

Aus dem Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. J. Dötsch

**Untersuchung der Alveolarepithelzell Typ 2 (AT2) -
spezifischen Deletion von Krüppel-like-factor 4 (Klf4)
im murinen Modell der neonatalen Hyperoxie-
induzierten Lungenschädigung**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der ärztlichen Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von Hannah Steinbuch

aus Gießen

promoviert am 07.03.2025

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter Universitätsprofessor Dr. med. Dr. nat. med. M. A. Alejandre Alcazar
2. Gutachter Universitätsprofessor Dr. med. C.P. Pallasch

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

- Universitäts – Professor Dr. Jörg Dötsch,
- Prof. Dr. Dr. nat. med. Miguel A. Alejandre Alcázar,
- Frau Dr. nat. med. Jasmine Mohr,
- Dr. Dharmesh Hirani,
- Biologielaborantinnen Frau Christina Vohlen und
- Rebecca Wilke
- Stipendium Köln Fortune.

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Tierversuche wurden ohne meine Mitarbeit in der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Köln von Mitgliedern der Arbeitsgruppe Alcázar durchgeführt. Die asservierten Proben habe ich für meine Fragestellungen genutzt. Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente (Immunhistochemie, quantitative histomorphometrische Untersuchung der Alveolarisierung, RNA Isolierung, Bestimmung der RNA Quantität und Qualität, Synthese komplementärer Desoxyribonukleinsäure, quantitative Real-Time PCR und die statistische Auswertung) sind, nach entsprechender Anleitung durch Herrn Prof. Dr. Dr. nat. med. Miguel A. Alejandre Alcázar und Frau Dr. nat. med. Jasmine Mohr und mit Unterstützung der Biologielaborantinnen Frau Christina Vohlen und Rebecca Wilke, von mir selbst durchgeführt worden. Die Auswertung der erhobenen Datensätze erfolgte mithilfe des Statistikprogrammes Graphpad Prism von mir alleine. Für die histologische Auswertung habe ich mit den Programmen ImageJ und ImageScope nach Einarbeitung durch Dr. nat. med. Jasmine Mohr und Dr. Dharmesh Hirani eigenständig gearbeitet.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Zürich, den 07.03.2025

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. nat. med. M. A. Alejandro Alcazár und Herrn Prof. Dr. med. J. Dötsch für die ausgezeichnete Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken.

Dr. Jasmine Mohr und Dr. Dharmesh Hirani danke ich für die hervorragende Einführung in das Projekt und die wertvollen Ratschläge.

Ebenso danke ich Christina Vohlen und Rebekka Wilke für die geduldige Einarbeitung in die Bedienung der Geräte und in die verschiedenen Verfahren. Christina Vohlen danke ich auch für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Besonders möchte ich mich bei meinen Eltern, Schwestern und meinem Freund für die Ermöglichung des Medizinstudiums, das unermüdliche Interesse und die motivierenden Worte bei der Entstehung dieser Doktorarbeit bedanken.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
1. ZUSAMMENFASSUNG	11
2. EINLEITUNG	12
2.1 Frühgeburt	12
2.2 IRDS und BPD	16
2.3 Krüppel-like Faktoren	20
2.4 Vorarbeiten	24
2.5 Hypothese und Ziele	25
3. MATERIAL UND METHODEN	26
3.1 Material	26
3.11 Chemikalien und Reagenzien	26
3.12 Antikörper	27
3.13 Labormaterial	27
3.14 Geräte	27
3.15 Software	28
3.16 Kits	28
3.17 Primer	28
3.2 Methoden	30
3.21 Tierversuche	30
3.22 Histologische Untersuchungen	33
3.23 Genexpressionsanalyse	43
3.24 Statistische Auswertungen	50
4. ERGEBNISSE	51
4.1 Lungenstruktur	51
4.2 Matrixumbau (<i>remodeling</i>)	54
4.3 Differenzierung der AT2	58

5. DISKUSSION	66
5.1 Zusammenfassung der Kernaussagen	66
5.2 Ist das angewandte Modell passend für die BPD? (Modellkritik)	66
5.3 AT2-Verlust: Freund oder Feind?	72
5.4 Welche Rolle hat Klf4 in anderen Lungenerkrankungen?	73
5.5 Ausblick	74
6. LITERATURVERZEICHNIS	77
7. ANHANG	97
7.1 Abbildungsverzeichnis	97
7.2 Tabellenverzeichnis	97
7.3 Genetischer Hintergrund der Tiere	98

Abkürzungsverzeichnis

18srRNA	18S-ribosomale RNA
%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AcOH	Essigsäure
AK	Antikörper
ANS	Atemnotsyndrom
AQ-5	Aquaporin 5
α -SMA	<i>Alpha smooth muscle actin</i>
AT1	Alveolarepithelzelle Typ 1
AT2	Alveolarepithelzelle Typ 2
a.d.	Aqua dest. (destilliertes Wasser)
aqua bidest	HPLC behandeltes Wasser (Dnase frei)
BPD	Bronchopulmonale Dysplasie
bzw.	beziehungsweise
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
COL	Kollagen
COPD	chronisch obstruktive pulmonale Erkrankung
CPAP	<i>Continuous Positive Airway Pressure</i>
CRISPR – Cas	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i> und <i>CRISPR related protein</i>
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
DAPI	<i>4',6-Diamidin-2-phenylindol</i>
DEPC	Diethyldicarbonat
Dn	Desoxyribonuklein
DNase	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EC	Endothelzelle
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
Eppi	Mikroreaktionsgefäß/Eppendorf-Röhrchen
ES	Embryonale Stammzelle
EtOH	Ethanol, Alkohol
FACS	<i>fluorescent-activated cell sorting</i>
for	<i>forward</i>

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
<i>gam</i>	<i>goat-anti-mouse</i>
<i>gar</i>	<i>goat-anti-rabbit</i>
<i>garat</i>	<i>goat-anti-rat</i>
HCl	Salzsäure
H&E	Hämatoxylin-Eosin
Hopx	<i>Homeodomain only protein x</i>
HYX	Hyperoxie
Ig	Immunglobulin
IF	Immunfluoreszenz
IHC	Immunhistochemie
i.p.	intraperitoneal
iPS	Stammzelle aus somatischen Zellen
IUGR	Intrauterine Wachstumsrestriktion
IUR	Isotrop Uniform Randomisiert
IPF	Idiopathische Lungenfibrose
Klf4	<i>Krüppel-like factor 4</i>
Klf4 ^{+/-}	AT2-spezifische heterozygote Deletion von Klf4
mg	Milligramm
Min.	Minute(n)
ml	Milliliter
MLI	<i>Mean Linear Intercept</i>
MW	Mittelwert
NOX	Normoxie
O ₂	Sauerstoff
Oligo-dT-Primer	Oligo-desoxythymidin-Primer
P21	postnataler Tag 21
PAI-1	Plasminogen Aktivator Inhibitor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pdpn	Podoplanin
PFA	Paraformaldehyd
p.m.	post menstruationem
<i>real time qRT -PCR</i>	<i>real time</i> quantitative Reverse Transkriptase PCR
RAC	<i>Radial alveolar count</i>
rev	<i>reverse</i>
Rn	Ribonuklein
RNS	Ribonukleinsäure

U/Min.	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
Sek.	Sekunden
SFTP	Surfactantprotein
<i>sg RNA</i>	<i>single – guide RNA</i>
SSW	Schwangerschaftswoche
TAMRA	Carboxytetramethylrhodamin
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP- biotin nick end labeling</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ÜN	Über Nacht
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
Wdh.	Wiederholungen
vWF	von Willebrand Faktor
WT	Wildtyp
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>

1. Zusammenfassung

Hintergrund: Die Bronchopulmonale Dysplasie (BPD) ist eine neonatale chronische Lungenerkrankung des Frühgeborenen, die sich u.a. als Folge von Hyperoxie, mechanischer Beatmung sowie anderen schädlichen Einflüssen auf die noch sehr unreife Lunge entwickelt. Lungen von Kindern mit BPD sind durch eine verminderte Alveolenbildung, gestörte Angiogenese und Umbau der Lungenmatrix charakterisiert. Diese früh initiierten strukturellen Lungenveränderungen bestehen bis ins Erwachsenenalter und weisen auf eine eingeschränkte Regeneration der Lunge hin. Die Alveolarepithelzelle Typ 2 (AT2) produziert nicht nur Surfactantproteine sowie immunaktive Substanzen, sondern ist auch eine Progenitorzelle, welche sich infolge einer akuten Schädigung differenziert und somit Regeneration induzieren kann. Krüppel-like-factor 4 (Klf4) ist ein Transkriptionsfaktor, der neben der Stammzellfunktion auch das Überleben und die Differenzierung von Zellen reguliert.

