2010). Genetics of asthma and allergy: What have we learned? *J. Allergy Clin. Immunol.* *126*, 439–446.
- Miethe, S., Guarino, M., Alhamdan, F., Simon, H.-U., Renz, H., Dufour, J.-F., Potaczek, D.P., and Garn, H. (2018). The effects of obesity on asthma: immunometabolic links. *Polish Arch. Intern. Med.* *128*, 469–477.
- de Miguel Pérez, D., Rodriguez Martínez, A., Ortigosa Palomo, A., Delgado Ureña, M., Garcia Puche, J.L., Robles Remacho, A., Exposito Hernandez, J., Lorente Acosta, J.A., Ortega Sánchez, F.G., and Serrano, M.J. (2020). Extracellular vesicle-miRNAs as liquid biopsy biomarkers for disease identification and prognosis in metastatic colorectal cancer patients. *Sci. Rep.* *10*, 3974.
- Milger, K., Götschke, J., Krause, L., Nathan, P., Alessandrini, F., Tufman, A., Fischer, R., Bartel, S., Theis, F.J., Behr, J., et al. (2017). Identification of a plasma miRNA biomarker signature for allergic asthma: A translational approach. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* *72*, 1962–1971.
- Mitchell, C., Provost, K., Niu, N., Homer, R., and Cohn, L. (2011). IFN- γ Acts on the Airway Epithelium To Inhibit Local and Systemic Pathology in Allergic Airway Disease. *J. Immunol.* *187*, 3815–3820.
- Mohan, A., Agarwal, S., Clauss, M., Britt, N.S., and Dhillon, N.K. (2020). Extracellular vesicles: Novel communicators in lung diseases. *Respir. Res.* *21*, 1–21.
- Moore, W.C., Hastie, A.T., Li, X., Li, H., Busse, W.W., Jarjour, N.N., Wenzel, S.E., Peters, S.P., Meyers, D.A., and Bleecker, E.R. (2014). Sputum neutrophil counts are associated with more severe asthma phenotypes using cluster analysis. *J. Allergy Clin. Immunol.* *133*, 1557.

Literaturverzeichnis

Morelli, A.E., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Sullivan, M.L.G., Stolz, D.B., Papworth, G.D., Zahorchak, A.F., Logar, A.J., Wang, Z., Watkins, S.C., et al. (2004). Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood* 104, 3257–3266.

National Asthma Education and Prevention Program: Third Expert Panel on the Diagnosis and Management of Asthma (2007). Expert Panel Report 3 (EPR-3): Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma—Summary Report 2007.

Van Niel, G., Porto-Carreiro, I., Simoes, S., and Raposo, G. (2006). Exosomes: A common pathway for a specialized function. *J. Biochem.* 140, 13–21.

O'Brien, K., Breyne, K., Ughetto, S., Laurent, L.C., and Breakefield, X.O. (2020). RNA delivery by extracellular vesicles in mammalian cells and its applications. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21, 585–606.

O'Garra, A. (1998). Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 8, 275–283.

Okoye, I.S., Coomes, S.M., Pelly, V.S., Czieso, S., Papayannopoulos, V., Tolmachova, T., Seabra, M.C., and Wilson, M.S. (2014). MicroRNA-Containing T-Regulatory-Cell-Derived Exosomes Suppress Pathogenic T Helper 1 Cells. *Immunity* 41, 89–103.

Ong, J., Timens, W., Rajendran, V., Algra, A., Spira, A., Lenburg, M.E., Campbell, J.D., Van Den Berge, M., Postma, D.S., Van Den Berg, A., et al. (2017). Identification of transforming growth factor-beta-regulated microRNAs and the microRNAtargetomes in primary lung fibroblasts. *PLoS One* 12, e0183815.

Ordoñez, C.L., Shaughnessy, T.E., Matthay, M.A., and Fahy, J. V. (2000). Increased neutrophil numbers and IL-8 levels in airway secretions in acute severe asthma: Clinical and biologic significance. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161, 1185–1190.

Ordovas-Montanes, J., Dwyer, D.F., Nyquist, S.K., Buchheit, K.M., Vukovic, M., Deb, C., Wadsworth, M.H., Hughes, T.K., Kazer, S.W., Yoshimoto, E., et al. (2018). Allergic inflammatory memory in human respiratory epithelial progenitor cells. *Nature* 560, 649–654.

Østergaard, O., Nielsen, C.T., Iversen, L. V., Jacobsen, S., Tanassi, J.T., and Heegaard, N.H.H. (2012). Quantitative proteome profiling of normal human circulating microparticles. *J. Proteome Res.* 11, 2154–2163.

Oyanagi, T., Takizawa, T., Aizawa, A., Solongo, O., Yagi, H., Nishida, Y., Koyama, H., Saitoh, A., and Arakawa, H. (2017). Suppression of MUC5AC expression in human bronchial epithelial cells by interferon- γ . *Allergol. Int.* 66, 75–82.

Literaturverzeichnis

- Pan, B.T., and Johnstone, R.M. (1983). Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor. *Cell* 33, 967–978.
- Pan, B.T., Teng, K., Wu, C., Adam, M., and Johnstone, R.M. (1985). Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J. Cell Biol.* 101, 942–948.
- Panganiban, R.P., Wang, Y., Howrylak, J., Chinchilli, V.M., Craig, T.J., August, A., and Ishmael, F.T. (2016). Circulating microRNAs as biomarkers in patients with allergic rhinitis and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 137, 1423–1432.
- Pearce, N; Ait-Khaled, N; Beasley, R; Mallol, J; Keil, U; Mitchell, E; Robertson, C. and the I.P.T.S.G. (2007). Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax* 62, 758–766.
- Pesu, M., Aittomäki, S., Takaluoma, K., Lagerstedt, A., and Silvennoinen, O. (2002). p38 mitogen-activated protein kinase regulates interleukin-4-induced gene expression by stimulating STAT6-mediated transcription. *J. Biol. Chem.* 277, 38254–38261.
- Peters, U., Dixon, A.E., and Forno, E. (2018). Obesity and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 141, 1169–1179.
- Pham, D.L., Ban, G.Y., Kim, S.H., Shin, Y.S., Ye, Y.M., Chwae, Y.J., and Park, H.S. (2017). Neutrophil autophagy and extracellular DNA traps contribute to airway inflammation in severe asthma. *Clin. Exp. Allergy* 47, 57–70.
- Poethko-Müller, C., Thamm, M., and Thamm, R. (2018). Heuschnupfen und Asthma bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland – Querschnitt- ergebnisse aus KiGGS Welle 2 und Trends. *J. Heal. Monit.* 3, 55–59.
- Polosa, R., and Thomson, N.C. (2013). Smoking and asthma: Dangerous liaisons. *Eur. Respir. J.* 41, 716–725.
- Potaczek, D.P., Miethe, S., Schindler, V., Alhamdan, F., and Garn, H. (2020). Role of airway epithelial cells in the development of different asthma phenotypes. *Cell. Signal.* 69, 109523.
- Poynter, M.E., Irvin, C.G., and Janssen-Heininger, Y.M.W. (2002). Rapid activation of nuclear factor- κ B in airway epithelium in a murine model of allergic airway inflammation. *Am. J. Pathol.* 160, 1325–1334.
- Poynter, M.E., Cloots, R., van Woerkom, T., Butnor, K.J., Vacek, P., Taatjes, D.J., Irvin, C.G., and Janssen-Heininger, Y.M.W. (2004). NF- κ B Activation in Airways Modulates Allergic Inflammation but Not Hyperresponsiveness. *J. Immunol.* 173, 7003–7009.

Literaturverzeichnis

- Qin, H.B., Xu, B., Mei, J.J., Li, D., Liu, J.J., Zhao, D.Y., and Liu, F. (2012). Inhibition of miRNA-221 suppresses the airway inflammation in asthma. *Inflammation* 35, 1595–1599.
- Quek, C., Bellingham, S.A., Jung, C.H., Scicluna, B.J., Shambrook, M.C., Sharples, R.A., Cheng, L., and Hill, A.F. (2017). Defining the purity of exosomes required for diagnostic profiling of small RNA suitable for biomarker discovery. *RNA Biol.* 14, 245–258.
- Rackemann, F.M. (1947). A working classification of asthma. *Am. J. Med.* 3, 601–606.
- Raposo, G. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* 183, 1161–1172.
- Ratajczak, M.Z., and Ratajczak, J. (2020). Extracellular microvesicles/exosomes: discovery, disbelief, acceptance, and the future? *Leukemia* 34, 3126–3135.
- Ratajczak, J., Miekus, K., Kucia, M., Zhang, J., Reca, R., Dvorak, P., and Ratajczak, M.Z. (2006). Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: Evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* 20, 847–856.
- Raundhal, M., Morse, C., Khare, A., Oriss, T.B., Milosevic, J., Trudeau, J., Huff, R., Pilewski, J., Holguin, F., Kolls, J., et al. (2015). High IFN- γ and low SLPI mark severe asthma in mice and humans. *J. Clin. Invest.* 125, 3037–3050.
- Ritz, T., Wittchen, H.U., Klotsche, J., Mühlig, S., and Riedel, O. (2016). Asthma trigger reports are associated with low quality of life, exacerbations, and emergency treatments. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 13, 204–211.
- Robinson, D.S., Hamid, Q., Ying, S., Tsicopoulos, A., Barkans, J., Bentley, A.M., Corrigan, C., Durham, S.R., and Kay, A.B. (1992). Predominant T H2 -like Bronchoalveolar T-Lymphocyte Population in Atopic Asthma. *N. Engl. J. Med.* 326, 298–304.
- Rodrigo-Muñoz, J.M., Rial, M.J., Sastre, B., Cañas, J.A., Mahillo-Fernández, I., Quirce, S., Sastre, J., Cosío, B.G., and Del Pozo, V. (2019). Circulating miRNAs as diagnostic tool for discrimination of respiratory disease: Asthma, asthma-chronic obstructive pulmonary disease (COPD) overlap and COPD. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 74, 2491–2494.
- Rossios, C., Pavlidis, S., Hoda, U., Kuo, C.H., Wiegman, C., Russell, K., Sun, K., Loza, M.J., Baribaud, F., Durham, A.L., et al. (2018). Sputum transcriptomics reveal upregulation of IL-1 receptor family members in patients with severe asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 141, 560–570.
- Saito, M., Mitani, A., Ishimori, T., Miyashita, N., Isago, H., Mikami, Y., Noguchi, S., Tarui, M., and Nagase, T. (2020). Active mTOR in lung epithelium promotes epithelial-mesenchymal

Literaturverzeichnis

- transition and enhances lung fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 62, 699–708.
- Sastre, B., Cañas, J.A., Rodrigo-Muñoz, J.M., and del Pozo, V. (2017). Novel modulators of asthma and allergy: Exosomes and microRNAs. *Front. Immunol.* 8, 826.
- Sawant, D., Yao, W., Wright, Z., Sawyers, C., Tepper, R., Gupta, S., Kaplan, M., and Dent, A. (2015). Serum MicroRNA-21 as a Biomarker for Allergic Inflammatory Disease in Children. *MicroRNA* 4, 36–40.
- Schindler, V.E.M., Alhamdan, F., Preußner, C., Hintz, L., Alhamwe, B.A., Nist, A., Stiewe, T., von Strandmann, E.P., Potaczek, D.P., Thölken, C., et al. (2022). Side-Directed Release of Differential Extracellular Vesicle-associated microRNA Profiles from Bronchial Epithelial Cells of Healthy and Asthmatic Subjects. *Biomedicines* 10.
- Sears, M.R. (2014). Trends in the prevalence of asthma. *Chest* 145, 219–225.
- Sears, M.R., Greene, J.M., Willan, A.R., Wiecek, E.M., Taylor, D.R., Flannery, E.M., Cowan, J.O., Herbison, G.P., Silva, P.A., and Poulton, R. (2003). A Longitudinal, Population-Based, Cohort Study of Childhood Asthma Followed to Adulthood. *N. Engl. J. Med.* 349, 1414–1422.
- Sharrow, S.O., Mathieson, B.J., and Singer, A. (1981). Cell surface appearance of unexpected host MHC determinants on thymocytes from radiation bone marrow chimeras. *J. Immunol.* 126, 1327–1335.
- Simons, M., and Mlodzik, M. (2008). Planar cell polarity signaling: From fly development to human disease. *Annu. Rev. Genet.* 42, 517–540.
- Simpson, J.L., Phipps, S., Baines, K.J., Oreo, K.M., Gunawardhana, L., and Gibson, P.G. (2014). Elevated expression of the NLRP3 inflammasome in neutrophilic asthma. In *European Respiratory Journal*, pp. 1067–1076.
- Simpson, R.J., Kalra, H., and Mathivanan, S. (2012). Exocarta as a resource for exosomal research. *J. Extracell. Vesicles* 1, 18374.
- Solberg, O.D., Ostrin, E.J., Love, M.I., Peng, J.C., Bhakta, N.R., Hou, L., Nguyen, C., Solon, M., Nguyen, C., Barczak, A.J., et al. (2012). Airway epithelial miRNA expression is altered in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 186, 965–974.
- Stranska, R., Gysbrechts, L., Wouters, J., Vermeersch, P., Bloch, K., Dierickx, D., Andrei, G., and Snoeck, R. (2018). Comparison of membrane affinity-based method with size-exclusion chromatography for isolation of exosome-like vesicles from human plasma. *J. Transl. Med.* 16, 1.
- Suissa, S., and Ernst, P. (2001). Inhaled corticosteroids: Impact on asthma morbidity and

Literaturverzeichnis

mortality. *J. Allergy Clin. Immunol.* *107*, 937–944.

Suzuki, M., Konno, S., Makita, H., Shimizu, K., Kimura, H., Kimura, H., and Nishimura, M. (2016). Altered circulating exosomal RNA profiles detected by next-generation sequencing in patients with severe asthma. In *3.1 Molecular Pathology and Functional Genomics*, (European Respiratory Society), p. PA3410.

Takahashi, Y., Nishikawa, M., Shinotsuka, H., Matsui, Y., Ohara, S., Imai, T., and Takakura, Y. (2013). Visualization and in vivo tracking of the exosomes of murine melanoma B16-BL6 cells in mice after intravenous injection. *J. Biotechnol.* *165*, 77–84.

Tang, Y.T., Huang, Y.Y., Zheng, L., Qin, S.H., Xu, X.P., An, T.X., Xu, Y., Wu, Y.S., Hu, X.M., Ping, B.H., et al. (2017). Comparison of isolation methods of exosomes and exosomal RNA from cell culture medium and serum. *Int. J. Mol. Med.* *40*, 834–844.

Tauro, B.J., Greening, D.W., Mathias, R.A., Mathivanan, S., Ji, H., and Simpson, R.J. (2013). Two Distinct Populations of Exosomes Are Released from LIM1863 Colon Carcinoma Cell-derived Organoids. *Mol. Cell. Proteomics* *12*, 587–598.

Thakur, B.K., Zhang, H., Becker, A., Matei, I., Huang, Y., Costa-Silva, B., Zheng, Y., Hoshino, A., Brazier, H., Xiang, J., et al. (2014). Double-stranded DNA in exosomes: A novel biomarker in cancer detection. *Cell Res.* *24*, 766–769.

Théry, C. (2011). Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. *F1000 Biol. Rep.* *3*, 15.

Théry, C., Witwer, K.W., Aikawa, E., Alcaraz, M.J., Anderson, J.D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G.K., et al. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J. Extracell. Vesicles* *7*, 1535750.

Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y.J., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell* *139*, 871–890.

Thomson, N.C., Chaudhuri, R., and Livingston, E. (2004). Asthma and cigarette smoking. *Eur. Respir. J.* *24*, 822–833.

Tindemans, I., Serafini, N., DiSanto, J.P., and Hendriks, R.W. (2014). GATA-3 function in innate and adaptive immunity. *Immunity* *41*, 191–206.

Tkach, M., and Théry, C. (2016). Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell* *164*, 1226–1232.

Literaturverzeichnis

- Torregrosa Paredes, P., Esser, J., Admyre, C., Nord, M., Rahman, Q.K., Lukic, A., Rådmark, O., Grönneberg, R., Grunewald, J., Eklund, A., et al. (2012). Bronchoalveolar lavage fluid exosomes contribute to cytokine and leukotriene production in allergic asthma. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 67, 911–919.
- Trino, S., Lamorte, D., Caivano, A., De Luca, L., Sgambato, A., and Laurenzana, I. (2021). Clinical relevance of extracellular vesicles in hematological neoplasms: from liquid biopsy to cell biopsy. *Leukemia* 35, 661–678.
- Tsui, N.B., Ng, E.K., and Lo, Y.M.D. (2002). Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clin. Chem.* 48, 1647–1653.
- Tully, J.E., Hoffman, S.M., Lahue, K.G., Nolin, J.D., Anathy, V., Lundblad, L.K.A., Daphtary, N., Aliyeva, M., Black, K.E., Dixon, A.E., et al. (2013). Epithelial NF- κ B Orchestrates House Dust Mite-Induced Airway Inflammation, Hyperresponsiveness, and Fibrotic Remodeling. *J. Immunol.* 191, 5811–5821.
- Turner, J., Roger, J., Fitau, J., Combe, D., Giddings, J., Van Heeke, G., and Jones, C.E. (2011). Goblet cells are derived from a FOXP1-expressing progenitor in a human airway epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 44, 276–284.
- Tyner, J.W., Kim, E.Y., Ide, K., Pelletier, M.R., Roswit, W.T., Morton, J.D., Battaile, J.T., Patel, A.C., Patterson, G.A., Castro, M., et al. (2006). Blocking airway mucous cell metaplasia by inhibiting EGFR antiapoptosis and IL-13 transdifferentiation signals. *J. Clin. Invest.* 116, 309–321.
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., and Lötvall, J.O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 654–659.
- Vieira Braga, F.A., Kar, G., Berg, M., Carpaij, O.A., Polanski, K., Simon, L.M., Brouwer, S., Gomes, T., Hesse, L., Jiang, J., et al. (2019). A cellular census of human lungs identifies novel cell states in health and in asthma. *Nat. Med.* 25, 1153–1163.
- Virchow, J.C., Backer, V., Kuna, P., Prieto, L., Nolte, H., Villesen, H.H., Ljørring, C., Riis, B., and De Blay, F. (2016). Efficacy of a house dust mite sublingual allergen immunotherapy tablet in adults with allergic asthma: A randomized clinical trial. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* 315, 1715–1725.
- Vos, T., Allen, C., Arora, M., Barber, R.M., Brown, A., Carter, A., Casey, D.C., Charlson, F.J., Chen, A.Z., Coggeshall, M., et al. (2016). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* 388, 1545–1602.

Literaturverzeichnis

- Wagner, J., Riwanto, M., Besler, C., Knau, A., Fichtlscherer, S., Röxe, T., Zeiher, A.M., Landmesser, U., and Dimmeler, S. (2013). Characterization of levels and cellular transfer of circulating lipoprotein-bound microRNAs. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 1392–1400.
- Wang, H., Naghavi, M., Allen, C., Barber, R.M., Carter, A., Casey, D.C., Charlson, F.J., Chen, A.Z., Coates, M.M., Coggeshall, M., et al. (2016). Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* 388, 1459–1544.
- Wang, L., McParland, B.E., and Paré, P.D. (2015). The Functional Consequences of Structural Changes in the Airways. *Chest* 123, 356S–362S.
- Wang, Y.L., Bai, C., Li, K., Adler, K.B., and Wang, X. (2008). Role of airway epithelial cells in development of asthma and allergic rhinitis. *Respir. Med.* 102, 949–955.
- Wang, Z.N., Su, R.N., Yang, B.Y., Yang, K.X., Yang, L.F., Yan, Y., and Chen, Z.G. (2020). Potential Role of Cellular Senescence in Asthma. *Front. Cell Dev. Biol.* 8, 59.
- Warth, S.C., Hoefig, K.P., Hiekel, A., Schallenberg, S., Jovanovic, K., Klein, L., Kretschmer, K., Ansel, K.M., and Heissmeyer, V. (2015). Induced miR-99a expression represses Mtor cooperatively with miR-150 to promote regulatory T-cell differentiation. *EMBO J.* 34, 1195–1213.
- Watanabe, K., Suzukawa, M., Arakawa, S., Kobayashi, K., Igarashi, S., Tashimo, H., Nagai, H., Tohma, S., Nagase, T., and Ohta, K. (2019). Leptin enhances cytokine/chemokine production by normal lung fibroblasts by binding to leptin receptor. *Allergol. Int.* 68, S3–S8.
- Wenzel, S.E., Schwartz, L.B., Langmack, E.L., Halliday, J.L., Trudeau, J.B., Gibbs, R.L., and Chu, H.W. (1999). Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160, 1001–1008.
- Willekens, F.L.A., Werre, J.M., Kruijt, J.K., Roerdinkholder-Stoelwinder, B., Groenen-Döpp, Y.A.M., Van Den Bos, A.G., Bosman, G.J.C.G.M., and Van Berkel, T.J.C. (2005). Liver Kupffer cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors. *Blood* 105, 2141–2145.
- Willms, E., Cabañas, C., Mäger, I., and Wood, M.J.A. (2018). Extracellular Vesicle Heterogeneity: Subpopulations, Isolation Techniques, and Diverse Functions in Cancer Progression. *Front. Immunol.* 9, 738.
- Wilson, R.H., Whitehead, G.S., Nakano, H., Free, M.E., Kolls, J.K., and Cook, D.N. (2009). Allergic sensitization through the airway primes Th17-dependent neutrophilia and airway

Literaturverzeichnis

hyperresponsiveness. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 180, 720–730.