Hypothese und Ziel der Arbeit: Da die Funktion von Klf4 in der Regulation der AT2 bisher ungeklärt ist, untersuche ich in meiner Promotionsarbeit die Hypothese, dass Klf4 das Überleben und die Differenzierung von AT2 in der Hyperoxie-induzierten Lungenschädigung reguliert und somit Lungenwachstum beeinflusst. Das übergeordnete Ziel ist es, zu klären, ob ein Verlust von Klf4, durch Induktion von Regeneration nach Hyperoxie-induzierter Lungenschädigung, protektiv wirkt und somit einen neuen therapeutischen Angriffspunkt darstellt.

Methoden: Um dies zu untersuchen, wurde eine genetisch modifizierte Maus mit einer Tamoxifen-induzierbaren AT2-spezifischen Deletion von Klf4 verwendet. Neugeborene Mäuse wurden ab dem 1. Lebenstag Hyperoxie (85% O₂) oder Normoxie (21% O₂) exponiert; die Tamoxifen-Gabe erfolgte am postnatalen Tag 3 (P3). An P21 wurden die Lungen für quantitative Histologie, Immunhistochemie und Genexpressionsmessungen entnommen.

Ergebnisse: Die wesentlichen Ergebnisse zeigen, dass ein AT2-spezifischer Verlust von Klf4 während der postnatalen Lungenentwicklung (i) die Alveolen- und Gefäßbildung unter Normoxie sowie unter Hyperoxie fördert. Dies ist in quantitativen histomorphometrischen Analysen (RAC, Alveolendurchmesser), sowie immunhistochemischen Färbungen von Gefäßmarkern (vWF + α -SMA) nachzuweisen. Zudem ist der zellspezifische Knockout von Klf4 assoziiert mit (ii) einem Verlust von AT2 (nachzuweisen in Immunfluoreszenzfärbungen), möglicherweise infolge einer Zelldifferenzierung. (iii) Die Untersuchung der Lungenmatrix zeigt keine signifikante Veränderung des Anteils an elastischen Fasern in der immunhistochemischen Untersuchung (Hart's stain, Sirius Rot Färbung) oder der Expression von Genen, die für Kollagene (wie z.B. *Col1a1*) kodieren. Interessanterweise waren die Mäuse mit AT2 spezifischer Deletion von Klf4 im Vergleich zu den Kontrolltieren trotz Zunahme des Kollagenanteils geschützt vor der Zunahme der Septendicke unter Hyperoxie. (iv) Letztlich zeigen die Genexpressionsmessungen im totalen Lungenhomogenat milde Effekte einer AT2-spezifischen Deletion von Klf4 auf die Expression des Seneszenzmarkers *Cdkn1a*, mesenchymale, endotheliale (z.B. *Ap1n*, *Vegfa*, *Cdh5*), AT1 (z.B., *Hopx*, *Popdc3*) und AT2 (z.B. *Sftpc*) Marker.

Fazit: Die Ergebnisse zeigen, dass der AT2-spezifische Verlust von Klf4 in der Phase der akuten Schädigung über zwei mögliche Mechanismen einen protektiven Effekt auf das Lungenwachstum zu haben scheint: (i) eine mögliche zunehmende Differenzierung von AT2 zu AT1 sowie (ii) über eine Regulation der Lungenmatrix.

2. Einleitung

2.1 Frühgeburt

2.11 Zahlen, Fakten und Ursachen

Frühgeburt wird durch die WHO definiert als Geburt vor der vollendeten 37. Schwangerschaftswoche (SSW). Sie wird nochmals unterteilt in extrem Frühgeborene (< 28. SSW), sehr früh Geborene (28.-32. SSW) und moderate bis späte Frühgeborene (32.-37. SSW) (*Preterm birth*, 2018).

Verschiedene Studien ergaben, dass weltweit ca. 10 % aller Kinder zu früh geboren werden, was etwa 41000 Kindern pro Tag entspricht (Harrison & Goldenberg, 2016; Organization, 2012; Tielsch, 2015). Entwicklungsländer weisen insgesamt höhere Zahlen an Frühgeburten auf als entwickelte Länder, von denen die USA 40 % aller Frühgeburten stellt. Die höchsten Zahlen findet man im südlichen Afrika und in Süd- bzw. Südostasien von bis zu 16 % (Beck et al., 2010). Diese Zahlen haben sich seit 1981 nicht stark verändert und steigen tendenziell sogar wieder an (Blencowe et al., 2012; Martin et al., 2018; Purisch & Gyamfi-Bannerman, 2017).

Frühgeburt birgt ein gesundheitliches Risiko für Mutter und Kind und ist mit negativen Folgen für die Entwicklung des Kindes assoziiert (s.u.). Frühgeburt inklusive der Komorbiditäten stellt eine der neonatalen Haupttodesursachen dar (Lehtonen et al., 2017; Pradhan et al., 2019; Zeitlin & al., 2018). 2001 bis 2015 machte die Frühgeburt fast 18 % aller Todesfälle dieser Altersklasse aus, gefolgt von der Pneumonie mit 15,5 % (s. Abb. 1) (Liu et al., 2016). In den Überlebensraten extrem Frühgeborener gibt es erhebliche Unterschiede zwischen entwickelten Ländern und Entwicklungsländern; während in entwickelten Ländern 90 % der vor der 28. SSW Geborenen überleben, schaffen es in Entwicklungsländern nur 10 % (Harrison & Goldenberg, 2016).

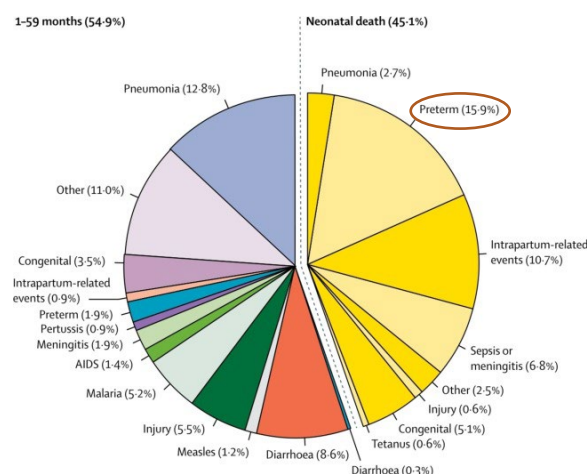


Abbildung 1: Todesursachen Kinder 0-5 Jahre (2001-2015).

Aufgeteilt in Neugeborene (<1 Monat); rechts (insgesamt ca. 45 %) und 1 Monat- 59 Monat alte Kinder; links (insgesamt ca. 55 %) modifiziert nach (Liu et al., 2016).

Neben regional-geographischen Aspekten wurden verschiedene Faktoren identifiziert, die mit einem erhöhten Risiko für eine spontane Frühgeburt assoziiert sind (Goldenberg et al., 2008). Dazu zählen eine schnelle Geburtenabfolge (Conde-Agudelo et al., 2006), Tabakrauchen (Andres & Day, 2000), ein geringer BMI der Mutter (Hendler et al., 2005), Infekte (Gibbs et al., 1992) und eine kurze Cervixlänge. Gründe für medizinische Frühgeburten durch Kaiserschnitt sind u.a. die intrauterine Wachstumsrestriktion (IUGR) oder die Präeklampsie (Goldenberg et al., 2008). Die Anwendung künstlicher Befruchtungsmethoden (zum Beispiel die Anwendung von *in vitro* Fertilisation (Jackson et al., 2004)), die bessere Gesundheitsversorgung und das höhere Alter der Mütter bei Geburt (Jacobsson et al., 2004) zählen zu den Ursachen steigender Frühgeburten in entwickelten Ländern (Chang et al., 2013).

2.12 Lungenentwicklung

Ein Frühgeborenes zeichnet sich durch die Unreife seiner Organe aus, was mit einer Reihe an gesundheitlichen Komplikationen für das Neugeborene einhergeht. Allen voran steht die Unreife lebenswichtiger Organe wie der Lunge und des zentralen Nervensystems (S. Saigal & L. W. Doyle, 2008). Die Lunge eines Frühgeborenen befindet sich im 3. bzw. 4. von fünf Entwicklungsstadien, was bedeutet, dass seine Lunge noch keine komplett ausgebildeten Alveolen aufweist, wodurch sie noch nicht voll funktionsfähig und anfälliger gegenüber schädigenden Einflüssen von außen ist. Um zu verstehen, welche wichtigen Prozesse in der Entwicklung der Lunge stattfinden, sind hier die wichtigsten Entwicklungsschritte kurz dargestellt (Abb. 3).

Im *embryonalen Stadium* (bis 7. SSW) entwickeln sich die beiden Lungenknospen. Es folgt das *pseudoglanduläre Stadium* (7.-17. SSW) mit Verzweigungen der Lungenknospen und Vaskularisation, sowie der Entwicklung des primitiven Lungenepithels bestehend aus Knorpel, glatten Muskelzellen und Vorläuferzellen der Alveolarepithelzellen Typ 1 und 2 (AT1 und AT2). In der folgenden *kanalikulären Phase* (16.-25. SSW) findet die Entwicklung der Blut-Luft-Schranke durch die Differenzierung von AT1 und AT2 ab der 20. SSW statt. Die vorletzte Phase, die *sakkuläre Phase* (24.-38. SSW), stellt das erste lebensfähige Stadium des Fetus dar. Ab der 26. SSW produzieren die AT2 Surfactant und ab der 30. SSW sezernieren sie dies ins Atemwegslumen, getriggert durch ansteigende Kortisolspiegel. Vollständig funktionsfähig sind die AT2 jedoch erst in der 35. SSW. Durch das Surfactant wird die Oberflächenspannung reduziert und die Lunge kann sich entfalten. Im letzten *alveolären Stadium*, das erst kurz vor Geburt beginnt, zum Großteil aber postnatal abläuft, entwickeln sich aus den Ducti terminale die Alveolen durch sekundäre Septierung (Burri, 1984; Merkus et al., 1996; Mullassery & Smith, 2015; Smith et al., 2010). Während man früher der Annahme war, die Lungenentwicklung sei nach dem zweiten Lebensjahr weitestgehend abgeschlossen (Burri, 1984; Smith et al., 2010), zeigen neuere Studien, dass die Alveolenbildung, insbesondere bei

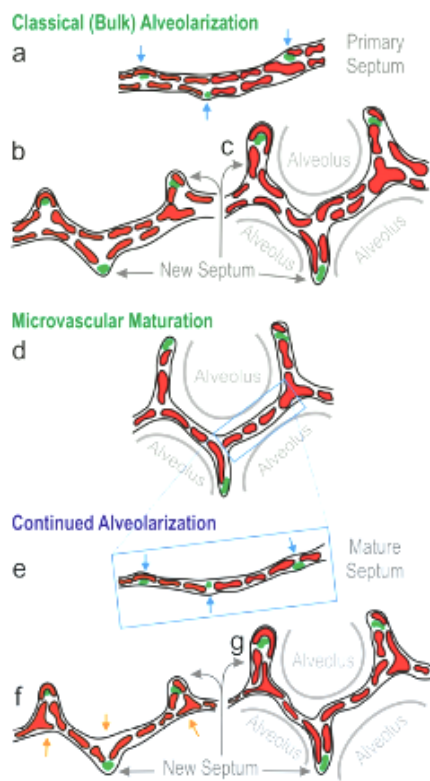


Abbildung 2: Septenentwicklung und Alveolarisierung.

Modifiziert nach (Burri, 1997, 1999; Schittny, 2017; Woods & Schittny, 2016)



Vorliegen von lungenschädigenden Einflüssen, bis ins Erwachsenenalter reichen kann (Butler et al., 2012; Massaro & Massaro, 1986; Massaro & Massaro, 1996; Schittny, 2017).

Im Folgenden werden die Vorgänge der sekundären Septierung genauer beschrieben (Abb. 2).

a. Zu Beginn der sakkulären Phase liegen unreife primäre Septa vor; diese zeichnen sich durch eine doppelte Schicht an Mikrogefäßen (rot) aus. Zudem bestehen sie aus Elastin, Kollagen und glatten Muskelzellen (grün). Dies sind die Stellen (blauer Pfeil), an denen sich durch Hochfalten neue (sekundäre) Septa bilden.

b + c. Durch das Hochfalten einer der zwei Schichten werden vorbestehende Lufträume getrennt; Alveolen und sekundäre Septa entstehen.

d + e. Diese zweischichtigen sekundären Septa verschmelzen zu einem Septum, was man als Reifung bezeichnet. Es entsteht ein gemeinsames Septum zwischen benachbarten Alveolen.

f + g. Auch die reifen Septa sind an der Alveolarisierung beteiligt. Durch Hochfalten der Septa entstehen neue Alveolen, dabei findet Angiogenese an den Teilungsstellen statt, um die Kapillarversorgung zu gewährleisten (orangener Pfeil).

h. Das neu entstandene unreife doppeltschichtige Septum fusioniert wieder zu einem einschichtigen reifen Septum (Schittny, 2017).

Die Interalveolarsepten sind, mit einer durchschnittlichen Dicke von 1.5 μm (Smith et al., 2010), der Ort des Blut-Gas-Austausches. Sie bestehen aus Kapillarendothel, Basallamina und an der Oberfläche aus den AT1 und AT2. Während die AT1 den Großteil des alveolären Septums bedecken (ca. 95 %) und damit die Blut-Luft Schranke darstellen, haben die wenigen AT2 (5 %) mehrere wichtige Funktionen. Dazu zählen die Reduktion der Oberflächenspannung durch die Produktion von Surfactant, die Produktion von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Antioxidantien (Lüllmann-Rauch, 2006a). Außerdem sind sie als Progenitorzellen in der Lage, sich in neue AT1 umzuwandeln (Barkauskas et al., 2013; Desai et al., 2014; M. J. Evans et al., 1975). Die Mechanismen, die diesen Prozess kontrollieren, sind noch unbekannt. Die Maus eignet sich gut, um die Pathogenese der BPD zu erforschen, da die Lungenentwicklung der Maus große Ähnlichkeiten mit der menschlichen Lungenentwicklung hat. Eine Maus wird im sakkulären Stadium der Lungenentwicklung geboren und repräsentiert damit die Lunge eines frühgeborenen Kindes (Abb. 3) (Warburton et al., 2010).