Winnica, D., Corey, C., Mullett, S., Reynolds, M., Hill, G., Wendell, S., Que, L., Holguin, F., and Shiva, S. (2019). Bioenergetic Differences in the Airway Epithelium of Lean Versus Obese Asthmatics Are Driven by Nitric Oxide and Reflected in Circulating Platelets. *Antioxidants Redox Signal.* 31, 673–686.

Wnuk, D., Paw, M., Ryczek, K., Bochenek, G., Sładek, K., Madeja, Z., and Michalik, M. (2020). Enhanced asthma-related fibroblast to myofibroblast transition is the result of profibrotic TGF- β /Smad2/3 pathway intensification and antifibrotic TGF- β /Smad1/5/(8)9 pathway impairment. *Sci. Rep.* 10, 16492.

Wolf, P. (1967). The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br. J. Haematol.* 13, 269–288.

Woodruff, P.G., Modrek, B., Choy, D.F., Jia, G., Abbas, A.R., Ellwanger, A., Arron, J.R., Koth, L.L., and Fahy, J. V (2009). T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 180, 388–395.

Wright, T.K., Gibson, P.G., Simpson, J.L., McDonald, V.M., Wood, L.G., and Baines, K.J. (2016). Neutrophil extracellular traps are associated with inflammation in chronic airway disease. *Respirology* 21, 467–475.

Yáñez-Mó, M., Siljander, P.R.-M., Andreu, Z., Zavec, A.B., Borràs, F.E., Buzas, E.I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., et al. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J. Extracell. Vesicles* 4, 1–60.

Yang, Y., Yuan, L., Yang, M., Du, X., Qin, L., Wang, L., Zhou, K., Wu, M., He, R., Feng, J., et al. (2021). Aberrant Methylation of Aging-Related Genes in Asthma. *Front. Mol. Biosci.* 8, 439.

Yu, S., Zhang, R., Liu, G., Yan, Z., Hu, H., Yu, S., and Zhang, J. (2011). Microarray analysis of differentially expressed microRNAs in allergic rhinitis. *Am. J. Rhinol. Allergy* 25, e242-6.

Yu, Y., Wang, L., and Gu, G. (2018). The correlation between Runx3 and bronchial asthma. *Clin. Chim. Acta* 487, 75–79.

Zhang, X., Chen, Q., Song, H., Jiang, W., Xie, S., Huang, J., and Kang, G. (2020). MicroRNA-375 prevents TGF- β -dependent transdifferentiation of lung fibroblasts via the MAP2K6/P38 pathway. *Mol. Med. Rep.* 22, 1803–1810.

Zhou, B., Xu, K., Zheng, X., Chen, T., Wang, J., Song, Y., Shao, Y., and Zheng, S. (2020). Application of exosomes as liquid biopsy in clinical diagnosis. *Signal Transduct. Target. Ther.* 5, 144.

Literaturverzeichnis

Zhu, Y., Zhang, S., Li, Z., Wang, H., Li, Z., Hu, Y., Chen, H., Zhang, X., Cui, L., Zhang, J., et al. (2019). miR-125b-5p and miR-99a-5p downregulate human $\gamma\delta$ T-cell activation and cytotoxicity. *Cell. Mol. Immunol.* *16*, 112–125.

Ziegler, S.F., and Artis, D. (2010). Sensing the outside world: TSLP regulates barrier immunity. *Nat. Immunol.* *11*, 289–293.

7 Anhang

7.1 Verzeichnis der Veröffentlichungen

Zeitschriftenpublikationen:

1. Daniel P. Potaczek, Sarah Miethe, **Viktoria E.M. Schindler**, Fahd Alhamdan, Holger Garn. Role of airway epithelial cells in the development of different asthma phenotypes. *Cell Signal* 2020, 69:109523.

doi: 10.1016/j.cellsig.2019.109523.

2. **Viktoria E.M. Schindler**, Fahd Alhamdan, Christian Preußner, Lukas Hintz, Bilal Alashkar Alhamwe, Andrea Nist, Thorsten Stiewe, Elke Pogge von Strandmann, Daniel P. Potaczek, Clemens Thölken, Holger Garn. Side-directed release of differential extracellular vesicles-associated microRNA profiles from bronchial epithelial cells of healthy and asthmatic subjects. *Biomedicines* 2022, 10:622.

doi: 10.3390/biomedicines10030622.

Poster:

Schindler V, Alhamdan F, Thölken C, Hintz L, Nist A, Chung HR, Garn H. Directed release of differential exosomal small non-coding RNA profiles by bronchial epithelial cells from healthy and asthmatic subjects. Scientific Poster, DZL Annual Meeting, 2020

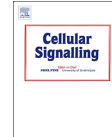
7.2 Veröffentlichung 1

Cellular Signalling 69 (2020) 109523



Contents lists available at ScienceDirect

Cellular Signalling

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cellsig

Role of airway epithelial cells in the development of different asthma phenotypes

Daniel P. Potaczek^{a,b}, Sarah Miethe^a, Viktoria Schindler^a, Fahd Alhamdan^a, Holger Garn^{a,*}^a Institute of Laboratory Medicine and Pathobiochemistry – Molecular Diagnostics, Philipps University of Marburg – Medical Faculty, Universities of Giessen and Marburg Lung Center (UGMLC), German Center for Lung Research (DZL), Marburg, Germany^b John Paul II Hospital, Krakow, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Asthma phenotypes
Bronchial epithelium
Epithelial diversity and plasticity
Barrier function
Immune regulation
Epigenetics

ABSTRACT

The term (bronchial) asthma describes a disorder syndrome that comprises several disease phenotypes, all characterized by chronic inflammation in the bronchial epithelium, with a variety of subsequent functional consequences. Thus, the epithelium in the conducting airways is the main localization of the complex pathological changes in the disease. In this regard, bronchial epithelial cells are not passively affected by inflammatory mechanisms induced by immunological processes but rather actively involved in all steps of disease development from initiation and perpetuation to chronification. In recent years it turned out that bronchial epithelial cells show a high level of structural and functional diversity and plasticity with epigenetic mechanisms playing a crucial role in the regulation of these processes. Thus, it is quite reasonable that differential functional activities of the bronchial epithelium are involved in the development of different asthma phenotypes and/or stages of disease. The current knowledge on this topic will be discussed in this review article.

1. The airway epithelium – more than just a physical barrier

Originally the airway epithelium was considered to represent a rather rigid mechanical barrier structure that conducts air transport between the upper airways and thus the environmental air and the gas exchange area in the lung, namely the alveoli within the lung parenchyma. This function requires a highly impermeable barrier especially at the apical side of the columnar cells of the epithelial layer which is – besides other adhesion mechanisms (e.g. extracellular matrix interactions, desmosomes, cell adhesion molecules) – mainly realized by tight junctions. These structures are composed of a variety of interacting proteins such as Claudins, Occludin, ZO 1–3, β -Catenin and E-Cadherin [1]. The expression of most of these proteins is differentially and tightly regulated in response to external (environmental influences) and internal (e.g. inflammatory mechanisms) signals. This indicates that even the mechanical barrier function is a tightly regulated feature of the bronchial epithelium which allows plastic adaptation of physical barrier features to specific internal requirements and/or environmental changes. In addition, ciliated cells facilitate the retrograde transport of inhaled particles to avoid their accumulation in deeper areas of the lung. Specialized airway epithelial cells such as Goblet cells support this (cleaning) function by production of mucus as part of the biochemical

barrier system. Mucus consists of several large (> 1000 kDa) and highly glycosylated proteins called mucins. These proteins possess a high water adsorption capability and thus develop a gel-like structure. Inhaled particulate matter associates with mucus which together become proximally transported by coordinated cilia beating, a process called mucociliary clearance [2]. Most mucin genes are constitutively expressed at low levels, however, under diverse pathological conditions their expression is rapidly and dramatically increased leading to significant hypersecretion of mucus and/or compositional changes and thus alterations in its physical properties [3,4]. Further components of the biochemical barrier system are antimicrobial peptides, namely defensins and cathelicidins. A variety of such molecules are produced and apically secreted directly by epithelial cells. Their main function is to exert antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria, fungi and certain viruses. In addition, several antimicrobial peptides exert enzymatic activity, may neutralize bacterial toxins such as LPS or promote aggregation of invading pathogens supporting their faster elimination. Moreover, many of such peptides exert chemotactic activities for innate and/or adaptive immune cells [5]. Epithelial-derived cytokines and chemokines further facilitate interactions between epithelial cells and components of the professional immune system. The latter, e.g. CXCL8/interleukin (IL)-8, CCL2/MCP-1 or CCL3/MIP-1 α ,

* Corresponding author at: Institute of Laboratory Medicine and Pathobiochemistry, Medical Faculty - Philipps University of Marburg, Center for Tumor- and Immunobiology (ZTI), Hans-Meerwein-Strasse 3, D - 35043 Marburg, Germany.

E-mail address: garn@staff.uni-marburg.de (H. Garn).

<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.109523>

Received 10 October 2019; Received in revised form 30 December 2019; Accepted 31 December 2019

Available online 02 January 2020

0898-6568/ © 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

2.1. Type 2-driven asthma

Atopic sensitization, hypersensitivity, and eosinophilic inflammation characterize asthma driven by type 2 mechanisms. Type 2 cytokines IL-4 and IL-13 stimulate B cells to produce immunoglobulin E (IgE). Eosinophils are in turn activated and attracted by IL-5, another type 2 cytokine, while IL-13 induces airway hyperresponsiveness (AHR) and increased mucus production [17,18]. IL-9, which has been recently shown to be synthesized mostly by a distinct T cell subpopulation, namely Th9 cells, stimulates survival and proliferation of mast cells and innate lymphocytes type 2 (ILC2) as well as mucus production [24–26]. Although the clinical manifestation of type 2-driven asthma can range from mild to severe, it is generally characterized by a robust response to inhaled corticosteroids (ICS) [18,20].

Despite of a clear correlation between allergen exposure and the development of asthmatic symptoms described in early-onset allergic asthma, it remains quite difficult to unambiguously define this phenotype due to the lack of a defined age of initial manifestation and missing effective diagnostic tools for identifying atopic asthma in young children. Nevertheless, some of its characteristics have been rather precisely delineated, such as a simultaneous occurrence of other atopic diseases typical for childhood, mainly allergic rhinitis or atopic dermatitis [18,20,23]. Adult (late)-onset eosinophilic asthma first appears in adulthood and is frequently associated with severe disease manifestation. It can be characterized by increased eosinophil counts in airways and blood. Besides, it is often preceded or accompanied by chronic sinusitis with nasal polyps [17,20,23]. The symptoms of exercise-induced asthma are in turn mild and occur solely after physical exercise, resulting from reactive bronchoconstriction [18,20,21].

2.2. Non-type 2-driven asthma

It seems highly unlikely that non-type 2-driven asthma represents a single mechanistic entity but rather is comprised of several specific endotypes. These disease subtypes are closely associated with defined causal factors and clinical characteristics, such as neutrophilic inflammation resulting from smoking or AHR following viral infection (–s) [19,21]. Neutrophilic inflammation is driven by type 1 and Th17 cytokines, such as interferon γ (IFN γ), tumor necrosis factor α (TNF α), and IL-17 [17,18].

Smoking-associated neutrophilic asthma, which develops in association with chronic use of steroids or habitual smoking, is characterized by local and peripheral neutrophilia. Further characteristics of this phenotype are reduced lung function, increased air trapping, and airway thickening in absence of AHR [18,23]. The classical obesity-associated asthma phenotype is associated with a late-onset, mostly affects women, and is not accompanied by atopy [17,20].

2.3. Chronification, airway remodeling, and epithelial-mesenchymal transition (EMT)

Independently of its phenotype, asthma starts with repeated injuries to the airway mucosal epithelium resulting in acute local inflammation. In predisposed mice, repeated acute mucosal insults are accompanied by initially temporally limited immune responses, which can later develop into chronic inflammation clinically corresponding to persistent, chronic disease [27]. Similar mechanisms are also expected to work in humans where those mucosal injuries are evoked by different etiological asthma triggers, comprising various types of external factors such as allergens, viruses, smoking, pollution, and others, alone or in combination [28,29]. One of the classical examples of this “chronification” is the development of the allergic asthma phenotype in very young children with atopic susceptibility, experiencing repeated wheezing episodes due to viral infections. Once established, such atopic asthma can persist through childhood and even into adulthood [29–31].

On the histocytological level, the progression to chronic asthmatic

disease is characterized by airway remodeling with accumulation of smooth muscle cells, thickening of basal lamina, submucosal fibrosis, angiogenesis, loss of epithelial cell polarity and barrier integrity, and mucus cell expansion [32–34]. These changes are in huge part underlain by dysregulated EMT, a process normally involved in mucosal wound healing with the formation of a temporary protective barrier [34–36]. During the process of EMT, epithelial cells exhibit enhanced motility and invasive capacity via the decreased expression of epithelial markers, including E-Cadherin, and the upregulation of mesenchymal proteins. This way epithelial cells become a source of migrating myofibroblasts and fibroblasts and thus making EMT a promoter of extracellular matrix deposition and subepithelial fibrosis [36,37]. EMT occurs through molecular reprogramming of epithelial cells with epigenetic mechanisms being involved (see below). Transforming growth factor (TGF) β 1, which is the most potent inducer of abnormal EMT in asthma, can be secreted not only by eosinophils but also several other cell types [32,37,38]. In neutrophilic asthma for example, airway remodeling may be a result of TGF β 1-induced EMT with TGF β 1 being secreted by neutrophil-derived elastase-stimulated dendritic cells and/or airway smooth muscle cell [32].

3. Plasticity of lung epithelial cells under the adverse influence of type 1 and type 2 inflammation

Specific types of lung injury and their consecutive immunological responses result in an altered cellular landscape and different molecular phenotypes of single cells in healthy and asthmatic lung epithelium [39]. Significant mucus overproduction and Goblet cell metaplasia in epithelial cells of asthmatic patients is induced by inflammatory cytokines and observed as upregulation of characteristic mucus genes expression, such as *MUC5AC* or *MUC5B*, in epithelial cells.

Two types of cell lineages originating from epithelial basal cells are relevant for mucus production: the ciliated cell lineage with ciliated cells and the secretory lineage consisting mainly of Goblet cells and Club cells [40]. Single-cell analysis of structural and inflammatory cells from asthmatic and healthy individuals revealed alterations in cell-specific disease-associated proinflammatory genes in epithelial cells resulting in the description of novel epithelial cell states. Mucous cell hyperplasia in asthmatic individuals seems to arise out of Goblet cell hyperplasia as well as out of a novel mucous-producing state of ciliated cells. Mucous ciliated cells detected in asthma are characterized by simultaneous co-expression of ciliary genes with mucous genes and other key asthmatic genes forming a transitional ciliary cell state with mucous metaplasia in the ciliated cell lineage. Development of mucous ciliated cells is suspected to be dependent on IL-4/IL-13-signaling and thus to contribute to increased mucus production and type 2 inflammation in asthma (Fig. 2) [41]. Along mucus production by the ciliated cell lineage, ovalbumin exposure in mice can simultaneously induce a metaplastic transformation of club cells to mucus-producing cells [42]. Oppositely, others solely have seen mucus production in the secretory cell lineage, however without confirmation in human patients so far [43,44].

Signaling by type 2 cytokines IL-4 and IL-13 is reported to be essential for mucous metaplasia and *MUC5AC*-overexpression in ciliated cells [41,45,46]. Cultured basal cells of the ethmoid sinus epithelium in patients with chronic rhinosinusitis with polyposis not only show acute effects of IL-4/IL-13 stimulation in form of Wnt pathway activation but also baseline Wnt induction in the absence of inflammatory cytokines compared to patients without polyposis. This suggests a mechanism of inflammatory memory after chronic type 2 cytokine exposure and hence might lead the epithelial differentiation toward enhanced disease [47]. A proinflammatory cytological imprinting of epithelial cells after cytokine exposure has not been described for asthma so far and remains subject to further investigation.

Type 2 cytokine IL-4 and type 1 cytokine IFN γ prompt antagonistic genetic regulation patterns in cultured human bronchial epithelial cells

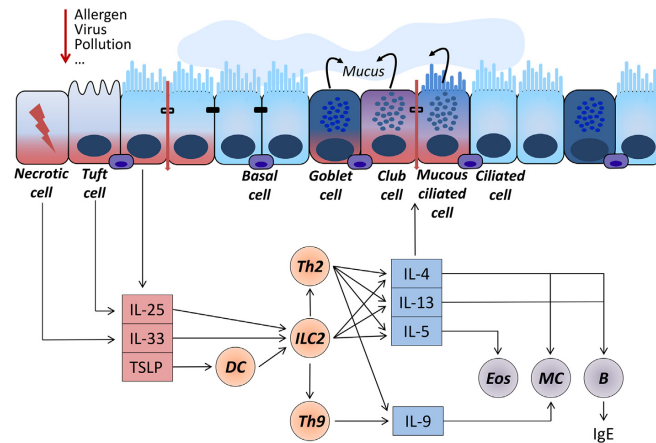


Fig. 2. Involvement of epithelial cells in pathomechanisms leading to type 2-driven asthma phenotypes. Abbreviations: IL, interleukin; TSLP, thymic stromal lymphopietin; IgE, immunoglobulin E; DC, dendritic cells; Th, T helper cells; ILC, innate lymphoid cell; Eos, eosinophils; MC mast cells.

(HBECs) representing a type 1/type 2-driven antagonism of epithelial gene regulation [48]. The mechanism of epithelial transcriptional antagonism is suggested to be similar to the direct mutual inhibition described for GATA3/TBX21 or GATA3/FOXP3 in Th1/Th2/Treg cells but is so far lacking evidence [49,50].

The effect of type 1 cytokines shows contradictory effects compared to the upregulation of mucous genes by type 2 cytokines. Neutrophilic inflammation in asthma has been linked to inflammasome activation and IL-1 β /IL-17-induced neutrophil recruitment [51–53]. A comparison between mouse models with neutrophilic and eosinophilic asthmatic lung inflammation revealed differential expression of tight-junction molecules and a general upregulation of mucin genes *Muc5ac* and *Muc5b*, strongest observed in neutrophilic inflammation. *Cla5* (*Gob5*), a highly induced gene associated with mucus overproduction in asthma [54,55], in the bronchial epithelium was significantly upregulated especially in neutrophilic inflammation [56]. Direct stimulation of HBECs with inflammasome-associated IL-1 β and the Th17-cytokine IL-17 leads to increased mucus production and slight impairment of epithelial barrier function linking the axis of inflammasome and Th17 activation in neutrophilic inflammation to mucus hypersecretion and epithelial barrier dysfunction (Fig. 3) [56]. Pezzulo et al. have recently identified the activation of heat shock protein 90 (HSP90) as an inevitable condition for IL-13 and IL-17-induced airway Goblet cell hyperplasia [57]. While IL-17 and IL-1 β stimulate *Muc5ac* and *Muc5b* by JAK2-dependent autocrine/paracrine loop and NF κ B-based mechanisms [58–60], the type 1 cytokine IFN γ is known to inhibit *Muc5AC* transcription by reduction of *Muc5AC*-mRNA expression via the JAK/STAT-pathway in NHBES [61]. In the presence of functional Th1 and Th2 cells ovalbumin stimulation in mice leads to inhibition of Th2 function by IFN γ , observed among others by *Muc5AC* expression. IFN γ might, therefore, exert regulatory effects on asthma phenotype development [62]. Subsequent investigation on the influence of type 1 cytokines is needed as adverse effects of IFN γ are described.