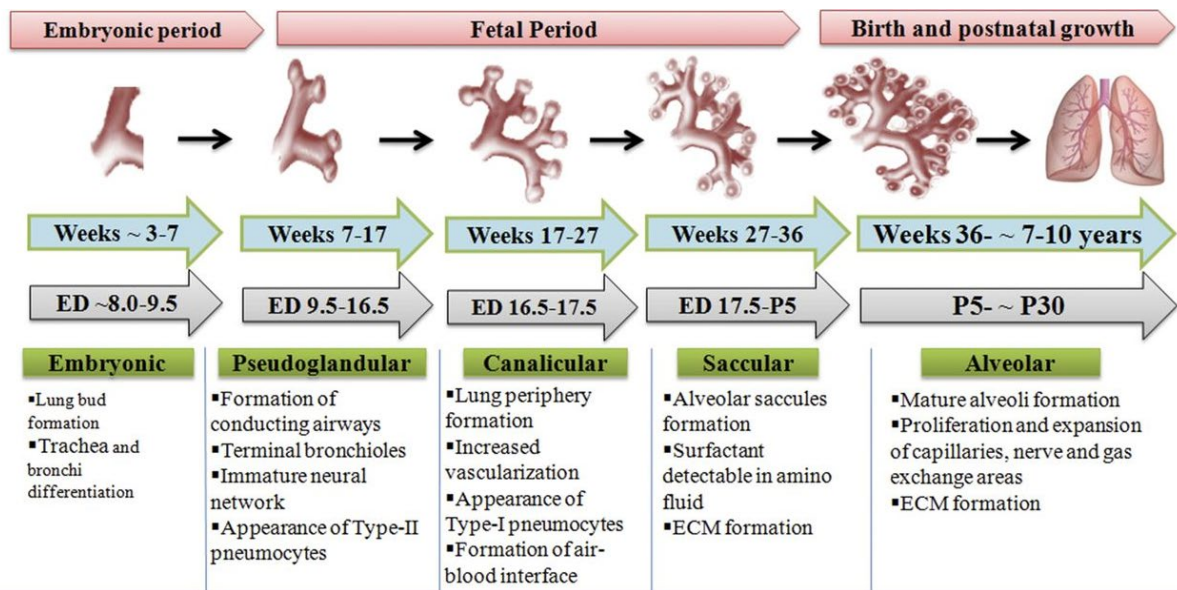


Abbildung 3: Modell der Lungenentwicklung eines Menschen (blau, oben) und einer Maus (grau, unten) in seinen 5 Stadien (grün) mit den wichtigsten Prozessen in jeder Phase. ED=Embryonation Day=Alter des Embryos, P= Alter postpartum. Modifiziert (gekürzt) nach (Hussain et al., 2017)

2.13 Komplikationen der Frühgeburt

Die Morbidität und Mortalität der Frühgeburt konnte in den letzten Jahren deutlich gesenkt werden, dennoch stellen pulmonale Komplikationen wie das akute Atemnotsyndrom, das (*Infant*) *Respiratory Distress Syndrome* „(I)RDS“, und chronisch die Bronchopulmonale Dysplasie (BPD) immer noch relevante und häufige Komplikationen dar (Bancalari & Jain, 2019). Die BPD gilt als häufigste Langzeitfolge der Frühgeburt (Tracy & Berkelhamer, 2019). Ihre Entstehung beginnt häufig schon vor der Geburt. Durch schädigende Faktoren nach der Geburt, wie zum Beispiel Hyperoxie, die auf eine noch sehr unreife Lunge treffen und die Lungenentwicklung negativ beeinflussen, kann eine chronische Lungenerkrankung resultieren (Jobe, 2016). Laut einer Studie aus dem Iran von 2019 erkrankten knapp 80 % der Frühgeborenen unter 1500 g an einem RDS (Armanian et al., 2019); in einer norwegischen Studie waren in den Jahren 1999-2000 ca. 67 % der extremen Frühgeborenen von einem RDS betroffen (Farstad et al., 2011); und eine Studie aus England und Wales geht von insgesamt 40 % aller Frühgeborenen aus (Moser, 2009).

Neben dem RDS ist die Frühgeburt assoziiert mit Sepsis, persistierendem Ductus arteriosus Botalli, intraventrikulärer Blutung und nekrotisierender Enterokolitis (A. Armanian et al., 2015; A.-M. Armanian et al., 2015; Beigi et al., 2013). Neben dem Genannten, kommt es häufiger zu leichter IQ-Minderung (bis zu 33 %) (S. Saigal & L. W. J. T. L. Doyle, 2008), Aufmerksamkeits- und Hyperaktivitätssyndromen (Delobel-Ayoub et al., 2009; Platt, 2014), Cerebralparesen (12 %), Epilepsie (Mwaniki et al., 2012), Hypoxisch-ischämischer Encephalopathie (Jacobs et al., 2013) und Kernikterus (ca. 4 %) (Watchko & Claassen, 1994). Das Sehen (25 %) u.a. durch die Retinopathia praematurorum (ROP) (3 %) (Torloni et al., 2009) und das Hören (25fach erhöhtes Risiko) (Datta-Nemdharry et al., 2012) können eingeschränkt sein.

2.2 IRDS und BPD

2.21 Definitionen

Das IRDS, erstmals 1932 von Farber und Wilson als „*hyaline membrane disease*“ beschrieben (Farber & Wilson, 1932), ist eine Form des akuten Lungenversagens beim Neugeborenen auf der Grundlage von Surfactantmangel und geht mit typischen histologischen, radiologischen und klinischen Veränderungen einher (Heese Hde et al., 1970; Smith et al., 2010). Es entspricht dem *Acute respiratory distress syndrome* „ARDS“ beim Erwachsenen (Ashbaugh et al., 1967; Thompson et al., 2017). Das ARDS ist definiert als eine plötzliche progrediente hypoxämische respiratorische Insuffizienz, die innerhalb einer Woche nach einem ursächlichen Ereignis auftritt und nicht durch andere Ursachen erklärbar ist. Radiologisch ist das Vorhandensein von Infiltraten und Pleuraergüssen ohne andere (z.B. kardiale) Ursache zur Diagnosestellung nötig. Die Schwere des ARDS wird anhand der Berliner Kriterien mit dem Horowitz-Quotienten ($\text{paO}_2/\text{FiO}_2$) eingeschätzt, der das Verhältnis zwischen im Blut angekommener Sauerstoffkonzentration (Sauerstoffpartialdruck = paO_2) und Sauerstoffkonzentration in der Beatmungsluft (inspiratorische Sauerstofffraktion = FiO_2) angibt. Anhand des Horowitz-Quotienten wird das ARDS in leicht (201-300 mmHg), mittel (101-200 mmHg) und schwer (< 100 mmHg) eingeteilt (Dauger et al., 2017; Ranieri et al., 2012).

Die BPD wurde erstmals durch Northway et al. (1967) als eine chronische Folge des IRDS beschrieben (Northway Jr et al., 1976). Seitdem wurde die Definition mehrfach modifiziert, so z.B. durch Shennan et al. (1988), die die BPD als Lungenerkrankung des Neugeborenen unter 1500 g mit Bedarf an Sauerstoff in der 36. SSW post menstruationem (p.m.) definierten (Shennan et al., 1988). Heute wird die BPD als eine Erkrankung des Frühgeborenen definiert, die durch Lungenunreife eine mindestens 28 Tage andauernde Sauerstoffgabe mindestens bis zur 36. SSW p.m. erforderlich macht. Dabei hängt die Schwere der BPD von der fraktionellen Sauerstoffkonzentration der Beatmungsluft (FiO_2) in der 36. SSW ab. Bei Geburt in bzw. nach der 32. SSW wird die Schwere der BPD am 56. postnatalen Tag (P56) evaluiert. Bei einer FiO_2 von mindestens 0,3 (30 %) oder dem Bedarf an positiven Beatmungsdrücken in der 36. SSW bzw. P56 spricht man von einer schweren BPD, bei Sauerstoffbedarf mit einer FiO_2 unter 30 % von einer mittleren und bei eigenständiger Atmung von Raumluft von einer leichten BPD (Ali et al., 2013; Jobe & Bancalari, 2001; Jobe & Steinhorn, 2017; Voynow, 2017) (Tabelle 1). Inzwischen existieren mehrere klinische Scoring-/ und Diagnosesysteme für die BPD, u.a. beschrieben durch Walsh et al. (El Faleh et al., 2021; Walsh et al., 2004).

Tabelle 1: Einteilung der BPD.