4. Role of epithelial cells in type 2-driven allergic asthma

Type 2-driven allergic asthma is the most abundant and by far best-investigated asthma endotype with regard to underlying pathomechanistic dysregulations. Thus, most of the currently available knowledge on the contribution of epithelial cells to asthma development and

perpetuation is derived from investigations within this endotype. Originally, it was proposed that allergic asthma is initially caused by inappropriate activation of type 2 immune mechanisms by allergen exposure. This subsequently results in local changes in the airways including alterations in the airway epithelium like Goblet cell hyperplasia, altered barrier integrity and remodeling processes such as EMT.

This concept was challenged by a new hypothesis in the early 2000s stating asthma as being primarily an epithelial disorder with altered functional barrier properties causing subsequent immune activation processes, e.g. by viral infections, permeation of pollutants and/or allergens [63]. Meanwhile it is widely accepted that in type 2-driven asthma both mechanisms, i.e. epithelial changes and induction of type 2 inflammatory processes, develop in parallel and interdependently (Fig. 2) [64]. Besides changes in epithelial barrier properties, diverse airway epithelial cell types are an integrative part of early innate immune activation mechanisms initiating exaggerated type 2 adaptive immune responses. This function is mainly executed by the release of a variety of epithelial-derived cytokines produced in response to diverse environmental insults. In addition to chemokines and proinflammatory cytokines, this includes so-called alarmins such as IL-25, TSLP, and IL-33 [65].

Airway epithelial cells constitutively express IL-25, however, its expression is significantly increased in response to allergens with protease activity such as house dust mite. It has been demonstrated that apically expressed protease-activated receptor 2 (PAR2) is involved in the signaling mechanisms leading to epithelial IL-25 expression [66]. Tuft cells have recently been shown to represent the main producers of IL-25 in the airways (in parallel to eicosanoids associated with type 2 inflammation) suggesting a specific role of this cell type in the control of type 2 immune mechanisms [67]. Interestingly, a subgroup of asthma patients with strong AHR, high local and systemic levels of eosinophils and serum IgE may be identifiable by high epithelial IL-25 expression [68].

Bronchial epithelial cells also represent a major source of TSLP which is increasingly produced following exposure to allergens with protease activity or viral infections [69]. Accordingly, significantly increased TSLP levels have been demonstrated in asthmatics [70]. Comparably to IL-25, TSLP is stored in the cytoplasm of epithelial cells suggesting the capability of an immediate release following respective stimulation. Most recently, therapeutic inhibition of TSLP by a

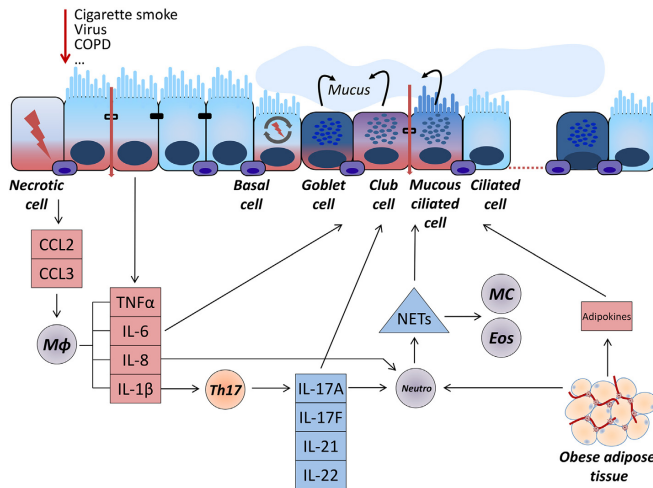


Fig. 3. Involvement of epithelial cells in pathomechanisms leading to non-type 2-driven asthma phenotypes. Abbreviations: COPD, Chronic obstructive pulmonary disease; CCL, C-C type chemokine ligand; TNF, tumor necrosis factor; IL, interleukin; Mφ, macrophages; DC, dendritic cells, Th, T helper cells; Neuro, neutrophils; Eos, eosinophils; MC mast cells; NETs, neutrophil extracellular traps.

monoclonal antibody resulted in significant improvement of clinical parameters in asthma patients suffering from type-2 driven allergic asthma [71].

The genes for IL-33 (an IL-1 family member) and its receptor have been identified as asthma susceptibility loci and animal studies suggest a role for IL-33 especially in the initiation of allergic airway inflammation [72]. However, its role in human asthma is still not fully elucidated. Increased levels in BAL or sputum have been demonstrated following acute stimulation (but almost not in steady state conditions) indicating an immediate and short-term local action of this cytokine. In addition to active secretion, IL-33 seems also to be released by necrotic epithelial cells [73].

Altogether, IL-25, IL-33, and TSLP (the latter by specific priming of dendritic cells) play an important role in the activation of ILC2 which are considered to be main source of initial type 2 cytokines such as IL-5 and IL-13 which then further prime additional type 2 mechanisms including accumulation and stimulation of eosinophils, mast cell activation, and the involvement of Th2 and Th9 cells [74]. Type 2 cytokines also feedback to the epithelium with induction of reprogramming toward a hypersecretory phenotype (IL-13 and IL-9; see above), inhibition of ciliated cell differentiation (IL-13), and disruptive effects on barrier integrity (IL-4 and IL-13) [1]. For example, IL-13 has been reported to downregulate Claudin-18 expression associated with higher epithelial permeability, higher IgE levels and increased AHR [75].

5. Role of epithelial cell in non-type 2 asthma phenotypes including obesity-associated asthma

The underlying mechanisms of non-type 2-driven asthma phenotypes and endotypes are not as fully elucidated as the contribution of allergic type 2 immune responses to the development and clinical manifestation of type 2-driven asthmatic disease. Non-type 2 asthma patients generally suffer from a rather severe outcome and do not respond well to treatments with corticosteroids [20]. Causes of neutrophilic airway inflammation range from smoking, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), preceding virus infection to systemic obesity-associated inflammation. Continuous production of inflammatory mediators like TNFα, IL-6, IFNγ and IL-17 by obese adipose tissue leads to a chronic low-grade systemic inflammation. This promotes the

development and clinical course of a non-type 2-driven asthma phenotype in obese patients. Since type 2-driven immune mechanisms are also known to be involved in a subpopulation of obese patients a single distinct obesity-associated phenotype cannot be described [17]. Age of disease onset seems to play a decisive role as obese patients with an early asthma development have a rather atopic outcome and markedly higher bronchial hyperresponsiveness, whereby they tend to have an allergic type 2-associated phenotype accompanied by obesity [76].

In most cases, the asthmatic phenotype with a neutrophilic inflammation is associated with Th17 pathways, increased IL-8 production and stronger activation of innate immune mechanisms [20]. Morphology of lung cells in non-allergic asthma patients differs from that in healthy subjects and show a rather flattened than columnar structure [77]. In obese asthmatics, epithelial cells additionally show increased glycolysis and reduced production of nitric oxide compared to non-obese asthmatics, indicating bioenergetic differences between lean and obese patients [78,79]. Adipokines often play an important role in diseases correlated to obesity with several known impacts of adipokines on the lung. Leptin, for example, a hormone regulating the energy balance and appetite, activates airway epithelial cells and upregulates cytokine production of normal lung fibroblasts (NHLFs) [80]. Not only several cytokines but also chemokines like CCL11/Eotaxin, CCL2/MCP-1, CXCL8/IL-8, and CXCL10/IP-10 are upregulated by leptin in the lung [80]. In contrast to leptin and resistin, the anti-inflammatory adipokine adiponectin promotes proliferation and wound repair in human bronchiolar epithelial cells [81].

The chemoattractant IL-8 produced by the airway epithelium is an important cytokine contributing to neutrophil recruitment in the lung [82]. Cigarette smoke, for example, induces production of IL-6 and IL-8 via p38 and NF-κB pathways in epithelial cells and thereby contributes to inflammatory processes in the lung [83]. Autophagy of recruited neutrophils can further trigger inflammatory mechanisms via the release of neutrophil extracellular traps (NETs). NETs are capable of activating mast cells and eosinophils [84,85]. These activated eosinophils release granules containing toxic proteins, such as major basic protein, eosinophil peroxidase or eosinophil cationic protein, contributing to tissue damage and promoting inflammation [22]. NETs can further damage the airway integrity of human airway epithelial cells (SAECs) by degradation of tight junction proteins, e.g. Occludin and Claudin 1

[84]. Claudin 4, functioning as a barrier molecule and usually upregulated in early stages of acute lung injury, is also upregulated in experimental neutrophilic airway inflammation in mice, thereby adjusting damaged tight junctions. This possibly reflects the more severe clinical appearance of neutrophilic inflammation [56]. Isolated epithelial cells from COPD patients also show a reduced capacity for epithelial junction formation. The loss of epithelial integrity increases the transepithelial permeation of toxic compounds and pathogens, e.g. cigarette smoke [86]. As consequence of loosened tight junctions between epithelial cells, the wounded regions undergo EMT [87]. This de-differentiation of the epithelium appears in COPD leading to peribronchial fibrosis and airflow limitations. It is quite conceivable that similar mechanisms also contribute to the complex pathological situation observed in more severe chronic forms of neutrophilic asthma which show a variety of similarities to COPD.

Mucus hypersecretion not only occurs in type 2- but also in Th17-associated asthma since induction of a neutrophilic inflammatory phenotype in mice was shown to be associated with higher expression of *Clca1*, *Muc5ac*, *Muc4* and *Muc5b* [56]. In obesity-associated asthma, leptin regulates mucus production via the IL-13-induced MUC5AC pathway [88]. Additionally, resistin contributes to mucus production via different pathways, such as phosphorylation of ERK1/2, p38, and NF- κ B [89]. In mice fed with a high-fat diet, even in the absence of concomitant allergen exposure, several changes in the bronchial mucosa were seen, such as increased numbers of mitochondria in airway smooth muscle cells. Due to a loss of cristae and mitochondrial swelling, these mitochondria seemed to be stressed [42]. This mitochondrial dysfunction arises because of increased levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA), an inhibitor of the endogenous nitric oxide synthase. Airway epithelial cells treated with IL-4 showed an intracellular accumulation of ADMA, leading to airway epithelial injury and remodeling. The increased level of IL-4 and ADMA therefore might contribute to disease development of asthma in obese patients [90]. Increased numbers of AT2 cells and induced proliferation of lung parenchymal epithelial stem cells are further observed in mouse models as an effect of high fat diet [91].

Taken together, there is a broad range of mechanisms within the non-type 2 asthmatic phenotype differentially affecting lung mucosa, especially epithelial cells (Fig. 3). This includes higher mucus production, degradation of tight junctions and thus increased barrier permeability, morphological changes as well as changes in the number of stem cells and increased cytokine synthesis. However, further research is needed to deeply evaluate the differences between the overlapping effects of different non-type 2 asthmatic phenotypes on the lung epithelium.

6. Epigenetic regulation of epithelial cell functions in asthma

The airway epithelium exhibits a unique interface between the surrounding environment and the mucosal layer, which makes it prone to diverse types of environmental triggers. The interaction between those triggers and susceptible genetic factors can adjust the epigenetic status of the airway epithelial cells. This may lead to a functional and morphological remodeling of the airway epithelium causing different diseases including asthma [92] and its individual phenotypes.

The main epigenetic mechanisms comprise DNA methylation, histone modifications, and non-coding RNAs such as microRNAs (miRNAs; Fig. 4). DNA methylation plays an essential role in gene repression. It can be described as an enzymatic addition of a methyl group to the fifth carbon of DNA cytosine rings (5mC) in CpG dinucleotide structures. This reaction can be reversed by detaching the methyl group eventually through *TET* (*ten-eleven-translocation*) enzymes [29,93]. A variety of asthma-associated genes were differentially methylated in nasal epithelial cells of atopic asthmatic children compared to healthy control subjects. Some of these affected genes are linked to immunity (*IFNGR2*, *HLKA-DPA1*, *LAG3*, *NFIL3*, *PRF1*, *TNFSF13*), epigenetic regulation

(*ATXN7L1*, *H1FO*, *HIST1H1D*, *METTL1*), airway obstruction (*GABRG3*), and obesity (*C1QTNF1*, *GPC4*) [94]. Recent studies have also investigated the role of the DNA methylation eraser *TET1* in the epithelium of asthmatics. In nasal airway epithelial cells of asthmatic children, de-methylation of a single CpG site in the *TET1* promoter region leads to an increase in global 5hmC (5-hydroxymethyl cytosine) levels, representing a genomic state where genes start to become demethylated. This indicates an activation of genes that might associate with asthma pathogenesis [95]. To gain a mechanistic view of how *TET1* contributes to epithelial changes in asthma, a study was performed using *Tet1* deficient mice that underwent allergic airway inflammation. The results demonstrate that the absence of *Tet1* increases the severity of allergic disease parameters including AHR and lung eosinophilia associated with elevated expression of *Muc5ac*, *IL13*, *IL33*, *IL17a*, *Egfr*, and *Tff2* in bronchial epithelial cells [96].

Compared to DNA methylation, histone modifications including histone methylation and acetylation are more complex and associate with either gene silencing or activation [97]. One genome-wide analysis study of asthmatic bronchial epithelial cells displayed that acetylation of the lysine in position 27 on histone 3 (H3K27ac; active promoter and enhancer mark) correlates strongly with genes that associate with type 2 high asthma, like *CLCA1*, *POSTN*, and *SERPINE2*. In addition, several transcription factors binding motifs (e.g. for FOXA3, SMAD3, BHLHE40, and RELA) were enriched at the H3K27ac enhancers. Those factors relate to several epithelial development processes including EMT [98]. Further, a global elevation in acetylation levels of lysine 18 on histone 3 (H3K18ac) and trimethylation of lysine 9 on histone 3 (H3K9me3) were observed in the airway epithelial cells of asthma patients compared to healthy subjects as further hints to elevated gene expression activities. Further investigations revealed an increased association of H3K18ac around the transcription start site of several asthma-associated genes like $\Delta Np63$, *EGFR*, and *STAT6* [99].

Non-coding RNAs (ncRNAs) are highly conserved small RNA transcripts and can be categorized into many RNA subclasses such as short RNAs like miRNAs (about 18 nt in length) or longer RNAs like long noncoding RNAs (lncRNAs, < 200 nt in length). ncRNAs regulate many events during cellular differentiation and activation in a variety of ways. miRNAs for example can degrade specific messenger RNAs (mRNAs) and stop the gene translation machinery, while some lncRNAs may act as sponges for miRNAs and reverse their biological effects [92]. miRNA-19a was found to be significantly up-regulated in bronchial epithelial cells (BECs) of severe asthma patients, while this was not the case in mild asthmatics. This finding can pose miRNA-19a as a potential biomarker for the differentiation between severe and mild asthma. On the other hand, hampering miRNA-19a expression leads to reduction in the BECs proliferation, which makes miRNA-19a a new promising therapeutic tool to reconstruct the airway epithelium in asthma [100]. In contrast, miRNA-744 was down-regulated in epithelial cells of severe asthmatics. Overexpression of miRNA-744 repressed proliferation of BECs by targeting *TGF β 1* mRNA expression which might provide a promising approach for therapeutic intervention with epithelial function in severe asthma [101]. As mentioned above, *TGF β 1* drives airway epithelial cells into the EMT state which is characterized by down-regulation of miRNA-448-5p and up-regulation of *Six1* gene expression. It has been shown that miR-448-5p is dramatically decreased in lung tissues of asthmatic mice and that its experimental overexpression is able to abrogate the EMT process by targeting the *Six1* mRNA transcript [102].

7. Concluding remarks

Altogether, the airway epithelium represents much more than a simple air-conducting structure. Instead, it is composed out of a variety of highly differentiated and functionally specialized cells which, however, still possess a high level of plasticity. Under healthy conditions, diverse epithelial cells in collaboration with mesenchymal cells as well

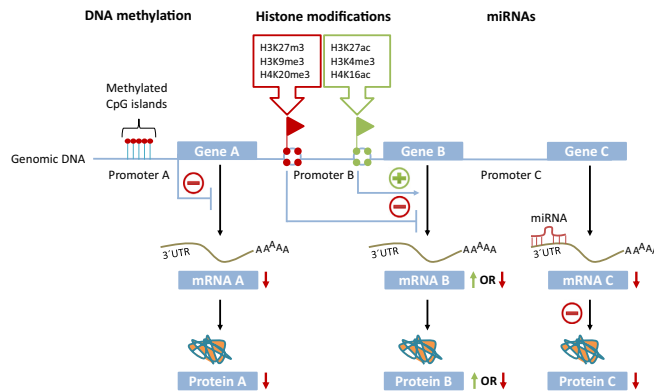


Fig. 4. Schematic illustration of major epigenetic mechanisms where i) a random gene (Gene A) is occupied by methylated CpG islands in its promoter vicinity causing gene repression; ii) the transcription of another random gene (Gene B) becomes either promoted or inhibited through different histone modifications associated with gene B's promoter while iii) the messenger RNA (mRNA) of a 3rd random gene (Gene C) is targeted by a microRNA (miRNA) within the 3' untranslated region (3'UTR) leading to reduced protein transcription.

as innate and adaptive immune cells maintain the organisms local integrity including specific requirements for a structure constituting a direct borderline to changing environmental conditions. This functionality is fulfilled by the concerted action of adaptive permeability, various regulatory mechanisms, such as directed release of a variety of cytokines, chemokines and other mediators, and apical cleaning mechanisms including mucus production and cilia-mediated retrograde transport. Pathological influences may disrupt this well-balanced system at different points leading to changes in several if not all of the above mentioned general processes. Therefore, it is not unexpected that different influences, seen e.g. in different asthmatic phenotypes, result in differential patterns of altered epithelial responses. Many of them are accompanied by epigenetic regulatory mechanisms whose influence on disease development we just begin to get an impression of. A better understanding of underlying cellular and molecular mechanisms of epithelial responses and their triggers provide a promising strategy for the development of stratified diagnostic and therapeutic tools specific for various asthma endotypes and their associated clinical phenotypes.

Financial support and sponsorship

This review was supported by the Institute of Laboratory Medicine and Pathobiochemistry a member of the German Center for Lung Research (DZL; 82DZL00502/A2), the German Academic Exchange Service (F.A., personal reference number: 91726294), and the HessenFonds, World University Service (WUS), the Hessen State Ministry for Higher Education, Science and the Arts (HMWK; F.A.).

Credit author statement

Daniel P. Potaczek: Conceptualization, Draft writing (e.g. Asthma phenotypes), Figure draft.

Sarah Mieth: Draft writing (e.g. Non-Type 2 asthma), Figure drafts, Final Figures.

Viktoria Schindler: Draft writing (e.g. Epithelial cell plasticity), Figure draft.

Fahd Alhamsan: Draft writing (e.g. Epigenetics), Figure draft.

Holger Garn: Conceptualization, Coordination, Writing, Reviewing, Editing.

Declaration of Competing Interest

There are no conflicts of interest.

Acknowledgements

None.

References

- [1] M. Loxham, D.E. Davies, Phenotypic and genetic aspects of epithelial barrier function in asthmatic patients, *J. Allergy Clin. Immunol.* 139 (6) (2017) 1736–1751, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.04.005>.
- [2] J. Ma, B.K. Rubin, J.A. Voynow, Mucins, mucus, and goblet cells, *Chest* 154 (1) (2018) 169–176, <https://doi.org/10.1016/j.chest.2017.11.008>.
- [3] L.R. Bonser, D.J. Erle, Airway mucus and asthma: the role of MUC5AC and MUC5B, *J. Clin. Med.* 6 (12) (2017), <https://doi.org/10.3390/jcm6120112>.
- [4] L.R. Bonser, L. Zlock, W. Finkbeiner, D.J. Erle, Epithelial tethering of MUC5AC-rich mucus impairs mucociliary transport in asthma, *J. Clin. Invest.* 126 (6) (2016) 2367–2371, <https://doi.org/10.1172/JCI84910>.
- [5] P.S. Hiemstra, G.D. Amatngalim, A.M. van der Does, C. Taube, Antimicrobial peptides and innate lung defenses: role in infectious and noninfectious lung diseases and therapeutic applications, *Chest* 149 (2) (2016) 545–551, <https://doi.org/10.1378/chest.15-1353>.
- [6] S.T. Holgate, G. Roberts, H.S. Arshad, P.H. Howarth, D.E. Davies, The role of the airway epithelium and its interaction with environmental factors in asthma pathogenesis, *Proc. Am. Thorac. Soc.* 6 (8) (2009) 655–659, <https://doi.org/10.1513/pats.200907-072DP>.
- [7] D.A. Patel, Y. You, G. Huang, D.E. Byers, H.J. Kim, E. Agapov, M.L. Moore, R.S. Peebles, M. Castro, K. Sumino, A. Shifren, S.L. Brody, M.J. Holtzman, Interferon response and respiratory virus control are preserved in bronchial epithelial cells in asthma, *J. Allergy Clin. Immunol.* 134 (6) (2014) 1402–1412.e7, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.07.013>.
- [8] P.A.B. Wark, S.L. Johnston, F. Bucchieri, R. Powell, S. Puddicombe, V. Laza-Stanca, S.T. Holgate, D.E. Davies, Asthmatic bronchial epithelial cells have a deficient innate immune response to infection with rhinovirus, *J. Exp. Med.* 201 (6) (2005) 937–947, <https://doi.org/10.1084/jem.20041901>.
- [9] C. Schneider, C.E. O'Leary, R.M. Locksley, Regulation of immune responses by tuft cells, *Nat. Rev. Immunol.* 19 (9) (2019) 584–593, <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0176-x>.
- [10] S. Kimura, M. Mutoh, M. Hisamoto, H. Saito, S. Takahashi, T. Asakura, M. Ishii, Y. Nakamura, J. Iida, K. Hase, T. Iwanaga, Airway M cells arise in the lower airway due to RANKL signaling and reside in the bronchiolar epithelium associated with iBALT in murine models of respiratory disease, *Front. Immunol.* 10 (2019) 1323, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01323>.
- [11] H. Song, E. Yao, C. Lin, R. Gacayan, M.-H. Chen, P.-T. Chuang, Functional characterization of pulmonary neuroendocrine cells in lung development, injury, and tumorigenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (43) (2012) 17531–17536, <https://doi.org/10.1073/pnas.1207238109>.
- [12] C. Wansleben, C.E. Barkauskas, J.R. Rock, B.L.M. Hogan, Stem cells of the adult lung: their development and role in homeostasis, regeneration, and disease, *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 2 (1) (2013) 131–148, <https://doi.org/10.1002/wdev.58>.
- [13] A. Pardo-Saganta, B.M. Law, P.R. Tata, J. Villoria, B. Saez, H. Mou, R. Zhao, J. Rajagopal, Injury induces direct lineage segregation of functionally distinct airway basal stem/progenitor cell subpopulations, *Cell Stem Cell* 16 (2) (2015) 184–197, <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.01.002>.
- [14] W.-L. Zuo, S.A. Shenoy, S. Li, S.L. O'Beirne, Y. Strulovici-Barel, P.L. Leopold, G. Wang, M.R. Staudt, M.S. Walters, C. Mason, R.J. Kaner, J.G. Mezey, R.G. Crystal, Ontogeny and biology of human small airway epithelial club cells,

Anhang

- Am. J. Respir. Crit. Care Med. 198 (11) (2018) 1375–1388, <https://doi.org/10.1164/rccm.2017.10.21070C>.
- [15] D.T. Montoro, A.L. Haber, M. Biton, V. Vinarsky, B. Lin, S.E. Birket, F. Yuan, S. Chen, H.M. Leung, J. Villoria, N. Rogel, G. Burgin, A.M. Tsankov, A. Waghray, M. Slyper, J. Waldman, L. Nguyen, D. Dionne, O. Rozenblatt-Rosen, P.R. Tata, H. Mou, M. Shivaraju, H. Bihler, M. Mense, G.J. Tearney, S.M. Rowe, J.F. Engelhardt, A. Regev, J. Rajagopal, A revised airway epithelial hierarchy includes CTR-expressing ionocytes, *Nature* 560 (7718) (2018) 319–324, <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0393-7>.
 - [16] L.W. Plasschaert, R. Zilionis, R. Choo-Wing, V. Savova, J. Knehr, G. Roma, A.M. Klein, A.B. Jaffe, A single-cell atlas of the airway epithelium reveals the CTR-rich pulmonary ionocyte, *Nature* 560 (7718) (2018) 377–381, <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0394-6>.
 - [17] S. Mielke, M. Guarino, F. Alhamdan, H.-U. Simon, H. Renz, J.-F. Dufour, D.P. Potaczek, H. Garn. Effects of obesity on asthma: immunometabolic links, *Pol. Arch. Intern. Med.* 128 (7–8) (2018) 469–477, <https://doi.org/10.20452/pamw.4304>.
 - [18] S.E. Wenzel, Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches, *Nat. Med.* 18 (5) (2012) 716–725, <https://doi.org/10.1038/nm.2678>.
 - [19] A. Ray, T.B. Oriss, S.E. Wenzel, Emerging molecular phenotypes of asthma, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Phys.* 308 (2) (2015) L130–L140, <https://doi.org/10.1152/ajplung.00070.2014>.
 - [20] M. Desai, J. Oppenheimer, Elucidating asthma phenotypes and endotypes: Progress towards personalized medicine, *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 116 (5) (2016) 394–401, <https://doi.org/10.1016/j.anaai.2015.12.024>.
 - [21] A.R. Koczulla, C.F. Vogelsmeier, H. Garn, H. Renz, New concepts in asthma: clinical phenotypes and pathophysiological mechanisms, *Drug Discov. Today* 22 (2) (2017) 388–396, <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.11.008>.
 - [22] T.F. Carr, A.A. Zeki, M. Kraft, Eosinophilic and noneosinophilic asthma, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 197 (1) (2018) 22–37, <https://doi.org/10.1164/rccm.2016.11.2232PP>.
 - [23] M.E. Kuruvilla, F.E.-H. Lee, G.B. Lee, Understanding asthma phenotypes, endotypes, and mechanisms of disease, *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 56 (2) (2019) 219–233, <https://doi.org/10.1007/s12016-018-8712-1>.
 - [24] A. Abdul Oayum, B. Koh, R.K. Martin, B.T. Kenworthy, R. Kharwadkar, Y. Fu, W. Wu, D.H. Conrad, M.H. Kaplan, The IL9 CNS-25 regulatory element controls mast cell and basophil IL-9 production, *J. Immunol.* 203 (5) (2019) 1111–1121, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900272>.
 - [25] H.-C. Chang, S. Sehara, R. Goswami, W. Yao, Q. Yu, G.L. Stritesky, R. Jabeen, C. McKinley, A.-N. Ahvi, L. Han, E.T. Nguyen, M.J. Robertson, N.B. Perumal, R.S. Tepper, S.L. Nutt, M.H. Kaplan, The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation, *Nat. Immunol.* 11 (6) (2010) 527–534, <https://doi.org/10.1038/ni.1867>.
 - [26] H. Garn, Is 9 more than 2 also in allergic airway inflammation? *J. Allergy Clin. Immunol.* 141 (6) (2018) 2024–2026, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.04.002>.
 - [27] M. Alrifai, L.M. Marsh, T. Dicke, A. Kılıç, M.L. Conrad, H. Renz, H. Garn, Compartmental and temporal dynamics of chronic inflammation and airway remodeling in a chronic asthma mouse model, *PLoS One* 9 (1) (2014) e85839, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085839>.
 - [28] R.L. Clifford, M.J. Jones, J.L. MacIsaac, L.M. McEwen, S.J. Goodman, S. Mostafavi, M.S. Kobor, C. Carlsen, Inhalation of diesel exhaust and allergen alters human bronchial epithelium DNA methylation, *J. Allergy Clin. Immunol.* 139 (1) (2017) 112–121, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.03.046>.
 - [29] D.P. Potaczek, H. Harb, S. Michel, B.A. Alhamwe, H. Renz, J. Tost, Epigenetics and allergy: from basic mechanisms to clinical applications, *Epigenomics* 9 (4) (2017) 539–571, <https://doi.org/10.2217/epi.2016.0162>.
 - [30] J.P. Olenec, W.K. Kim, W.-M. Lee, F. Yang, T.E. Pappas, L.E.P. Salazar, M.D. Evans, J. Bork, K. Roberg, R.F. Lemanske, J.E. Gern, Weekly monitoring of children with asthma for infections and illness during common cold seasons, *J. Allergy Clin. Immunol.* 125 (5) (2010) 1001–1006.e1, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.01.059>.
 - [31] L.S. Subrata, J. Bizzintino, E. Mamessier, A. Bosco, K.L. McKenna, M.E. Wikström, J. Goldblatt, P.D. Sly, B.J. Hales, W.R. Thomas, I.A. Laing, P.N. LeSouef, P.G. Holt, Interactions between innate antiviral and atopic immunoinflammatory pathways precipitate and sustain asthma exacerbations in children, *J. Immunol.* 183 (4) (2009) 2793–2800, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900695>.
 - [32] T. Ijaz, K. Pazdrak, M. Kalita, R. König, S. Choudhary, B. Tian, I. Boldogh, A.R. Brasier, Systems biology approaches to understanding Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) in mucosal remodeling and signaling in asthma, *World Allergy Organ. J.* 7 (1) (2014) 13, <https://doi.org/10.1186/1939-4551-7-13>.
 - [33] T. Liu, Y. Liu, M. Miller, L. Cao, J. Zhao, J. Wu, J. Wang, L. Liu, S. Li, M. Zou, J. Xu, D.H. Broide, L. Dong, Autophagy plays a role in FSTL1-induced epithelial mesenchymal transition and airway remodeling in asthma, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Phys.* 313 (1) (2017) L27–L40, <https://doi.org/10.1152/ajplung.00510.2016>.
 - [34] N. Rout-Pitt, N. Farrow, D. Parsons, M. Donnelly, Epithelial Mesenchymal Transition (EMT): a universal process in lung diseases with implications for cystic fibrosis pathophysiology, *Respir. Res.* 19 (1) (2018) 136, <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0834-8>.
 - [35] Y.Z. Lee, H.M. Yap, K. Shaari, C.L. Tham, M.R. Sulaiman, D.A. Israif, Blockade of eosinophil-induced bronchial epithelial-mesenchymal transition with a geranyl acetophenone in a coculture model, *Front. Pharmacol.* 8 (2017) 837, <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00837>.
 - [36] X. Zhu, Q. Li, G. Hu, J. Wang, Q. Hu, Z. Liu, G. Wu, Y. Zhong, BMS-345541 inhibits airway inflammation and epithelial-mesenchymal transition in airway remodeling of asthmatic mice, *Int. J. Mol. Med.* 42 (4) (2018) 1998–2008, <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3762>.
 - [37] N. Yang, H. Zhang, X. Cai, Y. Shang, Epigallocatechin-3-gallate inhibits inflammation and epithelial-mesenchymal transition through the PI3K/AKT pathway via upregulation of PTEN in asthma, *Int. J. Mol. Med.* 41 (2) (2018) 818–828, <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3292>.
 - [38] T.-L. Hackett, S.M. Warner, D. Stefanowicz, F. Shaheen, D.V. Pechkovsky, L.A. Murray, R. Argentieri, A. Kicic, S.M. Stick, T.R. Bai, D.A. Knight, Induction of epithelial-mesenchymal transition in primary airway epithelial cells from patients with asthma by transforming growth factor-beta1, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 180 (2) (2009) 122–133, <https://doi.org/10.1164/rccm.200811-1730OC>.
 - [39] P.R. Tata, J. Rajagopal, Plasticity in the lung: making and breaking cell identity, *Development* 144 (5) (2017) 755–766, <https://doi.org/10.1242/dev.143784>.
 - [40] D.J. Erle, D. Sheppard, The cell biology of asthma, *J. Cell Biol.* 205 (5) (2014) 621–631, <https://doi.org/10.1083/jcb.201401050>.
 - [41] F.A. Vieira Braga, G. Kar, M. Berg, O.A. Carpaij, K. Polanski, L.M. Simon, S. Brouwer, T. Gomes, L. Hesse, J. Jiang, E.S. Fasouli, M. Efenovara, R. Vento-Tormo, C. Talavera-López, M.R. Jonker, K. Affleck, S. Palit, P.M. Strzelecka, H.V. Firth, K.T. Mahbubani, A. Cvejic, K.B. Meyer, K. Saeb-Parsy, M. Luinge, C.-A. Brandsma, W. Timens, I. Angelidis, M. Strunz, G.H. Koppelman, A.J. van Oosterhout, H.B. Schiller, F.J. Theis, M. van den Berge, M.C. Nawijn, S.A. Teichmann, A cellular census of human lungs identifies novel cell states in health and in asthma, *Nat. Med.* 25 (7) (2019) 1153–1163, <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0468-5>.
 - [42] G.D. Leishangthem, U. Mabalirajan, V.P. Singh, A. Agrawal, B. Ghosh, A.K. Dinda, Ultrastructural changes of airway in murine models of allergy and diet-induced metabolic syndrome, *ISRN Allergy* 2013 (2013) 261297, <https://doi.org/10.1155/2013/261297>.
 - [43] A. Pardo-Saganta, B.M. Law, M. Gonzalez-Celeiro, V. Vinarsky, J. Rajagopal, Ciliated cells of pseudostratified airway epithelium do not become mucous cells after ovalbumin challenge, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 48 (3) (2013) 364–373, <https://doi.org/10.1165/rcmb.2012.0146OC>.
 - [44] C.M. Evans, O.W. Williams, M.J. Turim, R. Nigam, G.P. Mixides, M.R. Blackburn, F.J. DeMayo, A.R. Burns, C. Smith, S.D. Reynolds, B.R. Stripp, B.F. Dickey, Mucin is produced by clara cells in the proximal airways of antigen-challenged mice, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 31 (4) (2004) 382–394, <https://doi.org/10.1165/rcmb.2004.0060OC>.
 - [45] J.W. Tyner, E.Y. Kim, K. Ide, M.R. Pelletier, W.T. Roswit, J.D. Morton, J.T. Battaile, A.C. Patel, G.A. Patterson, M. Castro, M.S. Spoor, Y. You, S.L. Brody, M.J. Holtzman, Blocking airway mucous cell metaplasia by inhibiting EGFR antiapoptosis and IL-13 transdifferentiation signals, *J. Clin. Invest.* 116 (2) (2006) 309–321, <https://doi.org/10.1172/JCI25167>.
 - [46] J. Turner, J. Roger, J. Fitau, D. Combe, J. Giddings, G. van Heeke, C.E. Jones, Goblet cells are derived from a FOXJ1-expressing progenitor in a human airway epithelium, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 44 (3) (2011) 276–284, <https://doi.org/10.1165/rcmb.2009.0304OC>.
 - [47] J. Ordovas-Montanes, D.F. Dwyer, S.K. Nyquist, K.M. Buchheit, M. Vukovic, C. Deb, M.H. Wadsworth, T.K. Hughes, S.W. Kazer, E. Yoshimoto, K.N. Cahill, N. Bhattacharyya, H.R. Katz, B. Berger, T.M. Laidlaw, J.A. Boyce, N.A. Barrett, A.K. Shalek, Allergic inflammatory memory in human respiratory epithelial progenitor cells, *Nature* 560 (7720) (2018) 649–654, <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0449-8>.
 - [48] U.M. Zissler, A.M. Chaker, R. Effner, M. Ulrich, F. Guertel, G. Piontek, K. Dietz, M. Regn, B. Knapp, F.J. Theis, H. Heine, K. Suttner, C.B. Schmidt-Weber, Interleukin-4 and interferon-γ orchestrate an epithelial polarization in the airways, *Mucosal Immunol.* 9 (4) (2016) 917–926, <https://doi.org/10.1038/mi.2015.110>.
 - [49] P.-Y. Mantel, H. Kuipers, O. Boyman, C. Rhyner, N. Ouaked, B. Rückert, C. Karagiannis, B.N. Lambrecht, R.W. Hendriks, R. Cramer, C.A. Akdis, K. Blaser, C.B. Schmidt-Weber, GATA3-driven Th2 responses inhibit TGF-beta1-induced FOXP3 expression and the formation of regulatory T cells, *PLoS Biol.* 5 (12) (2007) e329, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050329>.
 - [50] J. Chou, S. Provot, Z. Werb, GATA3 in development and cancer differentiation: cells GATA have it!, *J. Cell. Physiol.* 222 (1) (2010) 42–49, <https://doi.org/10.1002/jcp.21943>.
 - [51] L.K. Fogli, M.S. Sundrud, S. Goel, S. Bajwa, K. Jensen, E. Derudder, A. Sun, M. Coffre, C. Uytendhove, J. van Snick, M. Schmidt-Suppran, A. Rao, G. Grumig, J. Durbin, S. Casola, S.S. Casola, K. Rajewsky, S.B. Koralov, T cell-derived IL-17 mediates epithelial changes in the airway and drives pulmonary neutrophilia, *J. Immunol.* 191 (6) (2013) 3100–3111, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301360>.
 - [52] J.L. Simpson, S. Phipps, K.J. Baines, K.M. Oreo, L. Gunawardhana, P.G. Gibson, Elevated expression of the NLRP3 inflammasome in neutrophilic asthma, *Eur. Respir. J.* 43 (4) (2014) 1067–1076, <https://doi.org/10.1183/09031936.00105013>.
 - [53] C. Rossios, S. Pavlidis, U. Hoda, C.-H. Kuo, C. Wiegman, K. Russell, K. Sun, M.J. Loza, F. Baribaud, A.L. Durham, O. Ojo, R. Lutter, A. Rowe, A. Bansal, C. Auffray, A. Sousa, J. Corfield, R. Djukanovic, Y. Guo, P.J. Sterk, K.F. Chung, I.M. Adcock, Sputum transcriptomics reveal upregulation of IL-1 receptor family members in patients with severe asthma, *J. Allergy Clin. Immunol.* 141 (2) (2018) 560–570, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.02.045>.
 - [54] A. Nakanishi, S. Morita, H. Iwashita, Y. Sagiya, Y. Ashida, H. Shirafuji, Y. Fujisawa, O. Nishimura, M. Fujino, Role of gob-5 in mucus overproduction and airway hyperresponsiveness in asthma, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (9) (2001) 5175–5180, <https://doi.org/10.1073/pnas.081510898>.
 - [55] M. Hoshino, S. Morita, H. Iwashita, Y. Sagiya, T. Nagi, A. Nakanishi, Y. Ashida,