(angelehnt an NIH workshop definition of BPD (Jobe & Eduardo, 2000))

Gestationsalter	< 32. SSW	≥ 32. SSW
Zeitpunkt der Beurteilung	36. SSW oder Entlassung nach Hause (was früher eintritt)	P56 oder Entlassung nach Hause (was früher eintritt)

Behandlung mit > 21 % O₂ für mindestens 28 d

mild	Atmet Raumluft
moderat	Bedarf an < 30 % O ₂
schwer	Bedarf an ≥ 30 % O ₂ und/oder positivem Beatmungsdruck (PPV/ncPAP)

2.22 Inzidenz

Trotz großer Fortschritte in der Therapie und Versorgung von Frühgeborenen und der Verbesserung der Überlebensraten extrem Frühgeborener, hat sich die Inzidenz der BPD in den letzten 50 Jahren kaum verändert und ist noch immer die führende Erkrankung der Frühgeborenen (s.o.) (E. Lignelli et al., 2019). Dies ist unter anderem auf die höheren Überlebensraten der extrem Frühgeborenen zurückzuführen, die zu einer Linksverschiebung der Inzidenz führt. Obwohl über der 28. SSW Geborene deutlich seltener an einer BPD erkranken, ändern sich die Gesamtzahlen kaum, da dafür mehr früher Geborene überleben, die häufiger eine BPD entwickeln (Jobe, 2012; Jobe, 2011; Stoll et al., 2015). Die Grenze der „Lebensfähigkeit“ verschiebt sich immer weiter nach unten – aktuell liegt diese gemäß AWMF-Leitlinie bei einem Geburtsgewicht über 400 g in der 22+0. SSW (Bührer et al., 2020).

2.23 Ursachen und Pathophysiologie

Um einen optimalen Luft-Gas-Austausch zu gewährleisten, ist eine große Oberfläche mit dünner Blut-Luft-Barriere nötig. Die hierfür relevanten Veränderungen finden am Übergang zwischen sakkulärer und alveolärer Phase (um die 32. SSW) durch sekundäre Septierung und Reifung der Lungengefäße statt (Abb. 2). Diese terminale Differenzierung führt zu mehr und kleineren Alveolen (größere Oberfläche) und zu einem geringeren Abstand zwischen Blut und Luft (Burri, 2006). Dabei laufen komplex organisierte Prozesse ab, an denen viele verschiedene Zelltypen beteiligt sind (Bourbon et al., 2005). Gleichzeitig macht der Mangel an Surfactant und ein Atemnotsyndrom des Frühgeborenen die Supplementierung von Sauerstoff nötig, was zu Lungenschädigungen und damit einhergehenden Umbauprozessen führt (Jobe, 2016).

Die Ursachen der BPD können in innere, iatrogene und externe Faktoren eingeteilt werden (Ali et al., 2013) (Abb. 4). Zu den führenden **inneren** Faktoren zählt die Frühgeburt und die intrauterine Wachstumsrestriktion (IUGR) vor der 28. SSW (Bose et al., 2009). Das männliche Geschlecht führt durch die Androgenwirkung zu einer Reduktion der Surfactantproduktion und damit zu einer Aggravierung der BPD (Nielsen et al., 1990). Ebenfalls haben Zwillinge ein deutlich höheres Risiko für die Entwicklung einer BPD, wenn ihr Geschwisterkind an der BPD erkrankt ist (Bhandari et al., 2006).

Der führende **iatrogene** Faktor ist die Sauerstoffgabe. Hyperoxie schädigt sowohl die reife als auch die unreife Lunge (Frank & Medicine, 1991), zum einen durch die reaktiven

Sauerstoffspezies direkt, als auch indirekt durch die Induktion einer Entzündungsreaktion. Neben der Induktion einer Entzündungsreaktion führt die Hyperoxie zu epithelalem und endothelalem Zelltod, Ödem und Hämorrhagie (Frank et al., 1978; B. B. Warner et al., 1998). Außerdem schränkt Hyperoxie die Funktion der Mitochondrien ein (Ahmad et al., 2001; Ratner et al., 2009) und reduziert die Anzahl an Progenitorzellen in der Lunge (Balasubramaniam et al., 2007; Irwin et al., 2007). Die reaktiven Sauerstoffspezies schränken die Gefäßbildung der Lunge ein (Ahmed et al., 2003; Auten et al., 2006; Delaney et al., 2015), während Entzündungszellen durch Ausschüttung von Zytokinen, Chemokinen und Proteasen die Inflammation verstärken und damit die Lunge schädigen (Bhandari, 2010; Buczynski et al., 2013; Denis et al., 2001; Schultz et al., 2010). Trotzdem haben einige Entzündungszellen, wie Monozyten, auch protektiven Effekt auf die Lunge und machen daher das Verständnis der Pathogenese der BPD komplex (Eldredge et al., 2016). Neben der Hyperoxie trägt die mechanische Beatmung zur Genese der BPD bei (Ikegami & Jobe, 2002) - auch die mechanische Beatmung ohne Hyperoxie kann einen BPD-ähnlichen Phänotyp induzieren (Mokres et al., 2010). Durch zyklisches negatives Dehnen der Alveolen in der Schwangerschaft, kommt es beim Baby häufiger zur Lungenhypoplasie. Zwar ist das physiologische Dehnen der Alveolen wichtig für die weitere Lungenentwicklung durch Induktion von Surfactantproduktion (Sanchez-Esteban et al., 2001) und Ausschüttung von angiogenetischen Wachstumsfaktoren (Muratore et al., 2000; Quinn et al., 2002), dennoch führt pathologisches Dehnen, z.B. durch mechanische Ventilation, zur Lungenschädigung (Alvira & Morty, 2017; Coalson et al., 1982; Coalson et al., 1999).

Zu den **äußeren** Faktoren zählen v.a. prä- und postnatale Infektionen wie die Chorioamnionitis (Lahra et al., 2009).

All diese Einflüsse schädigen unter anderem die Alveolarepithelzellen (AT1 und AT2), Endothelzellen und Fibroblasten der unreifen Lunge des Frühgeborenen. Durch die Schädigung dieser Zellen werden wichtige Mechanismen wie Vaskularisation, Alveolenbildung, Matrixremodelling und Lungenwachstum beeinträchtigt. Lungen mit BPD zeichnen sich dementsprechend durch ein reduziertes Lungenwachstum mit weniger und vergrößerten Alveolen, sowie weniger Gefäßen (Abb. 5) und damit einem reduzierten Gasaustausch aus (Jobe, 2012).

Ebenfalls weisen die Lungen eine reduzierte Immunabwehr und, durch mangelnde Regeneration nach Schädigung, eine frühzeitige Lungenalterung auf (Collins et al., 2017; Hilgendorff & O'Reilly, 2015). Zum einen ist dies durch Überschreitung des Zeitfensters der Alveolenbildung bedingt, wodurch eine de-novo Bildung nicht stattfindet. Zum anderen resultiert dies aus der Hemmung des regenerativen Potentials der Alveolen infolge eines Verlusts der Progenitorzellen, welcher durch die schädigenden Einflüsse in der Perinatalperiode begünstigt wird. AT2 sind die Progenitorzellen der Alveole und demnach

würde ein Verlust zu einer verminderten Neubildung von AT1 führen und so die Alveolenregeneration mindern (Michael J Evans et al., 1975). Vorarbeiten unserer AG zeigten in der Tat, dass prolongierte Hyperoxie und mechanische Beatmung den Verlust von AT2 induziert (Alejandre Alcazar et al., 2018). Die Mechanismen, welche das Überleben, die Differenzierung und den Erhalt der Progenitorfunktion von AT2 regulieren, sind allerdings weitgehend ungeklärt. Bekannte zugrundeliegende molekulare Mechanismen umfassen u.a. ein Ungleichgewicht von Entzündungsmediatoren wie Zytokinen und Leukotrienen (Leroy et al., 2018; Xia et al., 2017) sowie eine Dysregulation von Wachstums- und Transkriptionsfaktoren (Cardoso, 1995; Iosef et al., 2018; E. Lignelli et al., 2019; McKenna et al., 2017; Shrestha et al., 2019; Thebaud, 2017). Nennenswert, aber bislang wenig untersucht, ist die Rolle der Krüppel-like-Transkriptionsfaktoren.

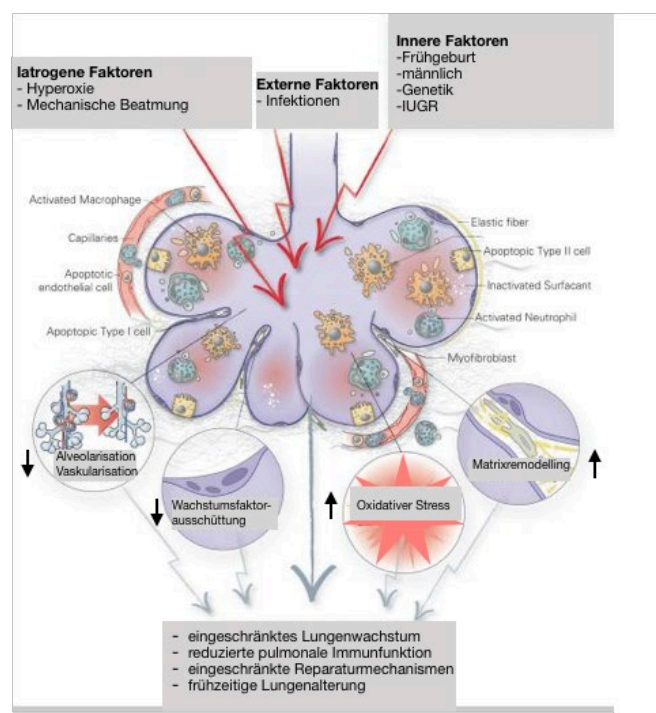


Abbildung 4: Pathomechanismus der BPD.
Ursachen, betroffenen Zelltypen und Symptome.
modifiziert nach (Hilgendorff & O'Reilly, 2015)

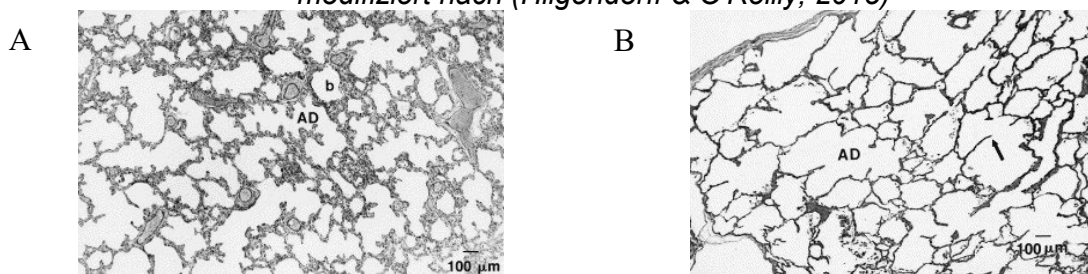


Abbildung 5: Histologische Bilder der Lungen von Kleinkindern.

A) Lunge eines gesunden 5 Monate alten Säuglings. B) Lunge eines Frühgeborenen der 28. SSW mit BPD. Es zeigen sich weniger Alveolen, vergrößerte Ducti und weniger Gefäße in der kranken Lunge. Die Lungenbiopsie erfolgte im Alter von 8 Monaten. Abb. aus (Coalson, 2003), Genehmigung liegt vor.

b=Bronchiolus, Pfeil=Zerstörung des Inter-alveolarseptums, AD=ductus alveolaris

2.3 Krüppel-like Faktoren

2.31 Allgemeines

Transkription ist der erste Schritt der Genexpression und wird durch Proteine, die sogenannten Transkriptionsfaktoren, reguliert. Transkriptionsfaktoren binden an eine spezifische DNA-Region, die für die Genexpression regulatorische Funktionen besitzt, und bestimmen so deren Expression. Je nachdem, welche Proteinstruktur diese Transkriptionsfaktoren für die DNA-Bindung verwenden, werden sie in verschiedene Familien eingeteilt (Latchman, 1993). Transkriptionsfaktoren sind auch in der normalen Lungenentwicklung von Relevanz (Cardoso, 1995).

Krüppel-like Faktor 4 (Klf4) gehört zu der Familie der Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren Sp/Klf und wurden von Shields et al. 1996 entdeckt (Shields et al., 1996). Der erste Transkriptionsfaktor dieser Familie, Klf1, auch bekannt als *Erythroid Krüppel-like factor* (EKLF), wurde erstmals 1993 von Miller et al. beschrieben (Miller & Bieker, 1993). Bis 1999 wurden 12 *Krüppel-like Faktoren* entdeckt (Philipsen & Suske, 1999; Turner & Crossley, 1999) und bis 2010 wurden alle bisher bekannten 17 Transkriptionsfaktoren dieser Familie identifiziert (McConnell & Yang, 2010).

Die Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren besitzen 3 C₂H₂-Typ Zinkfinger, über welche sie GC-reiche Regionen der *Promoter* bzw. *Enhancer* Region der DNA (am terminalen Carboxyl-Ende) binden. Die erste und zweite Zinkfingerdomäne besteht jeweils aus 25 Aminosäuren, die dritte aus 23. Für die spezifische Funktion des Transkriptionsfaktors ist die dritte Domäne entscheidend. Jede Zinkfingerdomäne erkennt 3 verschiedene Basenpaare, sodass insgesamt 9 Interaktionen möglich sind. Neben der Bindung an die DNA, reguliert die Zinkfingerdomäne den Transport der Faktoren in den Nukleus (McConnell & Yang, 2010).

Es gibt kaum ein Organsystem, in dem *Krüppel-like Faktoren* keine Rolle spielen (s. Absatz 1.3.3.2). In den verschiedenen Organen haben die Klf-Transkriptionsfaktoren viele verschiedene, teilweise überlappende und teilweise gegensätzliche Wirkungen. So regulieren sie die Differenzierung von Zellen, werden aber auch eingesetzt zur Generation von Stammzellen aus somatischen Zellen (ipS) und zum Erhalt von pluripotenten embryonischen Stammzellen (ES), regulieren Proliferation sowie programmierten Zelltod (Apoptose) und spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Pathogenese verschiedenster Erkrankungen, allen voran der Tumorbilogie. Abgesehen von den Mitgliedern der Sp/Klf Familie gibt es keinen anderen Stammzellfaktor, der nach der Geburt eine Selbsterneuerung induzieren kann (McConnell & Yang, 2010).

2.32 Einteilung

Die *Krüppel-like Faktoren* werden vom *Human Gene Nomenclature Committee (HGNC)* nach ihrem Zeitpunkt der Entdeckung chronologisch nummeriert. Häufig verwendet wird ein Synonym, welches den Wirkort des *Krüppel-like Faktors* beschreibt, so z.B. *gut-enriched Krüppel-like Faktor* für Klf4 (White et al., 1997). Eine weitere Unterteilung der *Krüppel-like Faktoren* erfolgt anhand der spezifischen Bindungsstelle und der Hauptwirkweise an der Ziel-DNA. Es können demnach folgende 4 Gruppen unterschieden werden.

- **Gruppe 1** (Klf 3, 8 und 12): Repressor über Interaktion mit dem C-terminalen Bindungs-Protein 1 und 2 (CtBP1 und CtBP2).
- **Gruppe 2** (Klf 1, 2, 4, 5, 6 und 7): Transkriptionsaktivator über Bindung der Acetylase.
- **Gruppe 3** (Klf 9, 10, 11, 13, 14 und 16): Repressor über Interaktion mit dem transkriptionellen Ko-Repressor Sin3A.
- **Gruppe 4** (Klf 15 und 17): entfernt verwandt. Ohne definierte Protein-/ oder Interaktions-Motive (McConnell & Yang, 2010).

2.33 Krüppel-like-Faktor 4 (Klf4)

Im Folgenden werden die wichtigsten Funktionen von Klf4 in verschiedenen Organen, sowie in der Pathogenese wichtiger Erkrankungen genannt.

2.331 Klf4 - ein Stammzellfaktor

Im Jahr 2006 fanden Yamanaka und Takahashi heraus, dass Maus Fibroblasten durch folgende Faktoren in pluripotente Stammzellen umwandelbar sind: *Oct3/4*, *Sox2*, *Myc*, und *Klf4* (Takahashi & Yamanaka, 2006). Später wurde dies mit humanen Fibroblasten bestätigt und die vier Faktoren sind heute als sogenannte Yamanaka-Faktoren bekannt (Takahashi et al., 2007). Aktuelle Studien zeigen, dass Klf 2, 4, 5 (und 17), die alle wichtig für die Pluripotenz von Zellen sind, überlappende Funktionen haben. So führt der Verlust von Klf 2 und 4 nicht automatisch zum Verlust der Stammzellkapazität von embryonalen Stammzellen, weil der Verlust durch einen anderen Klf kompensiert werden kann. Es scheint als seien die einzelnen Faktoren nicht essenziell für die Stammzellkapazität von Zellen, jedoch geht der vollständige Knockout von Klf 2, 4 und 5 mit einem letalen Phänotyp einher (Yamane et al., 2018).