Anhang

- O. Nishimura, Y. Fujisawa, M. Fujino, Increased expression of the human Ca²⁺-activated Cl⁻ channel 1 (CaCC1) gene in the asthmatic airway, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165 (8) (2002) 1132–1136, <https://doi.org/10.1164/ajrccm.165.8.2107068>.
- [56] H.-T.T. Tan, S. Hagner, F. Ruchti, U. Radzikowska, G. Tan, C. Altunbulakli, A. Eljaszewicz, M. Moniuszko, M. Akdis, C.A. Akdis, H. Garn, M. Sokolowska, Tight junction, mucin, and inflammasome-related molecules are differentially expressed in eosinophilic, mixed, and neutrophilic experimental asthma in mice, *Allergy* 74 (2) (2019) 294–307, <https://doi.org/10.1111/all.13619>.
- [57] A.A. Pezullo, R.A. Tudas, C.G. Stewart, L.G.V. Buonfiglio, B.D. Lindsay, P.J. Taft, N.D. Gansemeyer, J. Zabner, HSP90 inhibitor geldanamycin reverts IL-13- and IL-17-induced airway goblet cell metaplasia, *J. Clin. Invest.* 129 (2) (2019) 744–758, <https://doi.org/10.1172/JCI123524>.
- [58] Y. Chen, P. Thai, Y.-H. Zhao, Y.-S. Ho, M.M. DeSouza, R. Wu, Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop, *J. Biol. Chem.* 278 (19) (2003) 17036–17043, <https://doi.org/10.1074/jbc.M210429200>.
- [59] T. Fujisawa, M.M.-J. Chang, S. Velichko, P. Thai, L.-Y. Hung, F. Huang, N. Phuong, Y. Chen, R. Wu, NF- κ B mediates IL-1 β - and IL-17A-induced MUC5B expression in airway epithelial cells, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 45 (2) (2011) 246–252, <https://doi.org/10.1165/ajrccm.2009-0313OC>.
- [60] M. Yokota, T. Tamachi, Y. Yokoyama, Y. Maezawa, H. Takatori, A. Suto, K. Suzuki, K. Hirose, K. Takeda, H. Nakajima, I κ BNS induces Muc5ac expression in epithelial cells and causes airway hyper-responsiveness in murine asthma models, *Allergy* 72 (7) (2017) 1043–1053, <https://doi.org/10.1111/all.13079>.
- [61] T. Oyanagi, T. Takizawa, A. Aizawa, O. Solongo, H. Yagi, Y. Nishida, H. Koyama, A. Saitoh, H. Arakawa, Suppression of MUC5AC expression in human bronchial epithelial cells by interferon- γ , *Allergol. Int.* 66 (1) (2017) 75–82, <https://doi.org/10.1016/j.allit.2016.05.005>.
- [62] C. Mitchell, K. Provost, N. Niu, R. Homer, L. Cohn, IFN- γ acts on the airway epithelium to inhibit local and systemic pathology in allergic airway disease, *J. Immunol.* 187 (7) (2011) 3815–3820, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100435>.
- [63] S.T. Holgate, D.E. Davies, Rethinking the pathogenesis of asthma, *Immunity* 31 (3) (2009) 362–367, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.08.013>.
- [64] S.T. Holgate, The sentinel role of the airway epithelium in asthma pathogenesis, *Immunol. Rev.* 242 (1) (2011) 205–219, <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01030.x>.
- [65] C.M. Lloyd, S. Saeglani, Epithelial cytokines and pulmonary allergic inflammation, *Curr. Opin. Immunol.* 34 (2015) 52–58, <https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.02.001>.
- [66] H. Kouzaki, I. Tojima, H. Kita, T. Shimizu, Transcription of interleukin-25 and extracellular release of the protein is regulated by allergen proteases in airway epithelial cells, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 49 (5) (2013) 741–750, <https://doi.org/10.1165/ajrccm.2012-0304OC>.
- [67] C.E. O'Leary, C. Schneider, R.M. Locksley, Tuft cells systemically dispersed sensory epithelia integrating immune and neural circuitry, *Annu. Rev. Immunol.* 37 (2019) 47–72, <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042718-041505>.
- [68] D. Cheng, Z. Xue, L. Yi, H. Shi, K. Zhang, X. Huo, L.R. Bonser, J. Zhao, Y. Xu, D.J. Erle, G. Zhen, Epithelial interleukin-25 is a key mediator in Th2-high, corticosteroid-responsive asthma, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 190 (6) (2014) 639–648, <https://doi.org/10.1164/ajrccm.2014.03.0505OC>.
- [69] H. Kouzaki, S.M. O'Grady, C.B. Lawrence, H. Kita, Proteases induce production of thymic stromal lymphopoietin by airway epithelial cells through protease-activated receptor-2, *J. Immunol.* 183 (2) (2009) 1427–1434, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900904>.
- [70] Y. Li, W. Wang, Z. Lv, Y. Li, Y. Chen, K. Huang, C.J. Corrigan, S. Ying, Elevated expression of IL-33 and TSLP in the airways of human asthmatics in vivo: a potential biomarker of severe refractory disease, *J. Immunol.* 200 (7) (2018) 2253–2262, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701455>.
- [71] G.M. Gauvreau, P.M. O'Byrne, L.-P. Boulet, Y. Wang, D. Cockcroft, J. Bigler, J.M. FitzGerald, M. Boedigheimer, B.E. Davis, C. Dias, K.S. Gorski, L. Smith, E. Bautista, M.R. Comeau, R. Leigh, J.R. Parnes, Effects of an anti-TSLP antibody on allergen-induced asthmatic responses, *N. Engl. J. Med.* 370 (22) (2014) 2102–2110, <https://doi.org/10.1056/NEJMoA1402895>.
- [72] M.F. Moffatt, I.G. Gut, F. Demenais, D.P. Strachan, E. Bouzigon, S. Heath, E. von Mutius, M. Farrall, M. Lathrop, W.O.C.M. Cookson, A large-scale, consortium-based genome-wide association study of asthma, *N. Engl. J. Med.* 363 (13) (2010) 1211–1221, <https://doi.org/10.1056/NEJMoA0906312>.
- [73] D. Préfontaine, J. Nadigel, F. Chouiali, S. Audusseau, A. Semlali, J. Chakir, J.G. Martin, Q. Hamid, Increased IL-33 expression by epithelial cells in bronchial asthma, *J. Allergy Clin. Immunol.* 125 (3) (2010) 752–754, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.935>.
- [74] A. Kato, Group 2 innate lymphoid cells in airway diseases, *Chest* 156 (1) (2019) 141–149, <https://doi.org/10.1016/j.chest.2019.04.101>.
- [75] K. Sweerus, M. Lachowicz-Scroggins, E. Gordon, M. LaFemina, X. Huang, M. Parikh, C. Kanegai, J.V. Fahy, J.A. Frank, Claudin-18 deficiency is associated with airway epithelial barrier dysfunction and asthma, *J. Allergy Clin. Immunol.* 139 (1) (2017) 72–81.e1, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.02.035>.
- [76] F. Holguin, E.R. Bleeker, W.W. Busse, W.J. Calhoun, M. Castro, S.C. Erzurum, A.M. Fitzpatrick, B. Gaston, E. Israel, N.N. Jarjour, W.C. Moore, S.P. Peters, M. Yonas, W.G. Teague, S.E. Wenzel, Obesity and asthma: An association modified by age of asthma onset, *J. Allergy Clin. Immunol.* 127 (6) (2011) 1486–1493.e2, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.03.036>.
- [77] S. Shahana, E. Björnsson, D. Lúdvíksdóttir, C. Janson, O. Nettelbladt, P. Venge, G.M. Roomans, Ultrastructure of bronchial biopsies from patients with allergic and non-allergic asthma, *Respir. Med.* 99 (4) (2005) 429–443, <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2004.08.013>.
- [78] D. Winnica, C. Corey, S. Mullett, M. Reynolds, G. Hill, S. Wendell, L. Que, F. Holguin, S. Shiva, Bioenergetic differences in the airway epithelium of lean versus obese asthmatics are driven by nitric oxide and reflected in circulating platelets, *Antioxid. Redox Signal.* (2019), <https://doi.org/10.1089/ars.2018.7627>.
- [79] S. Komakula, S. Khatri, J. Mermis, S. Savill, S. Haque, M. Rojas, L. Brown, G.W. Teague, F. Holguin, Body mass index is associated with reduced exhaled nitric oxide and higher exhaled 8-isoprostanes in asthmatics, *Respir. Res.* 8 (2007) 32, <https://doi.org/10.1186/1465-9921-8-32>.
- [80] K. Watanabe, M. Suzukawa, S. Arakawa, K. Kobayashi, S. Igarashi, H. Tashimo, H. Nagai, S. Tohma, T. Nagase, K. Ohta, Leptin enhances cytokine/chemokine production by normal lung fibroblasts by binding to leptin receptor, *Allergol. Int.* (2019), <https://doi.org/10.1016/j.allit.2019.04.002>.
- [81] X.L. Zhu, X.Q. Qin, Y. Xiang, Y.R. Tan, X.P. Qu, H.J. Liu, Adipokine adiponectin is a potential protector to human bronchial epithelial cell for regulating proliferation, wound repair and apoptosis: comparison with leptin and resistin, *Peptides* 40 (2013) 34–41, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.11.017>.
- [82] C.L. Ordoñez, T.E. Shaughnessy, M.A. Matthay, J.V. Fahy, Increased neutrophil numbers and IL-8 levels in airway secretions in acute severe asthma: clinical and biologic significance, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161 (4 Pt 1) (2000) 1185–1190, <https://doi.org/10.1164/ajrccm.161.4.9812061>.
- [83] C. Beisswenger, J. Platz, C. Seifart, C. Vogelmeier, R. Bals, Exposure of differentiated airway epithelial cells to volatile smoke in vitro, *Respiration* 71 (4) (2004) 402–409, <https://doi.org/10.1159/000079647>.
- [84] D.L. Pham, G.-Y. Ban, S.-H. Kim, Y.-S. Shin, Y.-M. Ye, Y.-J. Chwae, H.-S. Park, Neutrophil autophagy and extracellular DNA traps contribute to airway inflammation in severe asthma, *Clin. Exp. Allergy* 47 (1) (2017) 57–70, <https://doi.org/10.1111/cea.12859>.
- [85] T.K. Wright, P.G. Gibson, J.L. Simpson, V.M. McDonald, L.G. Wood, K.J. Baines, Neutrophil extracellular traps are associated with inflammation in chronic airway disease, *Respirology* 21 (3) (2016) 467–475, <https://doi.org/10.1111/resp.12730>.
- [86] I.H. Heijink, J.A. Noordhoek, W. Timens, A.J.M. van Oosterhout, D.S. Postma, Abnormalities in airway epithelial junction formation in chronic obstructive pulmonary disease, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 189 (11) (2014) 1439–1442, <https://doi.org/10.1164/ajrccm.201311-1982LE>.
- [87] C.L. Grainger, D.E. Davies, Epithelial injury and repair in airways diseases, *Chest* 144 (6) (2013) 1906–1912, <https://doi.org/10.1378/chest.12-1944>.
- [88] W. Hao, J. Wang, Y. Zhang, Y. Wang, L. Sun, W. Han, Leptin positively regulates MUC5AC production and secretion induced by interleukin-13 in human bronchial epithelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 493 (2) (2017) 979–984, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.09.106>.
- [89] S. Kwak, Y.-D. Kim, H.G. Na, C.H. Bae, S.-Y. Song, Y.S. Choi, Resistin upregulates MUC5AC/B mucin gene expression in human airway epithelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 499 (3) (2018) 655–661, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.03.206>.
- [90] B. Pattnaik, M. Bodas, N.K. Bhatraju, T. Ahmad, R. Pant, R. Guleria, B. Ghosh, A. Agrawal, IL-4 promotes asymmetric dimethylarginine accumulation, oxo-nitrosative stress, and hypoxic response-induced mitochondrial loss in airway epithelial cells, *J. Allergy Clin. Immunol.* 138 (1) (2016) 130–141.e9, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.11.036>.
- [91] A.E. Hegab, M. Ozaki, F.Y. Melligy, S. Kagawa, M. Ishii, T. Betsuyaku, High fat diet activates adult mouse lung stem cells and accelerates several aging-induced effects, *Stem Cell Res.* 33 (2018) 25–35, <https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.10.006>.
- [92] F. Mohebbani, A.C.-Y. Hsu, A.T. Reid, T. Williams, A. Kicic, S.M. Stick, P.M. Hansbro, P.A.B. Wark, D.A. Knight, The genetic and epigenetic landscapes of the epithelium in asthma, *Respir. Res.* 17 (1) (2016) 119, <https://doi.org/10.1186/s12931-016-0434-4>.
- [93] N. Verma, H. Pan, L.C. Doré, A. Shukla, Q.V. Li, B. Pelham-Webb, V. Teijeiro, F. González, A. Krivtsov, C.-J. Chang, E.P. Papapetrou, C. He, O. Elemento, D. Huangfu, TET proteins safeguard bivalent promoters from de novo methylation in human embryonic stem cells, *Nat. Genet.* 50 (1) (2018) 83–95, <https://doi.org/10.1038/s41588-017-0002-y>.
- [94] I.V. Yang, B.S. Pedersen, A.H. Liu, G.T. O'Connor, D. Pillai, M. Kattan, R.T. Misiak, R. Gruchalla, S.J. Szefer, G.K. Khurana Hershey, C. Kercsmar, A. Richards, A.D. Stevens, C.A. Kolakowski, M. Makhija, C.A. Sorkness, R.Z. Krouse, C. Visness, E.J. Davidson, C.E. Hennessy, R.J. Martin, A. Trogias, W.W. Busse, D.A. Schwartz, The nasal methylome and childhood atopic asthma, *J. Allergy Clin. Immunol.* 139 (5) (2017) 1478–1488, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.07.036>.
- [95] H.K. Somnineni, X. Zhang, J.M. Biagini Myers, M.B. Kovacic, A. Ullm, N. Jurcak, P.H. Ryan, G.K. Khurana Hershey, H. Ji, Ten-eleven translocation 1 (TET1) methylation is associated with childhood asthma and traffic-related air pollution, *J. Allergy Clin. Immunol.* 137 (3) (2016) 797–805.e5, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.10.021>.
- [96] J.D. Bursleson, D. Siniard, V.K. Yadagiri, X. Chen, M.T. Weirauch, B.P. Ruff, E.B. Brandt, G.K.K. Hershey, H. Ji, TET1 contributes to allergic airway inflammation and regulates interferon and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways in bronchial epithelial cells, *Sci. Rep.* 9 (1) (2019) 7361, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43767-6>.
- [97] P.O. Brook, M.M. Perry, L.M. Adcock, A.L. Durham, Epigenome-modifying tools in asthma, *Epigenomics* 7 (6) (2015) 1017–1032, <https://doi.org/10.2217/epi.15.53>.
- [98] P. McErlan, A. Kelly, J. Dhariwal, M. Kirtland, J. Watson, I. Ranz, D.J. Cousins, R. Solari, M. Edwards, S.L. Johnston, P. Lavender, Genome-wide profiling of an enhancer-associated histone modification reveals the influence of asthma on the epigenome of the airway epithelium, *bioRxiv* (2018), <https://doi.org/10.1101/>

Anhang

D.P. Potaczek, et al.

Cellular Signalling 69 (2020) 109523

- 282889.
- [99] D. Stefanowicz, J.Y. Lee, K. Lee, F. Shaheen, H.-K. Koo, S. Booth, D.A. Knight, T.-L. Hackett, Elevated H3K18 acetylation in airway epithelial cells of asthmatic subjects, *Respir. Res.* 16 (2015) 95, <https://doi.org/10.1186/s12931-015-0254-y>.
- [100] I. Haj-Salem, R. Fakhfakh, J.-C. Bérubé, E. Jacques, S. Plante, M.J. Simard, Y. Bossé, J. Chakir, MicroRNA-19a enhances proliferation of bronchial epithelial cells by targeting TGF β R2 gene in severe asthma, *Allergy* 70 (2) (2015) 212–219, <https://doi.org/10.1111/all.12551>.
- [101] H. Huang, H. Lu, L. Liang, Y. Zhi, B. Huo, L. Wu, L. Xu, Z. Shen, MicroRNA-744 inhibits proliferation of bronchial epithelial cells by regulating Smad3 pathway via targeting transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in severe asthma, *Med. Sci. Monit.* 25 (2019) 2159–2168, <https://doi.org/10.12659/MSM.912412>.
- [102] Z.-C. Yang, Z.-H. Qu, M.-J. Yi, Y.-C. Shan, N. Ran, L. Xu, X.-J. Liu, MiR-448-5p inhibits TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition and pulmonary fibrosis by targeting Six1 in asthma, *J. Cell. Physiol.* 234 (6) (2019) 8804–8814, <https://doi.org/10.1002/jcp.27540>.

7.3 Veröffentlichung 2



biomedicines



Article

Side-Directed Release of Differential Extracellular Vesicle-associated microRNA Profiles from Bronchial Epithelial Cells of Healthy and Asthmatic SubjectsViktoria E. M. Schindler ^{1,†}, Fahd Alhamdan ^{1,†}, Christian Preußner ^{2,3}, Lukas Hintz ¹, Bilal Alashkar Alhamwe ^{2,4}, Andrea Nist ⁵, Thorsten Stiewe ⁵, Elke Pogge von Strandmann ^{2,3}, Daniel P. Potaczek ¹, Clemens Thölken ^{6,†} and Holger Garn ^{1,*,†}

¹ Translational Inflammation Research Division & Core Facility for Single Cell Multiomics, Philipps University of Marburg–Medical Faculty, Member of the German Center for Lung Research (DZL) and the Universities of Giessen and Marburg Lung Center, 35043 Marburg, Germany; schindlerviktoria@t-online.de (V.E.M.S.); alhamdaf@staff.uni-marburg.de (F.A.); hintz@staff.uni-marburg.de (L.H.); potaczek@staff.uni-marburg.de (D.P.P.)

² Institute for Tumor Immunology, Philipps University of Marburg–Medical Faculty, 35043 Marburg, Germany; preusserc@staff.uni-marburg.de (C.P.); bilal.alashkaralhamwe@staff.uni-marburg.de (B.A.A.); elke.poggevonstrandmann@uni-marburg.de (E.P.v.S.)

³ Core Facility Extracellular Vesicles, Philipps University of Marburg–Medical Faculty, 35043 Marburg, Germany

⁴ College of Pharmacy, International University for Science and Technology (IUST), Daraa 15, Syria

⁵ Institute of Molecular Oncology & Genomics Core Facility, Philipps University of Marburg–Medical Faculty, Member of the German Center for Lung Research (DZL) and the Universities of Giessen and Marburg Lung Center, 35043 Marburg, Germany; andrea.nist@imt.uni-marburg.de (A.N.); stiewe@uni-marburg.de (T.S.)

⁶ Institute of Medical Bioinformatics and Biostatistics, Philipps University of Marburg–Medical Faculty, 35043 Marburg, Germany; thoelken@uni-marburg.de

* Correspondence: garn@staff.uni-marburg.de; Tel.: +49-6421-2866040

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Schindler, V.E.M.; Alhamdan, F.; Preußner, C.; Hintz, L.; Alashkar Alhamwe, B.; Nist, A.; Stiewe, T.; Pogge von Strandmann, E.; Potaczek, D.P.; Thölken, C.; et al. Side-Directed Release of Differential Extracellular Vesicle-associated microRNA Profiles from Bronchial Epithelial Cells of Healthy and Asthmatic Subjects. *Biomedicines* **2022**, *10*, 622. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10030622>

Academic Editors: Berislav Bošnjak and Stanislaw Bazan-Socha

Received: 16 February 2022

Accepted: 27 February 2022

Published: 7 March 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Extracellular vesicles (EVs) are released by virtually all cells and may serve as intercellular communication structures by transmitting molecules such as proteins, lipids, and nucleic acids between cells. MicroRNAs (miRNAs) are an abundant class of vesicular RNA playing a pivotal role in regulating intracellular processes. In this work, we aimed to characterize vesicular miRNA profiles released in a side-directed manner by bronchial epithelial cells from healthy and asthmatic subjects using an air–liquid interface cell culture model. EVs were isolated from a culture medium collected from either the basolateral or apical cell side of the epithelial cell cultures and characterized by nano-flow cytometry (NanoFCM) and bead-based flow cytometry. EV-associated RNA profiles were assessed by small RNA sequencing and subsequent bioinformatic analyses. Furthermore, miRNA-associated functions and targets were predicted and miRNA network analyses were performed. EVs were released at higher numbers to the apical cell side of the epithelial cells and were considerably smaller in the apical compared to the basolateral compartment. EVs from both compartments showed a differential tetraspanins surface marker expression. Furthermore, 236 miRNAs were differentially expressed depending on the EV secretion side, regardless of the disease phenotype. On the apical cell side, 32 miRNAs were significantly altered in asthmatic versus healthy conditions, while on the basolateral cell side, 23 differentially expressed miRNAs could be detected. Downstream KEGG pathway analysis predicted mTOR and MAPK signaling pathways as potential downstream targets of apically secreted miRNAs. In contrast, miRNAs specifically detected at the basolateral side were associated with processes of T and B cell receptor signaling. The study proves a compartmentalized packaging of EVs by bronchial epithelial cells supposedly associated with site-specific functions of cargo miRNAs, which are considerably affected by disease conditions such as asthma.