2.332 Klf4 in verschiedenen Organen & Krankheiten

Initial wurde der „gut-enriched“ *Krüppel-like Faktor* im Gastrointestinaltrakt beschrieben (Shields et al., 1996), wo er u.a. bei der postnatalen Differenzierung von Becherzellen (Katz et al., 2002) und Enterozyten von Bedeutung ist (Ghaleb et al., 2011). Auch in der Haut, dem Skelett, dem Auge, der Niere, bei der Blutbildung und im Gefäßsystem hat Klf4 essentielle Funktionen. Ohne Klf4 sterben Mäuse kurz nach der Geburt am Verlust der Hautbarrierefunktion (Jaubert et al., 2003; Segre et al., 1999). Zudem kommt es ohne den Stammzellfaktor vermehrt zu Hauttumoren (J. Li et al., 2012) und Wundheilungsstörungen (Ou et al., 2015). Klf4 reguliert die normale Skelettentwicklung (Fujikawa et al., 2014; Kim et al., 2014), ist in Odonto- und Ameloblasten zu finden (Chen et al., 2009) und hilft bei der Odontoblastendifferenzierung (Liu et al., 2013). Der Verlust von Klf4 führt zu multiplen Erkrankungen des Auges (Swamynathan et al., 2007) und in der Niere hat Klf4 antiinflammatorische Funktion (Mreich et al., 2015). Zusammen mit anderen *Krüppel-like-Faktoren*, ist Klf4 beteiligt an der Aktivierung von roten Blutkörperchen (Zhang et al., 2005), Makrophagen (Feinberg et al., 2005), Monozyten (Alder et al., 2008) und an der Zelldifferenzierung von B-Zellen (Klaewson et al., 2007) sowie CD8-Zellen (Mamonkin et al., 2013). In der glatten Gefäßmuskulatur bestimmt Klf4 den Phänotyp (King et al., 2003), wird nach Gefäßschädigung exprimiert (Hamik et al., 2007) und induziert dann antiinflammatorische und antiatherosklerotische Prozesse (Hamik et al., 2007; Liao et al., 2011; Mun & Boo, 2012; Sharma et al., 2012; Stavri et al., 2015). Jedoch besitzt Klf4 auch proatherosklerotische Wirkung (Hale et al., 2015; Yang et al., 2010). Die endotheliale Barriere und Adhäsionskontakte werden durch Klf4 erhalten (Cowan et al., 2010). In der Vaskulogenese (Chiplunkar et al., 2013), sowie in der Differenzierung von Kardiomyofibroblasten und in der Kollagensynthese spielt Klf4 eine Rolle (Zhang et al., 2013). Während manche Studien zeigen, dass Klf4 Angiogenese hemmt (Hale et al., 2014), zeigen andere Studien, dass Klf4 die VEGF-Level erhöht, damit Angiogenese induziert (Wang et al., 2015) und im ZNS sogar zur Dysplasie führt (Cuttano et al., 2016). In Studien reduziert Klf4 die Expression von α -SMA und damit die Differenzierung von glatten Gefäßmuskelzellen (Kawai-Kowase et al., 2009), aber unter ATRA (Retinsäure) hat Klf4 gegenteiligen Effekt (Wang et al., 2008).

Wichtig und gut erforscht ist die Bedeutung von Klf4 in der Tumorbilogie. Über verschiedene Pathomechanismen kann Klf4 die Entstehung von Tumoren begünstigen oder verhindern.

Einer dieser Mechanismen ist die Induktion von Wachstumsarrest auf zellulärer Ebene (Chen et al., 2001b; Shields et al., 1996; Zhang et al., 2000) und damit die Wirkung von Klf4 als Tumorsupressor. Diese Wirkung von Klf4 wurde u.a. in Zellen des kolorektalen Karzinoms gezeigt (Chen et al., 2001a) und spielt auch beim protektiven Effekt von Klf4 bei DNA-

Schädigung nach Strahlenexposition eine Rolle (Kuruvilla et al., 2016; Talmasov et al., 2015; Yoon et al., 2003; Yoon et al., 2005; Yoon & Yang, 2004; Zhang et al., 2014).

In anderen Tumoren (bspw. Mammakarzinom) unterstützt Klf4, als Gegenspieler von p53 und *BAX*, das zelluläre Überleben, verhindert Apoptose (Rowland et al., 2005; Yang et al., 2005) und wirkt damit als Onkogen (McConnell et al., 2007). Der antagonistische Effekt von Klf4 auf den Tumorsuppressor p53 in AT2 konnte auch durch Vorarbeiten unserer AG bestätigt werden.

Außerdem beeinflusst Klf4 die epitheliale-mesenchymale Transduktion (EMT) und hat sowohl Pro-EMT als auch Anti-EMT Effekte, was in der Karzinogenese verschiedener Tumoren relevant ist. Im Endometrium-CA sowie im nicht-kleinzelligen Lungen-CA induziert Klf4 EMT (Dong et al., 2011; Kumar et al., 2013), während es im hepatozellulären Karzinom EMT verhindert (Li et al., 2016). In manchen Tumoren, wie dem Pankreas-CA und dem Prostata-CA, hat Klf4 sowohl Pro-EMT-/ (Pinho et al., 2011; Sureban et al., 2013) (Ren et al., 2013) als auch Anti-EMT-Effekte (Liu et al., 2012; Ouyang et al., 2014).

Auch über pro-/ bzw. anti-inflammatorische Wirkung, kann Klf4 die Entstehung von Tumoren beeinflussen. Über seine inflammatorische Wirkung induziert Klf4 z.B. die Entstehung des Plattenepithel-CA des Ösophagus (Tetreault et al., 2010).

Zusammenfassend hat die Expression von Klf4 tumorabhängige, prognostische Bedeutung. Eine hohe Konzentration von Klf4 korreliert bei den meisten gastrointestinalen Tumoren (Patel et al., 2010; Wei et al., 2005) und beim nicht-kleinzelligen Lungen-Karzinom mit einem geringen Tumorstadium (Fadous-Khalife et al., 2016; Zhou et al., 2010). Im Mamma-Karzinom (Foster et al., 2000; Rowland et al., 2005), im Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus (Tetreault et al., 2010), und der Kopf-/ Halsregion (Tai et al., 2011) sowie bei Teilen des Kolon CA (Ghaleb et al., 2007) wirkt Klf4 jedoch als Onkogen.

2.3321 Klf4 in der Lungenforschung

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass mechanische Beatmung die Klf4-Expression in Lungenepithelzellen und dies wiederum die Expression verschiedener Differenzierungsmarker beeinflusst (s.u.). Neben Klf4 ist insbesondere Klf2, der sogenannte *Lung-Krüppel-like factor*, in der normalen Lungenentwicklung relevant und gut erforscht. Klf2 wird in kaum einem anderen Organ als der Lunge exprimiert (Anderson et al., 1995). Bei homozygotem Verlust von Klf2 sind die Mäuse nicht lebensfähig und sterben schon pränatal an schweren Hämorrhagien. Auch ein Verlust von Klf2 in der Lunge ist nicht mit dem Leben vereinbar und führt schon pränatal zum Tod der Tiere (Wani et al., 1998; Wani et al., 1999). Während Klf2 in der Lungenentwicklung schon gut erforscht ist, ist Klf4 bisher weniger erforscht. Relevante Studien über Klf4 in der Lungenforschung liegen für pulmonale Erkrankungen des Erwachsenen vor (*Diskussion 5.4*).