Keywords: bronchial epithelial cells; extracellular vesicles; miRNAs; airway epithelium; asthma; cellular compartmentalization

1. Introduction

Asthma is a common non-communicable inflammatory disease of the airways, affecting more than 339 million people worldwide, and is a major cause of morbidity around the globe [1,2]. Disease pathogenesis in asthma involves the interaction of many different cell types within the respiratory tract, including CD4+ T-cells, granulocytes, dendritic cells, macrophages, myeloid-derived regulatory cells, natural killer cells, smooth muscle cells, and airway epithelial cells [3]. These various types of cells communicate via many different signaling mechanisms, such as soluble factors, including cytokines and chemokines. In the past decade, a new mechanism of intercellular communication by extracellular vesicles (EVs) was discovered [4]. They have been found in all body fluids, including in blood [5], urine [6], and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) [7]. All EVs are composed of a lipid bilayer containing transmembrane proteins and can be classified into exosomes, microvesicles, and apoptotic bodies depending on size, structural components, and generation process [8]. While exosomes are approximately 30–150 nm in diameter and are derived from the exocytosis of multivesicular bodies, microvesicles are shed at the cell surface and are 50–1000 nm in size [9,10]. EVs express membrane proteins, which frequently have been used as surface markers to identify specific EV subsets such as exosomes, or to trace the cell of origin. Universally expressed exosomal proteins such as the tetraspanins CD9, CD63, and CD81 are therefore commonly used as exosomal markers to distinguish exosomes from other EV subsets [11], although conflicting data describe the expression on both exosomes and microvesicles [12].

EVs function as intercellular communicators transporting diverse lipids, proteins, and nucleic acids, such as DNA and certain types of RNA including messenger RNA (mRNA) and small RNAs, such as microRNAs (miRNAs), small interfering RNAs (siRNAs), transfer RNAs (tRNAs), and PIWI-associated RNAs (piRNAs) [13]. Small RNAs are less than 200 nucleotides long and are not translated into proteins, but rather regulate biological processes by interfering with mRNA translation. MiRNAs are defined as short non-coding single-stranded RNAs with a length of approximately 22 nucleotides. They target mRNA, inducing mRNA degradation or inhibiting protein translation, and thereby regulate gene expression [14]. Vesicular miRNAs are protected from degradation by RNA-degrading enzymes (RNAses) in body fluids due to the protective shell provided by the vesicles lipid bilayer, and therefore can be shuttled between cells [15].

The airway epithelium is known to account for a variety of abnormal responses in asthma, such as epithelial mucus metaplasia [16,17]. Increasing evidence further suggests an active role of lung epithelial cells in the initiation and perpetuation of local immune mechanisms not only by the secretion of cytokines, but also as a major producer of EVs [18–21]. Many studies have described a potential proinflammatory role of EVs in allergy and asthma, but with few studies specifically addressing the role of EVs derived from airway epithelial cells. Vesicles secreted by lung epithelial cells have been shown to prime immune cells toward proinflammatory features [22]. Furthermore, a differential expression of extracellular miRNAs in asthmatic patients compared to non-asthmatics with a downstream regulatory impact on inflammation has been described [23,24]. However, to the best of our knowledge, so far, no study has explicitly distinguished between vesicular miRNA profiles on the apical and basolateral cell side of airway epithelial cells.

The purpose of this study was to investigate vesicle characteristics and vesicular miRNA profiles associated with EVs derived from the airway epithelial cells of healthy and asthmatic subjects depending on the cell side of secretion. Therefore, an air–liquid–interface cell culture model of airway epithelial cells was used for sample collection. We then performed small RNA sequencing and conducted extensive bioinformatic analyses

to identify vesicular miRNA signatures. Furthermore, miRNA associated roles, functions, and targets were predicted by associated target genes, and miRNA network analysis was conducted to reveal closely related functional clusters within the identified set.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Culture

MucilAir™ primary human bronchial epithelial cells were purchased from Epithelix (Epithelix, Sàrl, Geneve, Switzerland) and cultured using air–liquid interface conditions. Cultures were established from three different healthy non-smoking donors (two males and one female, aged 15, 41, and 71 years, respectively) and three different asthmatic non-smoking donors (two males and one female, aged 36, 50, and 55 years, respectively). MucilAir™ cell culture medium (Epithelix) was exchanged and the cells were washed carefully with a medium from the apical side to remove residual mucus on a regular basis, according to the manufacturer's instructions. The cell culture medium was continuously collected over one month from the basolateral and apical cell sides. While basal samples were directly retrieved from the bottom chamber of the culture system, for collection of the apical samples, the cells were incubated with 200 µL apically applied cell culture medium for 30 min at 37 °C, and afterwards they were washed by carefully pipetting up and down. All samples were stored at –80 °C until further use. The general experimental downstream workflow is shown in Figure 1.

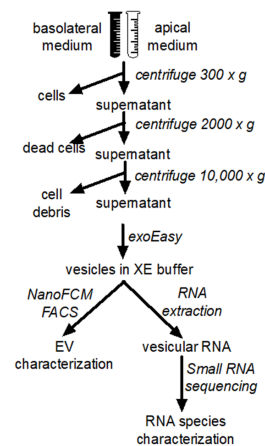


Figure 1. Schematic overview of EV preparation steps.

2.2. EV Isolation

After thawing at room temperature, conditioned medium samples were sequentially centrifuged at 4 °C to remove cell debris and large vesicles (10 min at 500× *g*, 20 min at 2000× *g* and 30 min at 10,000× *g*). Next, the samples were passed through a 0.22 µm filter (Millex-GS Syringe filter unit, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and the EVs were isolated using the exoEasy kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) from 4 mL of basolaterally and 600 µL of apically collected conditioned medium, according to the manufacturer's protocol [25].

2.3. NanoFCM Analysis

For the Flow Nano Analyzer (NanoFCM Co. Ltd., Nottingham, UK) analysis, the system was calibrated using 200 nm polystyrene beads (NanoFCM Co. Ltd., Nottingham, UK) with a defined concentration of 5.7×10^8 particles/mL, which were also used as a

reference for the particle concentration. In addition, monodisperse silica beads (NanoFCM Co. Ltd., Nottingham, UK) of four different sizes were used as reference standards to calibrate the size of the EVs. Freshly filtered (0.22 μm) PBS was analyzed as a background signal, which was subtracted from the other measurements. EV samples were diluted with filtered PBS resulting in a particle count in an optimum range of 2500–12,000 events, and sample data were collected for 1 min with a sample pressure of 0.4 kPa. Particle concentration and size distribution were calculated using the NanoFCM software NF Profession v1.08) (NanoFCM Co. Ltd., Nottingham, UK). Median and interquartile range (IQR) were calculated using R software v4.1.0 (R Foundation, Vienna, Austria).

2.4. Total Protein Quantification

The EV sample protein concentration measurement was performed on NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at 280 nm, with an estimated percent extinction coefficient of 10. The analysis was performed in triplicate on non-diluted EV isolates.

2.5. Bead-Based Flow Cytometry

EVs were detected by bead-based flow cytometry as previously described by Benedikter et al., with some adaptations [26]. Briefly, 4 μm aldehyde/sulphate latex beads at 3.5×10^8 /mL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) were incubated with 0.125 mg/mL of an equal mixture of three monoclonal antibodies (anti-human CD9 (clone M-L13), anti-human CD63 (clone H5C6), anti-human CD81 (clone JS-81)); all antibodies were purchased from BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) overnight in an MES buffer (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) on a shaker at 6500 rpm. The coated beads were stored in PBS containing 0.1% (*m/v*) glycine and 0.1% (*m/v*) sodium azide at 4 °C until use. Before use, the beads were washed with PBS containing 2% (*w/v*) bovine serum albumin (BSA). Then, 1×10^6 beads in 1 μL were incubated overnight with 100 μL of isolated EVs suspended in PBS at a concentration of 1.6×10^7 particles/mL based on NanoFCM measurements. Detection was performed as described previously, with either one or a mixture of the following phycoerythrin (PE)-labelled antibodies: anti-human CD9, anti-human CD63, and anti-human CD81 (same clones as above) [26]. Stained beads were suspended in 150 μL PBS and were analyzed using a BD FACSCanto II and FACS Diva v8.0.1 analysis software (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). To quantify the EV surface marker expression, relative fluorescence units (RFU) were calculated by multiplying the percentage of PE-positive beads with the median fluorescent intensity (MFI) of the positive bead population, as described by Benedikter et al. [26].

2.6. Statistical Analysis of Numerical Data

Data were analyzed using GraphPad Prism v7 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) using Student's unpaired t-test for concentration and size distribution, and the Whitney–Mann U-test for FACS analysis with *p*-values * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001, and **** < 0.0001. Data are presented as mean \pm SEM.

2.7. Vesicular RNA Extraction

RNA extraction was performed from 200 μL of EV solution using the miRNeasy kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. The RNA concentration was assessed using the Qubit™ microRNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). RNA size distribution and yield were analyzed using the Agilent 2100 Bioanalyzer with the Small RNA analysis kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

2.8. Small RNA Sequencing

Small RNA libraries were constructed using NEBNext Small RNA Library Prep Set for Illumina (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), according to the manufacturer's protocol, with minor modifications for the low RNA input. Briefly, 3 ng of RNA was used for

the library preparation. The 3' SR Adapter, SR RT Primer, and 5' SR Adapter were diluted 1:4, and the RNA was ligated with both adapters, and was reverse transcribed, barcoded, and amplified for 15 cycles. The generated libraries were cleaned up using AMPure XP Beads (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) and quantified using the Qubit™ dsDNA HS Assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and the Bioanalyzer High Sensitivity DNA Analysis kit (Agilent Technologies) prior to sequencing on a NextSeq550 platform (Illumina, San Diego, CA, USA) with High Output Kit v2.5 and 50 bases single-reads, according to the manufacturer's instructions.

2.9. Bioinformatic Analysis

The reads were first trimmed for the first three nucleotides (-u 3) and adapters overlapping at least five nucleotides with the read (-O 5) using cutadapt v2.9 [27]. Reads shorter than 15 nucleotides were discarded (-m 15). Trimmed reads were mapped using bwa-mem v0.7.17-r1188 in three steps, with the minimum score output (-T) and seed length (-k) set to 15 [28]. The reads were mapped successively against a custom list of transcripts containing ribosomal RNAs (rRNAs) from rFam 14.1, mature miRNAs from miRbase 22.1, ncRNAs from ENSEMBL release 97, piRNAs from piRNA-DB v1.7.5, and cDNAs from ENSEMBL release 97 as the references. In this order, unmapped reads from each step were mapped against the next reference to assure unique attribution per RNA type. The reads were counted per transcript with Samtools v1.10 [29], and 374 miRNAs with more than 10 reads across all samples were analyzed using R package DESeq2 v1.28.1 for the differential gene expression [30]. Differences were classified as significant with a threshold of absolute value of fold change (FC) > 2 and FDR < 0.05. Principal component analysis was conducted and visualized using R package pcaExplorer v2.14.2 based on variance stabilized transformed read counts of miRNAs [31]. Heatmaps were generated using R package pheatmap v1.0.12 with default clustering parameters. KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) pathway analyses were performed using DIANA-miRPath v3.0 with a FDR threshold < 0.05 and other default settings [32]. miRNAs function, family, disease, and regulatory proteins were analyzed using TAM 2.0 by masking cancer-related terms and keeping the other default settings [33]. Network analysis was conducted by miRTargetLink Human with strong evidence, and the resulting genes were uploaded on STRING v11.0 for the Reactome pathways [34].

3. Results

3.1. EVs Secreted by Airway Epithelial Cells Are Mainly Released at the Apical Cell Surface

To confirm that the isolated particles were indeed EVs, and to compare numbers and composition of apically versus basolaterally released EVs, NanoFCM analysis and bead-based flow cytometry with staining for characteristic tetraspanin surface markers of EVs were performed. Particle concentrations and size profiles showed significant differences in NanoFCM analysis, depending on their isolation side. Generally, epithelial cells secreted significantly larger quantities of particles at the apical cell surface compared to the basolateral side. NanoFCM analysis showed higher particle concentrations in apically obtained EV samples (Figure 2A). This finding was further confirmed by the results of protein concentration analyses, as depicted in Figure 2B. Furthermore, the size of particles retrieved from the apical cell side wash corresponded to the typical size range of exosomes with a mean median size of 75 nm (62–95 nm). Contrarily, particles isolated from the basolateral side were considerably larger in size with a mean median size of 169 nm (140–192 nm), consistent in size with microvesicles rather than with exosomes (Figure 2C,D). No differences in concentration or size range were observed between particles from healthy and asthmatic subjects.

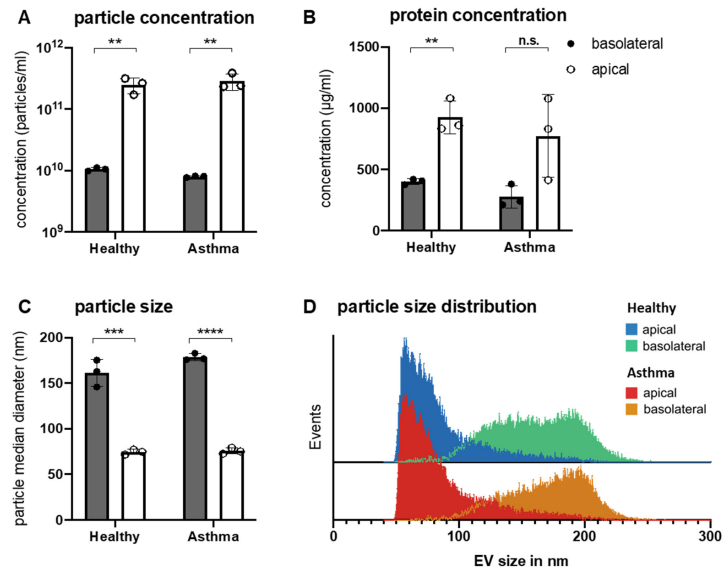


Figure 2. EV characteristics in apically and basolaterally secreted vesicles. (A), Particle concentration after EV isolation analyzed by NanoFCM. (B), Protein concentration in EV isolates measured by NanoDrop Protein A280. (C), Median particle diameter and (D) size distribution of EVs isolated from the apical or basolateral side of bronchial epithelial cell cultures from healthy and asthmatic subjects analyzed by NanoFCM. Bars represent mean \pm SD; dots indicate individual samples. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. EV—extracellular vesicle; n.s.—not significant.

3.2. Differential Surface Marker Expression Profiles between Apically and Basolaterally Released EVs

Bead-based flow cytometry using cocktails of antibodies directed towards the EV-identifying tetraspanin surface markers CD9, CD63, and CD81 for bead binding and detection did not reveal any significant differences between apical and basolateral EVs. However, when examining the expression of singular surface proteins, vesicles secreted to the basolateral side showed a higher expression of CD9 and CD81 compared to apically secreted vesicles, while for CD63, such a difference could not be observed (Figure 3A,B). When further looking at the subgroups, namely EVs from asthmatic and healthy subjects, these differences in marker expression depending on secretion side were similarly represented. However, CD9 expression by apical compared to basolateral EVs seemed to differ to a greater extent in the EVs of healthy subjects. When comparing the surface marker expression of EVs from healthy and asthmatic subjects, subtle distinctions in the expression of CD9 were observed on the basolateral side, but not for the other tetraspanins. No differences could be found in these groups for vesicles from the apical cell side (Figure 3C). This differential representation of selective marker proteins on EVs was generally suggestive for compositional differences, depending on the cell side of secretion.

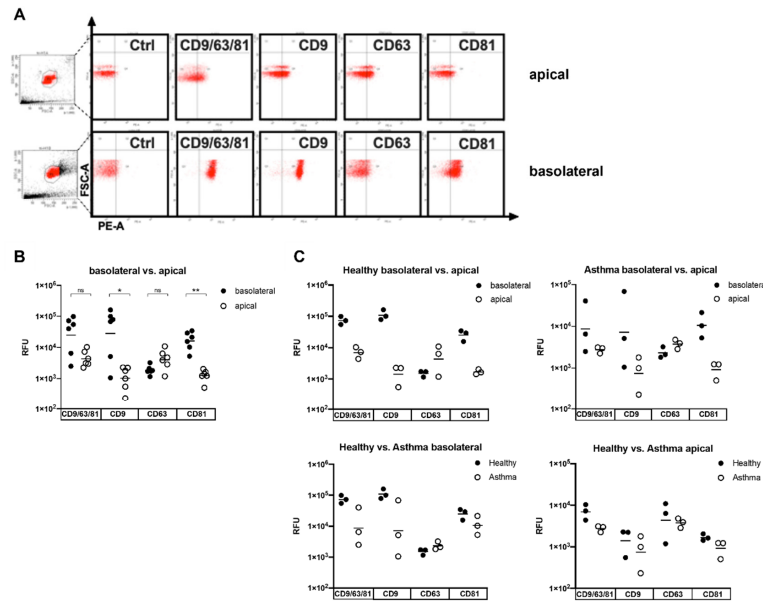


Figure 3. Bead-based flow cytometry analysis of tetraspanins surface marker expression on EVs released by airway epithelial cells. Vesicles were captured using beads coated with a mixture of CD9-, CD63-, and CD81-specific antibodies. Specific secondary antibodies coupled with either CD9, CD63, or CD81, or a combination of all three, were used for detection. (A) The results of one representative experiment demonstrating tetraspanin expression on EVs isolated from apical and basolateral cell culture medium are shown. (B) Tetraspanin expression in EVs isolated from basolateral versus apical cell culture medium regardless of disease expression. (C) Comparison of the surface marker expression of apical and basolateral EVs in healthy and asthmatic subjects. $n = 3$ in each group, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. EV—extracellular vesicle; ns—not significant; RFU—relative fluorescent units.

3.3. Apically and Basolaterally Released EVs Show Distinct RNA Cargo Composition

Small RNAs were isolated from EVs retrieved from the apical and basolateral compartments of airway epithelial air–liquid interface cultures from healthy and asthmatic subjects (each $n = 3$), and were further analyzed by small RNA sequencing. All libraries exhibited a minimum of 7.5 million uniquely mapped reads and were thus comparable in efficiency. RNA composition was determined by counting the percentages of reads mapped to different species of RNA, such as rRNAs, long-non-coding RNAs (lncRNAs), miRNAs, mRNAs, and piRNAs. Our analysis showed a significant difference in the composition of RNA subtypes between apical and basolateral EV populations. Apical EVs contained comparable proportions of miRNAs (37.3%) and lncRNAs (33.3%) as the most prominent fractions, while basolateral EVs contained miRNAs only at a percentage of 2.3% and were rather dominated by a high percentage of lncRNAs (50.5%; Supplementary Figure S1).

Further focusing on miRNAs composition, apical and basolateral vesicles could be clearly separated from each other as two distinct populations in a principal component analysis. Moreover, in each of these populations, two clearly different clusters representing either the healthy or the asthmatic condition were clearly distinguishable (Figure 4). When looking at differences in miRNAs composition between apical and basolateral EVs in all 12 samples, we found 236 significantly differentially expressed miRNAs between the two subgroups, of which 151 miRNAs were more and 85 miRNAs less abundant in the

apical compared to the basolateral EVs (Figure 5A,B). More frequent miRNAs in the apical population were assigned to different miRNA families (groups of miRNAs with a high sequence similarity deriving from distinct genomic loci) than those found at higher levels in the basolateral EVs (Figure 5C,D). In apically secreted EVs, all family members of the miR-30 (6/6) and the miR-941 (5/5) family were present, pointing to a significant association of these miRNAs to processes specifically important to the apical environment. Additionally, 10 out of 12 miRNAs from the let-7, 6 out of 8 of the miR-10, and 5 out of 8 of the miR-17 families were present. On the basolateral side, the most represented miRNA family was the miR-320 family with 7 out of 8 members, followed by the miR-181 (4/6), the miR-550 (3/5), the let-7 (3/12), and the miR-154 (3/19) families.

We then investigated whether these differentially distributed EV miRNAs could be linked to specific biological effects by evaluating the KEGG pathways and biological functions predicted to be affected by them, according to the two databases, DIANA-miRPath v3.0 and TAM 2.0. As shown in Figure 6, the significantly associated KEGG pathways of the preferentially apically secreted miRNAs included, among others, the mTOR and MAPK signaling pathways. Interestingly, miRNAs on the basolateral side were associated with processes of T and B cell receptor signaling, along with others (Figure 6A). Thus, associated KEGG pathways deviated in apically and basolaterally secreted EVs, suggesting different downstream functions for EVs depending on the site of action that are linked to diverse potential biological functions, as shown in Figure 6B. Significantly enriched target regulatory proteins can be found in Figure 6C. The results showed very distinct differences in miRNA composition as well as in downstream targeted proteins and pathways of vesicular RNA, depending on their cell side of secretion.

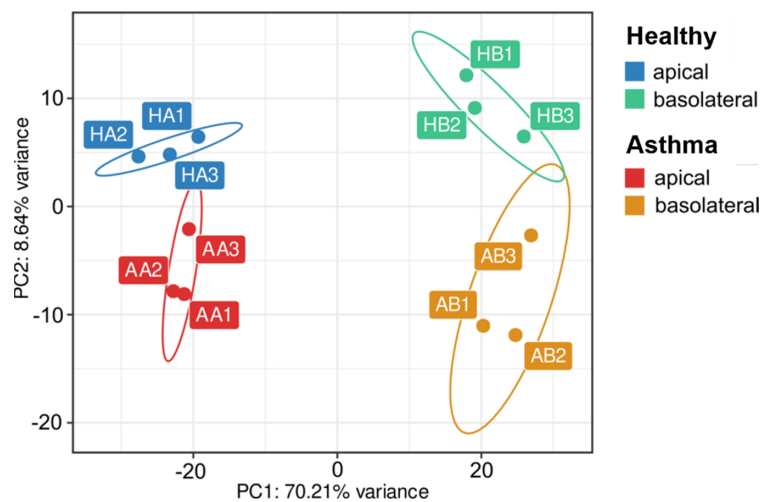


Figure 4. PCA plot depicting the clustering of 12 EV samples according to their miRNA cargo depending on disease condition and cellular side of EV release. PCA—principal component analysis; EV—extracellular vesicle.

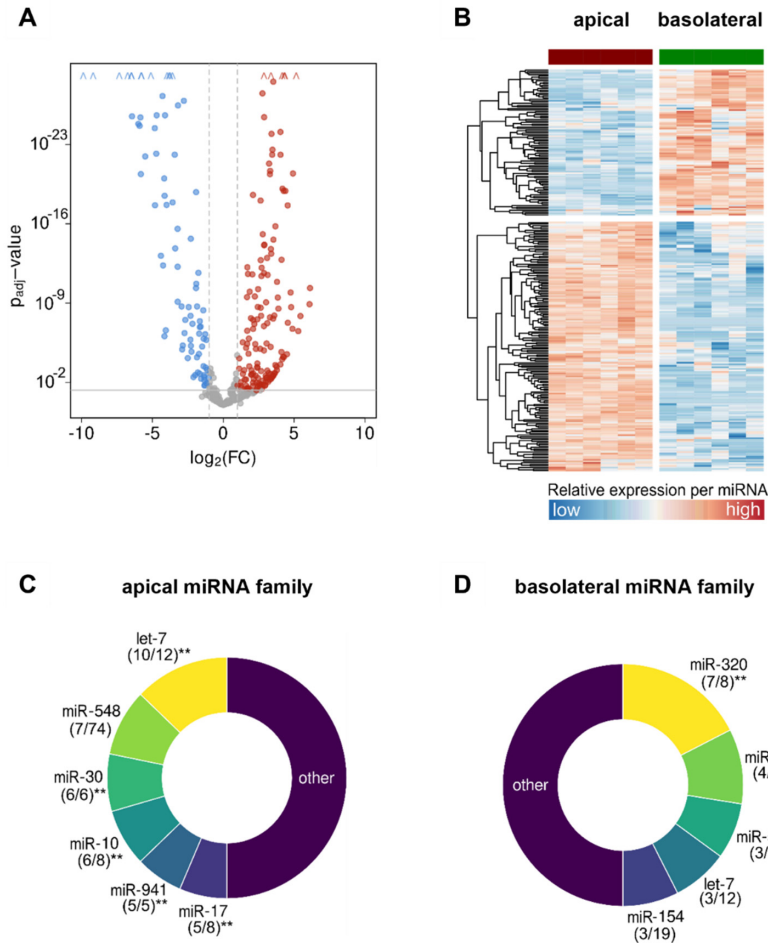
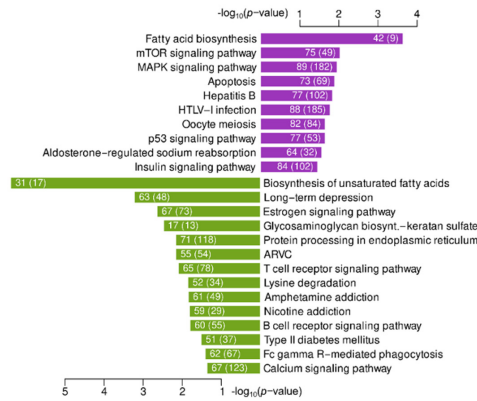
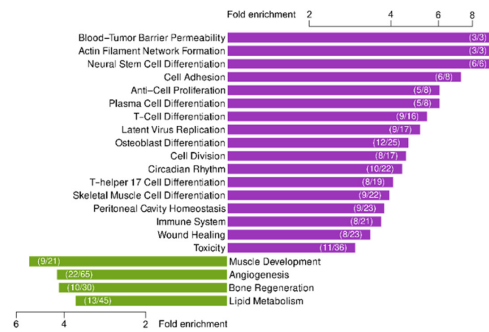


Figure 5. Differential expression analysis of vesicular miRNAs in apical versus basolateral compartments of bronchial epithelial cell cultures. **(A,B)** Volcano plot and heat map showing the differentially expressed miRNAs within EVs secreted to the apical versus basolateral compartment at $p_{adj} < 0.05$ and $FC \geq 2$, and **(C,D)** donut charts showing the distribution of the mainly represented miRNA families in both compartments. Digits in brackets depict the number of enriched miRNA family members out of the total number of miRNAs belonging to the respective family, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, miRNA—microRNA; EV—extracellular vesicle; FC—fold change.

A Enriched KEGG pathways: apical vs. basolateral



B Enriched biological functions: apical vs. basolateral



C Enriched target proteins: apical vs. basolateral

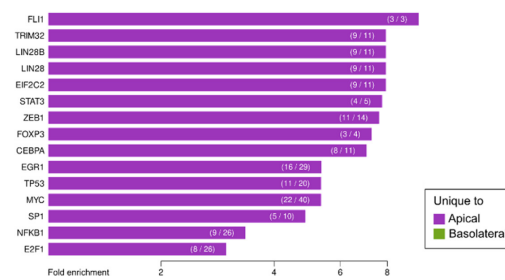


Figure 6. Functional analysis of miRNAs differentially expressed in EVs released by bronchial epithelial cells to the apical versus basolateral compartments. (A) KEGG pathway and (B) biological functions analyses of differentially expressed miRNAs in both compartments and (C) target proteins potentially regulated by the differentially expressed miRNAs. EV—extracellular vesicle.

3.4. Small RNA Cargo Is Altered in Vesicles from Asthmatic Subjects

We additionally checked whether EVs derived from epithelial cells of healthy and asthmatic subjects differed in their miRNA expression profiles regardless of the secretion side, and found overall 12 miRNAs differentially represented in the two groups, with 6 being up- and 6 down-regulated in the vesicles of asthmatics (Supplementary Figure S2). A more complex picture was obtained when additionally taking the EV secretion side into account (Figure 7A). In apical EVs, 32 miRNAs showed a significant difference in abundances in the two groups, 29 of which were up- and 3 of which were down-regulated in the vesicles of asthmatics (Figure 6A, left). On the basolateral side, 23 miRNAs with a divergent expression profile were detected, 9 being significantly upregulated and 14 being downregulated in asthmatics (Figure 7A, right), with 5 out of 12 being family members of the let-7 family and with 3 out of 8 being members of the miR-10 family (Figure 6C). Specifically, the miR-9 family showed significant differences between the healthy and the asthmatic phenotype origin in both EV secretion compartments (Figure 7B,C). The KEGG pathway terms and biological functions associated with differentially abundant miRNAs in apical and basolateral EVs from asthmatic versus healthy subject’s bronchial epithelial cell cultures are shown in Supplementary Figure S3A,B, respectively. Enriched associated diseases included a variety of inflammatory conditions, among them asthma, especially when the analysis was based on the signals from the basolateral side (Supplementary Figure S3C). Significantly enriched target regulatory proteins in asthmatic subjects were HIF1A and NFKB1 (Supplementary Figure S3D). The target genes of the EV-derived miRNAs differentially expressed between both conditions are shown in Supplementary Figure S4A,B, associated with some of the most significant pathways.

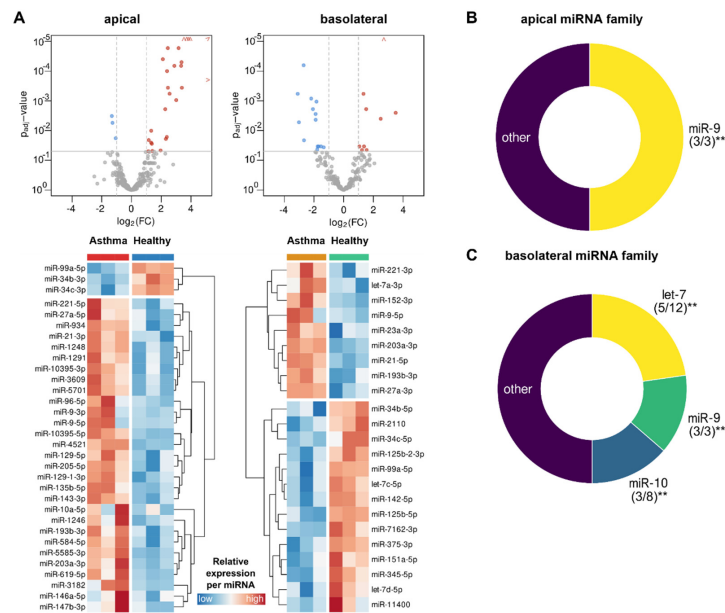


Figure 7. Differential miRNA expression analysis per disease condition (asthma versus healthy) and

compartment (apical and basolateral). (A) Volcano plot and heat map of differentially expressed miRNAs of asthma versus healthy comparison in EVs from the apical (left) and basolateral (right) cell culture compartments at $p_{\text{adj}} < 0.05$ and $\text{FC} \geq 2$, and (B,C) donut charts showing the distribution of the mainly represented miRNA families in the asthma versus healthy comparison in both compartments. Digits in brackets depict the number of enriched miRNA family members out of total number of miRNAs belonging to the respective family, ** $p < 0.01$. miRNA—microRNA; EV—extracellular vesicle; FC—fold change.

4. Discussion

In the past decade, the role of EVs as communication structures between neighboring or remote cells has been increasingly recognized. The presence of EV-associated RNAs has been attested by next-generation sequencing in numerous body fluids, including blood plasma and sputum [35]. Specific miRNA signatures hold the potential for being used as fingerprints, helping to identify phenotypes or states of diseases and gain more insights into their underlying pathological mechanisms. Plenty of studies have analyzed miRNA profiles in patients with asthma compared to subjects not affected by this disease, some with a specific focus on the role of airway epithelial cells in EV-related miRNA generation [36]. However, to date, no investigations have explicitly distinguished between EV RNA profiles in polarized airway epithelial cells depending on their direction of secretion. Hence, no distinction has been made between their supposed location of action being either the outer epithelial environment, e.g., sputum, or compartments within the body, such as lung interstitium, tissue, or even blood plasma.

According to the results of the NanoFCM particle characterization, EV populations isolated from the apical cell side were mainly composed of vesicles with diameters matching the size range of the exosomes. Contrarily, on the basolateral cell side, median vesicle diameters were noticeably larger, consistent rather with the size of the microvesicles than with the exosomes [37,38]. FACS analysis for exosomal marker proteins revealed the presence of exosomes in both apical and basolateral samples, although apical EVs seemed to express exosomal marker proteins to a greater extent than the basolateral vesicles.

In our study, we were able to observe distinct differences in EV-associated miRNA patterns secreted by bronchial epithelial cells from healthy and asthmatic subjects, depending on the side of EV secretion. Interestingly, secretion patterns of EV miRNAs varied more distinctly based on the side of secretion than the pathophysiological condition. This knowledge might be essential for future investigations into potential biomarkers analyzed in different compartments such as sputum and plasma. Bartel et al. recently published a PCR-based study comparing the expression of specific miRNAs in EVs secreted by normal human bronchial epithelial cells to the basolateral and apical cell side. Interestingly, there were some notable overlaps in miRNAs, including miR-34b and miR-21 preferentially identified on the apical side, while other differentially expressed miRNAs in this study could not be observed in our analysis [39]. Notably, serum levels of miR-21 have been previously reported to be an efficient biomarker for asthma patients [40]. Further, treatment with a miR-21-specific antagomir was demonstrated to reduce airway hyper-responsiveness and restore steroid sensitivity in mice with ovalbumin-induced allergic airway inflammation [41]. The differentially expressed miR-10 on the apical side was found to regulate the proliferation of airway smooth muscle cells by suppressing the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway [42]. Moreover, MAPK and mTOR signaling pathways were enriched as potential targets for differentially expressed miRNAs on the apical side. Activation of the mTOR pathway has been shown to lead to tight junction susceptibility and epithelial–mesenchymal transition (EMT), which can in turn play an essential role in airway remodeling in asthma pathogenesis [43,44]. Accordingly, inhibition of MAPK signaling pathway led to a significant reduction in the allergic inflammation of the airways [45]. In contrast, miR-221, which was downregulated on the basolateral side, was shown to play a unique role in controlling the differentiation of Th17 and regulatory T (Treg) cells through targeting SOCS-1 (suppressor of cytokine signaling 1) [46]. Likewise, T and B cell

receptor signaling pathways have been associated with miRNAs dominantly secreted to the basolateral side. These pathways have been intensively investigated as key regulators of the antigen recognition in the adaptive immune response and have been utilized as key therapy targets in asthmatic patients [47,48]. Taken together, our observations strongly indicate a compartmentalized packaging and side-specific release of EVs by bronchial epithelial cells, pointing to site-specific functions of these structures at least partially mediated by their miRNA cargo.

While differences in miRNA profiles from apical versus basolateral sides were more pronounced, a number of significant alterations in the levels of certain EV-associated miRNAs (or their families) were also observed between cells of an asthmatic or healthy origin, either at one or at both sides. For example, EV miRNAs belonging to the miR-9 family were upregulated in both apical and basolateral vesicles of asthmatic patients. Increased levels of miR-9 have already been linked to steroid-resistant and neutrophilic, but not eosinophilic asthma [49]. Interestingly, Bazzoni et al. observed a miR-9-dependent inhibition of NF κ B1 transcription in human neutrophils and monocytes exposed to proinflammatory signals, suggesting that the rapid induction of miR-9 operates as a feedback control of NF κ B1-dependent cellular response [50]. Accordingly, NF κ B1 was found among the predicted targets of miRNAs, specifically present in asthmatic samples in our investigation. Several independent studies further identified enhanced NF κ B-pathway activation in asthmatic tissue [51].

Interestingly enough, miR-34b and miR-34c were downregulated when associated with EVs released by epithelial cells from asthmatic subjects at both compartments, even though they were generated from opposite DNA strands, dependent on the compartment. The levels of miR-34b/c have been found to be significantly lowered in murine mouse models of ovalbumin-induced allergic airway inflammation and have been suggested to play a regulatory role in the activation of the Nrf2-/ARE pathway [52]. Disruption of Nrf2-expression augmented airway inflammation and hyperresponsiveness [53–55]. Moreover, in a clinical study by Solberg et al., treatment with corticosteroids resulted in increased levels of miR-34b/c in BALF of patients suffering from asthma, while the administration of IL-13 was able to repress its expression in an air–liquid interface bronchial epithelial cell culture model [56]. This suggests a protective role of miR-34b/c against allergic and asthmatic cellular responses, and hints toward a diagnostic potential of the miR-34 family.

Generally, miRNA of the let-7 family showed a higher expression in apical compared to basolateral EVs. However, in basolateral EVs, the let-7 family was the miRNA subgroup with the largest divergence between asthmatic and healthy subjects, with 5 out of 12 total family members showing significant alterations, while on the apical side, no differences in expression were found. In contrast to this finding, Levänen et al. described significant variations in 16 miRNA, including the let-7 and miR-200 families and miR-99 (as seen in our study) in BALF [24]. Interestingly, while let-7c and let-7d were downregulated, let-7a showed an upregulation in EVs released by cells from asthmatics. miRNAs of the let-7 family are among the most intensely studied miRNAs, with two studies proposing the exosome-mediated transfer of let-7 miRNAs to various immune cells as a suppressive mechanism used by Treg cells (let-7d), and reporting the inhibition of Treg cell generation and function by these miRNAs (let-7i) [57,58].

There are some limitations to this study that should be mentioned. One limitation is the small sample size, yet the major goal of the study was a general overview of EV fingerprints in different cellular compartments, rather than assessing the function of singular EV miRNAs. For a more detailed analysis, further studies investigating the role of single miRNA are required to give the data a clinical significance. Another limitation is that there was no information available about the clinical details and/or the asthmatic phenotype of the patients whose cells were involved in the study. Lastly, as miRNAs can be secreted by almost every cell type, the overall in vivo situation can largely dissociate from in vitro observed conditions. Dissecting the contribution of individual cell types in

the production of specific miRNA is, on the other hand, essential to understand their role in disease pathogenesis.

In summary, in this study, we provide a general overview of miRNA-composition in EVs secreted by airway epithelial cells. We were able to reveal distinctly differing miRNA expression profiles depending on the vesicle side of secretion and disease condition. This emphasizes the importance of taking the vesicle site of action into consideration for further research to which the data presented in this study provide a sound basis.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biomedicines10030622/s1>. Supplementary Figure S1: Comparison of EV total RNA composition between basolateral and apical compartments regardless of disease expression in percentage of reads mapped to indicated RNA species. EV—extracellular vesicle; rRNA—ribosomal RNA; mRNA—messenger RNA; lncRNAs—long-non-coding RNAs; piRNA—PIWI-associated RNAs; miRNA—microRNA. Supplementary Figure S2: Differential miRNA expression analysis per disease condition (asthma versus healthy) regardless of compartment (apical and basolateral). (A) Volcano plot and (B) heat map exhibiting the differentially expressed miRNAs of the asthma versus healthy comparison at $p_{\text{adj}} < 0.05$ and $\text{FC} \geq 2$. miRNA—microRNA; FC—fold change. Supplementary Figure S3: Functional analysis of the differentially expressed miRNAs in the asthma versus healthy comparison in each apical and basolateral compartment. (A) KEGG pathway and (B) biological function analyses of differentially expressed vesicular miRNAs of asthma versus healthy in each apical and basolateral compartment, (C) enriched diseases, and (D) target proteins potentially regulated by the differentially expressed miRNAs. miRNA—microRNA. Supplementary Figure S4: mRNA—miRNA network analysis involving differentially regulated miRNAs of the asthma versus healthy comparison in (A) the apical and (B) the basolateral compartments associated with biological pathways of potential target genes. miRNA—microRNA.

Author Contributions: H.G., D.P.P., V.E.M.S. and F.A.—designed the experiments. V.E.M.S.—isolated the material and performed EV and RNA isolation. F.A.—prepared the material for sequencing. A.N. and T.S.—implemented sequencing analysis. C.P., B.A.A. and E.P.v.S.—implemented NanoFCM analysis. V.E.M.S. and L.H.—performed FACS analysis. C.T. and F.A.—performed the bioinformatics analysis. V.E.M.S., H.G. and F.A.—drafted the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the German Center for Lung Research (DZL); the German Academic Exchange Service (DAAD; F.A., personal reference number: 91726294); the HessenFonds, World University Service (WUS; F.A.); the Hessen State Ministry for Higher Education, Research and the Arts (HMWK; F.A.); and the German Research Foundation (DFG; E.P.v.S., B.A.A. and T.S., Grant 512416910386-GRK 2573/1).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study and underlying raw data are available on reasonable request from the corresponding author.

Acknowledgments: We would like to thank our funding institutions.

Conflicts of Interest: Authors declared no conflict of interest.

References

1. GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators; Vos, T.; Abajobir, A.A.; Abate, K.H.; Abbafati, C.; Abbas, K.M.; Abd-Allah, F.; Abdulkader, R.S.; Abdulle, A.M.; Abebo, T.A.; et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet* **2017**, *390*, 1211–1259. [[CrossRef](#)]
2. WHO. SGlobal Health Estimates: Life Expectancy and Leading Causes of Death and Disability. 2022. Available online: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates> (accessed on 7 January 2022).
3. Vieira Braga, F.A.; Kar, G.; Berg, M.; Carpaij, O.A.; Polanski, K.; Simon, L.M.; Brouwer, S.; Gomes, T.; Hesse, L.; Jiang, J.; et al. A cellular census of human lungs identifies novel cell states in health and in asthma. *Nat. Med.* **2019**, *25*, 1153–1163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Mathivanan, S.; Ji, H.; Simpson, R.J. Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *J. Proteom.* **2010**, *73*, 1907–1920. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Caby, M.P.; Lankar, D.; Vincendeau-Scherrer, C.; Raposo, G.; Bonnerot, C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int. Immunol.* **2005**, *17*, 879–887. [[CrossRef](#)]
6. Pisitkun, T.; Shen, R.F.; Knepper, M.A. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 13368–13373. [[CrossRef](#)]
7. Admyre, C.; Grunewald, J.; Thyberg, J.; Bripenäck, S.; Tornling, G.; Eklund, A.; Scheynius, A.; Gabrielsson, S. Exosomes with major histocompatibility complex class II and co-stimulatory molecules are present in human BAL fluid. *Eur. Respir. J.* **2003**, *22*, 578–583. [[CrossRef](#)]
8. György, B.; Szabó, T.G.; Pásztói, M.; Pál, Z.; Miskák, P.; Aradi, B.; László, V.; Pállinger, É.; Pap, E.; Kittel, Á.; et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: Emerging role of extracellular vesicles. *Cell. Mol. Life Sci.* **2011**, *68*, 2667–2688. [[CrossRef](#)]
9. Cocucci, E.; Meldolesi, J. Ectosomes and exosomes: Shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends Cell Biol.* **2015**, *25*, 364–372. [[CrossRef](#)]
10. Heijnen, H.F.G.; Schiel, A.E.; Fijnheer, R.; Geuze, H.J.; Sixma, J.J. Activated Platelets Release Two Types of Membrane Vesicles: Microvesicles by Surface Shedding and Exosomes Derived from Exocytosis of Multivesicular Bodies and α -Granules. *Blood* **1999**, *94*, 3791–3799. [[CrossRef](#)]
11. Théry, C.; Ostrowski, M.; Segura, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **2009**, *9*, 581–593. [[CrossRef](#)]
12. Mathieu, M.; Névo, N.; Jouve, M.; Valenzuela, J.I.; Maurin, M.; Verweij, F.J.; Palmulli, R.; Lankar, D.; Dingli, F.; Loew, D.; et al. Specificities of exosome versus small ectosome secretion revealed by live intracellular tracking of CD63 and CD9. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 4389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Großhans, H.; Filipowicz, W. The expanding world of small RNAs. *Nature* **2008**, *451*, 414–416. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Bartel, D.P. MicroRNAs. *Cell* **2004**, *116*, 281–297. [[CrossRef](#)]
15. Valadi, H.; Ekström, K.; Bossios, A.; Sjöstrand, M.; Lee, J.J.; Lötvall, J.O. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9*, 654–659. [[CrossRef](#)]
16. Locksley, R.M. Asthma and Allergic Inflammation. *Cell* **2010**, *140*, 777–783. [[CrossRef](#)]
17. Potaczek, D.P.; Miethe, S.; Schindler, V.; Alhamdan, F.; Garn, H. Role of airway epithelial cells in the development of different asthma phenotypes. *Cell. Signal.* **2020**, *69*, 109523. [[CrossRef](#)]
18. Torregrosa Paredes, P.; Esser, J.; Admyre, C.; Nord, M.; Rahman, Q.K.; Lukic, A.; Rådmark, O.; Grönneberg, R.; Grunewald, J.; Eklund, A.; et al. Bronchoalveolar lavage fluid exosomes contribute to cytokine and leukotriene production in allergic asthma. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **2012**, *67*, 911–919. [[CrossRef](#)]
19. Wahlund, C.J.E.; Eklund, A.; Grunewald, J.; Gabrielsson, S. Pulmonary Extracellular Vesicles as Mediators of Local and Systemic Inflammation. *Front. Cell Dev. Biol.* **2017**, *5*, 39. [[CrossRef](#)]
20. Nagano, T.; Katsurada, M.; Dokuni, R.; Hazama, D.; Kiriu, T.; Umezawa, K.; Kobayashi, K.; Nishimura, Y. Crucial Role of Extracellular Vesicles in Bronchial Asthma. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2589. [[CrossRef](#)]
21. Alashkar Alhamwe, B.; Miethe, S.; Pogge von Strandmann, E.; Potaczek, D.P.; Garn, H. Epigenetic Regulation of Airway Epithelium Immune Functions in Asthma. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1747. [[CrossRef](#)]
22. Kulshreshtha, A.; Ahmad, T.; Agrawal, A.; Ghosh, B. Proinflammatory role of epithelial cell-derived exosomes in allergic airway inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2013**, *131*, 1194–1203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. van den Berge, M.; Taseña, H. Role of microRNAs and exosomes in asthma. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **2019**, *25*, 87–93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Levänen, B.; Bhakta, N.R.; Torregrosa Paredes, P.; Barbeau, R.; Hiltbrunner, S.; Pollack, J.L.; Sköld, C.M.; Svartengren, M.; Grunewald, J.; Gabrielsson, S.; et al. Altered microRNA profiles in bronchoalveolar lavage fluid exosomes in asthmatic patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2013**, *131*, 894–903. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Enderle, D.; Spiel, A.; Coticchia, C.M.; Berghoff, E.; Mueller, R.; Schlumpberger, M.; Sprenger-Haussels, M.; Shaffer, J.M.; Lader, E.; Skog, J.; et al. Characterization of RNA from exosomes and other extracellular vesicles isolated by a novel spin column-based method. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0136133. [[CrossRef](#)]
26. Benedikter, B.J.; Volgers, C.; van Eijck, P.H.; Wouters, E.F.M.; Savelkoul, P.H.M.; Reynaert, N.L.; Haenen, G.R.M.M.; Rohde, G.G.U.; Weseler, A.R.; Stassen, F.R.M. Cigarette smoke extract induced exosome release is mediated by depletion of exofacial thiols and can be inhibited by thiol-antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* **2017**, *108*, 334–344. [[CrossRef](#)]
27. Martin, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. J* **2011**, *17*, 10. [[CrossRef](#)]
28. Li, H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. *arXiv Preprint* **2013**, arXiv:1303.3997.
29. Li, H.; Handsaker, B.; Wysoker, A.; Fennell, T.; Ruan, J.; Homer, N.; Marth, G.; Abecasis, G.; Durbin, R. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 2078–2079. [[CrossRef](#)]
30. Love, M.I.; Huber, W.; Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **2014**, *15*, 550. [[CrossRef](#)]
31. Marini, F.; Binder, H. PcaExplorer: An R/Bioconductor package for interacting with RNA-seq principal components. *BMC Bioinform.* **2019**, *20*, 331. [[CrossRef](#)]

32. Vlachos, I.S.; Zagganas, K.; Paraskevopoulou, M.D.; Georgakilas, G.; Karagkouni, D.; Vergoulis, T.; Dalamagas, T.; Hatzigeorgiou, A.G. DIANA-miRPath v3.0: Deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, W460–W466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Li, J.; Han, X.; Wan, Y.; Zhang, S.; Zhao, Y.; Fan, R.; Cui, Q.; Zhou, Y. TAM 2.0: Tool for MicroRNA set analysis. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, W180–W185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Hamberg, M.; Backes, C.; Fehlmann, T.; Hart, M.; Meder, B.; Meese, E.; Keller, A. MiRTargetLink—miRNAs, genes and interaction networks. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 564. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Turchinovich, A.; Drapkina, O.; Tonevitsky, A. Transcriptome of extracellular vesicles: State-of-the-art. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 202. [[CrossRef](#)]
36. Alashkar Alhamwe, B.; Potaczek, D.P.; Mieth, S.; Alhamdan, F.; Hintz, L.; Magomedov, A.; Garn, H. Extracellular Vesicles and Asthma—More Than Just a Co-Existence. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 4984. [[CrossRef](#)]
37. Mohan, A.; Agarwal, S.; Clauss, M.; Britt, N.S.; Dhillon, N.K. Extracellular vesicles: Novel communicators in lung diseases. *Respir. Res.* **2020**, *21*, 1–21. [[CrossRef](#)]
38. Pastor, L.; Vera, E.; Marin, J.M.; Sanz-Rubio, D. Extracellular Vesicles from Airway Secretions: New Insights in Lung Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 583. [[CrossRef](#)]
39. Bartel, S.; La Grutta, S.; Cilluffo, G.; Perconti, G.; Bongiovanni, A.; Giallongo, A.; Behrends, J.; Kruppa, J.; Hermann, S.; Chiang, D.; et al. Human airway epithelial extracellular vesicle miRNA signature is altered upon asthma development. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **2020**, *75*, 346–356. [[CrossRef](#)]
40. Sawant, D.; Yao, W.; Wright, Z.; Sawyers, C.; Tepper, R.; Gupta, S.; Kaplan, M.; Dent, A. Serum MicroRNA-21 as a Biomarker for Allergic Inflammatory Disease in Children. *MicroRNA* **2015**, *4*, 36–40. [[CrossRef](#)]
41. Kim, R.Y.; Horvat, J.C.; Pinkerton, J.W.; Starkey, M.R.; Essilfie, A.T.; Mayall, J.R.; Nair, P.M.; Hansbro, N.G.; Jones, B.; Haw, T.J.; et al. MicroRNA-21 drives severe, steroid-insensitive experimental asthma by amplifying phosphoinositide 3-kinase-mediated suppression of histone deacetylase 2. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2017**, *139*, 519–532. [[CrossRef](#)]
42. Hu, R.; Pan, W.; Fedulov, A.V.; Jester, W.; Jones, M.R.; Weiss, S.T.; Panettieri, R.A.; Tantisira, K.; Lu, Q. MicroRNA-10a controls airway smooth muscle cell proliferation via direct targeting of the PI3 kinase pathway. *FASEB J.* **2014**, *28*, 2347–2357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Saito, M.; Mitani, A.; Ishimori, T.; Miyashita, N.; Isago, H.; Mikami, Y.; Noguchi, S.; Tarui, M.; Nagase, T. Active mTOR in lung epithelium promotes epithelial-mesenchymal transition and enhances lung fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2020**, *62*, 699–708. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Gong, J.H.; Cho, I.H.; Shin, D.; Han, S.Y.; Park, S.H.; Kang, Y.H. Inhibition of airway epithelial-to-mesenchymal transition and fibrosis by kaempferol in endotoxin-induced epithelial cells and ovalbumin-sensitized mice. *Lab. Investig.* **2014**, *94*, 297–308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Alam, R.; Gorska, M.M. Mitogen-activated protein kinase signalling and ERK1/2 bistability in asthma. *Clin. Exp. Allergy* **2011**, *41*, 149–159. [[CrossRef](#)]
46. Guan, Y.; Ma, Y.; Tang, Y.; Liu, X.; Zhao, Y.; An, L. MiRNA-221-5p suppressed the Th17/Treg ratio in asthma via RORyt/Foxp3 by targeting SOCS1. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* **2021**, *17*, 123. [[CrossRef](#)]
47. Minervina, A.; Pogorelyy, M.; Mamedov, I. T-cell receptor and B-cell receptor repertoire profiling in adaptive immunity. *Transpl. Int.* **2019**, *32*, 1111–1123. [[CrossRef](#)]
48. Foth, S.; Völkel, S.; Bauersachs, D.; Zemlin, M.; Skevaki, C. T cell Repertoire during Ontogeny and Characteristics in Inflammatory Disorders in Adults and Childhood. *Front. Immunol.* **2021**, *11*, 3826. [[CrossRef](#)]
49. Li, J.J.; Tay, H.L.; Maltby, S.; Xiang, Y.; Evers, F.; Hatchwell, L.; Zhou, H.; Toop, H.D.; Morris, J.C.; Nair, P.; et al. MicroRNA-9 regulates steroid-resistant airway hyperresponsiveness by reducing protein phosphatase 2A activity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2015**, *136*, 462–473. [[CrossRef](#)]
50. Bazzoni, F.; Rossato, M.; Fabbri, M.; Gaudiosi, D.; Mirolo, M.; Mori, L.; Tamassia, N.; Mantovani, A.; Cassatella, M.A.; Locati, M. Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 5282–5287. [[CrossRef](#)]
51. Edwards, M.R.; Bartlett, N.W.; Clarke, D.; Birrell, M.; Belvisi, M.; Johnston, S.L. Targeting the NF- κ B pathway in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol. Ther.* **2009**, *121*, 1–13. [[CrossRef](#)]
52. Ho, C.Y.; Lu, C.C.; Weng, C.J.; Yen, G.C. Protective Effects of Diallyl Sulfide on Ovalbumin-Induced Pulmonary Inflammation of Allergic Asthma Mice by MicroRNA-144, -34a, and -34b/c-Modulated Nrf2 Activation. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 151–160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Rangasamy, T.; Guo, J.; Mitzner, W.A.; Roman, J.; Singh, A.; Fryer, A.D.; Yamamoto, M.; Kensler, T.W.; Tuder, R.M.; Georas, S.N.; et al. Disruption of Nrf2 enhances susceptibility to severe airway inflammation and asthma in mice. *J. Exp. Med.* **2005**, *202*, 47–59. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Wakabayashi, N.; Slocum, S.L.; Skoko, J.J.; Shin, S.; Kensler, T.W. When NRF2 Talks, Who's Listening? *Antioxid. Redox Signal.* **2010**, *13*, 1649–1663. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Malhotra, D.; Portales-Casamar, E.; Singh, A.; Srivastava, S.; Arenillas, D.; Happel, C.; Shyr, C.; Wakabayashi, N.; Kensler, T.W.; Wasserman, W.W.; et al. Global mapping of binding sites for Nrf2 identifies novel targets in cell survival response through chip-seq profiling and network analysis. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 5718–5734. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Anhang

56. Solberg, O.D.; Ostrin, E.J.; Love, M.I.; Peng, J.C.; Bhakta, N.R.; Hou, L.; Nguyen, C.; Solon, M.; Nguyen, C.; Barczak, A.J.; et al. Airway epithelial miRNA expression is altered in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2012**, *186*, 965–974. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Okoye, I.S.; Coomes, S.M.; Pelly, V.S.; Czieso, S.; Papayannopoulos, V.; Tolmachova, T.; Seabra, M.C.; Wilson, M.S. MicroRNA-Containing T-Regulatory-Cell-Derived Exosomes Suppress Pathogenic T Helper 1 Cells. *Immunity* **2014**, *41*, 89–103. [[CrossRef](#)]
58. Kimura, K.; Hohjoh, H.; Fukuoka, M.; Sato, W.; Oki, S.; Tomi, C.; Yamaguchi, H.; Kondo, T.; Takahashi, R.; Yamamura, T. Circulating exosomes suppress the induction of regulatory T cells via let-7i in multiple sclerosis. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 17. [[CrossRef](#)]

7.4 Verzeichnis akademischer Lehrer

Prof. Dr. Detlef Bartsch

Prof. Dr. Stefan Bauer

Prof. Dr. Annette Becker

Prof. Dr. Katja Becker

Prof. Dr. Siegfried Bien

Prof. Dr. Sven Bogdan

Prof. Dr. Frank Czubayko

Dr. Barbara Fritz

Prof. Dr. Susanne Fuchs-Winkelmann

Prof. Dr. Max Geraedts

Prof. Dr. Thomas Gress

Prof. Dr. Dr. Christiane Hey

Prof. Dr. Rainer Hofmann

Prof. Dr. Joachim Hoyer

Prof. Dr. Walter Werner Hundt

Dr. Andreas Jerrentrup

Prof. Dr. Doktor Peter Herbert Kann

Prof. Dr. Ralf Kinscherf

Prof. Dr. Tilo Kircher

Prof. Dr. Roland Lill

Prof. Dr. Michael Lohoff

Prof. Dr. Andreas Mahnken

Prof. Dr. Rolf Felix Maier

Prof. Dr. Andreas Neubauer

Prof. Dr. Bernhard Neumüller

Anhang

Prof. Dr. Christopher Nimsky
Prof. Dr. Dominik Oliver
Dr. Egbert Opitz
Prof. Dr. Axel Frieder Pagenstecher
Dr. Christian-Dominik Peterlein
Prof. Dr. Ardawan Julian Rastan
Prof. Dr. Harald Renz
Prof. Dr. Reinald Repp
Prof. Dr. Manfred Riße
Prof. Dr. Volker Roelcke
Prof. Dr. Steffen Ruchholtz
Prof. Dr. Marco Bernhard Rust
Prof. Dr. Irmtraut Sahmland
Prof. Dr. Bernhard Schieffer
Prof. Dr. Joachim Schneider
Dr. Carmen Schwee
Dr. Carola Seifert
Prof. Dr. Walter Sekundo
Dr. Bernd Stahl
Prof. Dr. Boris Stuck
Prof. Dr. Kati Thieme
Prof. Dr. Lars Timmermann
Prof. Dr. Claus Vogelmeier
Prof. Dr. Uwe Armin Georg Wagner
Dr. Reiner Westermann
Dr. Christian Wrocklage
Prof. Dr. Hinnerk Friedrich Wilhelm Wulf

7.5 Danksagung

Mein Dank gilt dem gesamten Team der AG Garn für die intensive und freundliche Betreuung und die zuverlässige Unterstützung bei jeglichen Fragen. Hier möchte ich insbesondere Dr. Fahd Alhamdan danken, der mit mir das Projekt „Side-directed release of differential extracellular vesicles-associated microRNA profiles from bronchial epithelial cells of healthy and asthmatic subjects“ aufgebaut hat und insbesondere in der EV- und RNA-Isolation von großer Hilfe war. Darüber hinaus danke ich Dr. Clemens Thölken, der die bioinformatische Auswertung durchgeführt hat und damit einen wesentlichen Teil zu dieser Arbeit beigetragen hat. Außerdem danke ich Lukas Sturm, Kim Pauck und Dr. Birke Benedikter für die Unterstützung in der Durchführung der FACS Analyse, Dr. Verena von Bülow und Dr. Sarah Miethe für die tatkräftige Unterstützung und Einführung in die Zellkulturen sowie Dr. Bastian Dörsam, Dr. Christian Preußner und der gesamten AG Pogge von Strandmann für die Durchführung der NanoFCM Analysen sowie für die vielen Ratschläge in der EV Methodik. Ein besonderer Dank gilt natürlich meinem Doktorvater Prof. Holger Garn für die kontinuierliche, zuverlässige und herzliche Betreuung, die kreativen Freiräume sowie intensive Förderung und Unterstützung, die er mir über die Jahre entgegen brachte.

Abschließend möchte ich meiner Familie, meinen Freunden und meinem Partner Matthias danken, die mich während des Studiums und darüber hinaus immer unterstützten und motivierten