2.333 Klf4 – Zusammenfassung

Klf4 gehört zu den am besten erforschten *Krüppel-like Faktoren* und es wird deutlich, dass es in fast jedem Organ und in der Pathogenese vieler Erkrankungen eine wichtige Rolle spielt. Zudem wird die sogenannte Kontext-abhängige Funktion von Klf4, die teilweise gegensätzlich ist, anhand der obengenannten Studienergebnisse gut veranschaulicht (Abb. 6) (Ghaleb & Yang, 2017). Dennoch ist insgesamt wenig über die Bedeutung von Klf4 in der Lungenentwicklung, insbesondere in der AT2-Homöostase und in der Pathogenese der Hyperoxie-induzierten Lungenschädigung (BPD) bekannt.

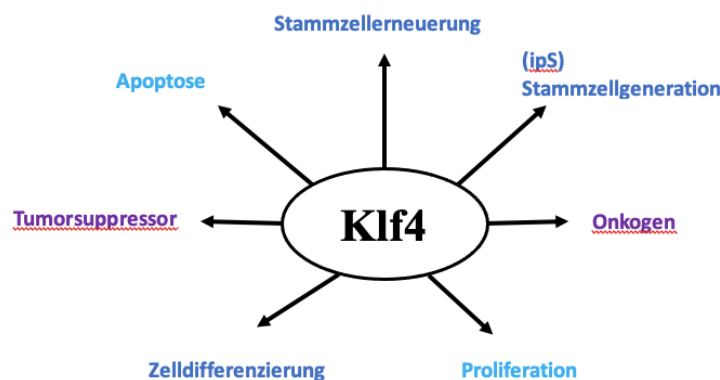


Abbildung 6: Die kontextabhängigen Funktionen von Klf4.

2.4 Vorarbeiten

Im Folgenden wird auf Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe (AG Alcazár) Bezug genommen.

2.41 Vorkommen von Klf4 in der postnatalen Lunge

In immunhistochemischen Färbungen wurde dargestellt, dass Klf4 in der Lunge vor allem in glatten Muskelzellen, Bronchialepithelzellen und Endothelzellen vorkommt. Außerdem wird Klf4, gemäß Westernblot und PCR, insbesondere in der alveolären Entwicklungsphase der Mäuse, nämlich zwischen dem postnatalen Tag 7 und 21 (P7-P21) exprimiert.

2.42 Einfluss mechanischer Beatmung

An einem etablierten Modell der BPD wurde der Einfluss mechanischer Beatmung auf die Lungen neugeborener Mäuse (P3, P5) untersucht. Durch Proteinanalyse konnte gezeigt werden, dass mechanische Beatmung zu einer Reduktion von Klf4 und EGFR, sowie zu einem Anstieg des Seneszenzmarkers p21 (CDKN1a) führt. Außerdem werden AT1- und AT2-Marker wie Aquaporin 5 (AQ5) und Surfactantprotein C (SFTPC) weniger exprimiert. An murinen Lungenepithelzellen (MLE-12) wurde durch siRNA-Technik und nachfolgender Untersuchung der Viabilität/Proliferation mittels MTT-assay und Messung der Caspase 3/7

Aktivität bestätigt, dass eine Reduktion von Klf4 und EGFR zu mehr Apoptose und weniger Proliferation führt. Die Reduktion von EGFR hat eine Abnahme von Klf4 zur Folge (Alejandre Alcazar et al., 2018).

2.5 Hypothese und Ziele

Die BPD ist eine Erkrankung, die durch die Exposition Frühgeborener gegenüber Beatmung, sowie erhöhten Sauerstoffkonzentrationen induziert wird. Die betroffenen Lungen weisen insgesamt weniger Alveolen, dickere Septen und weniger Gefäße auf. Da diese Veränderungen jenseits der neonatalen Phase persistieren, ist von einer verminderten Regenerationskapazität auszugehen. Die AT2 als Progenitorzelle unterstützt regenerative Prozesse der Alveole. In Vorarbeiten konnte in einem neonatalen Modell der beatmungsinduzierten Lungenschädigung nicht nur gezeigt werden, dass ein BPD-ähnlicher Phänotyp mit einem Verlust von Klf4 assoziiert ist, sondern auch, dass eine reduzierte Expression von Klf4 das Überleben von murinen Lungenepithelzellen (MLE-12 mit AT-Charakteristika) reguliert (Alejandre Alcazar et al., 2018). Basierend auf diesen Vorarbeiten, haben wir folgende zentrale Hypothese in einem komplementären experimentellen Modell der BPD basierend auf Hyperoxie aufgestellt:

Eine AT2-spezifische Deletion von Klf4 reguliert das Lungenwachstum in neonatalen Mäusen mit Hyperoxie-induzierter Lungenschädigung.

Um diese Hypothese näher zu beleuchten, wurden folgende drei Ziele adressiert (Abb.7) :

1. **Quantitative histomorphometrische Untersuchung muriner neonataler Lungen mit AT2-spezifischer Deletion von Klf4.**
2. **Analyse der neonatalen Lungenmatrix bei AT2-spezifischer Deletion von Klf4.**
3. **Darstellung von Überleben & Differenzierung der AT2 nach AT2-spezifischer Deletion von Klf4.**

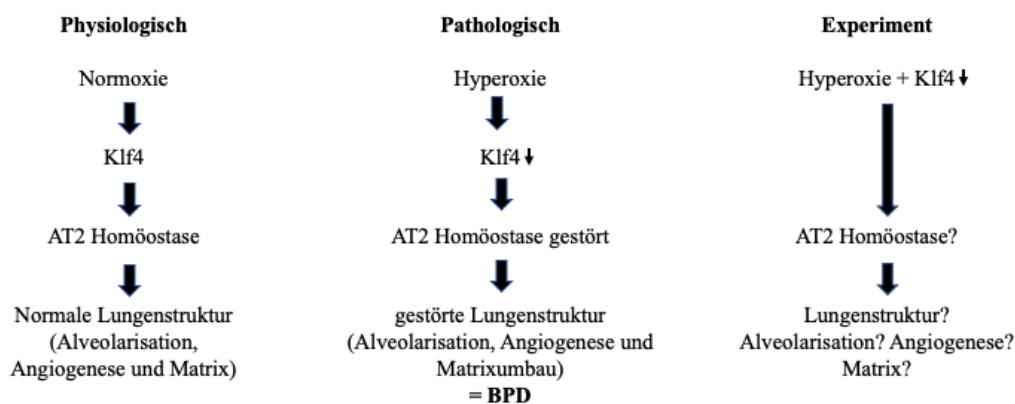


Abbildung 7: Bildliche Darstellung der Hypothese und der Ziele.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.11 Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Bestellnummer	Hersteller
Acetic acid solution 100 %	#3738.4	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
4 % Paraformaldehyde (PFA)	#P0873	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Antibody diluent	#AL 120R100	DCS (Hamburg, Deutschland)
Biotin-Blocking-System	#X059030-2	Dako (Santa Clara, Kalifornien, USA)
Citrate pH 6 Target Retrieval Solution	#S2369	Dako (Santa Clara, Kalifornien, USA)
DNase I	#DN-25	Sigma-Aldrich (St.Louis, Missouri, USA)
dNTP Mix (je 10 mM)	#R0193	Thermo Fischer Scientific = TFS (Waltham, Massachusetts, USA)
EDTA stop solution	#A263A	Promega (Fitchburg, Wisconsin, USA)
Eosin G Lösung 0,5 % wässrig	#X883.2	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol (EtOH) (>99.8 %)	#9065.2	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol (EtOH) (70 %)	#2202.5000	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Fettstift		
Fluoromount	#F4680-25ML	Sigma-Aldrich (St.Louis, Missouri, USA)
Glycine 300mM	#3908.3	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
GoTaq® qPCR Master Mix, 2X	#A600A	Promega (Fitchburg, Wisconsin, USA)
Hydrochloric acid (HCl) 32 %	#P074.3	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Hämatoxylinlösung sauer (Mayer)	#T865.2	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Isopropanol (>99,8 %)	#6752.4	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Neoclear	#CAS 64741-65-7	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Neo-Mount	#1.09016.0500	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Oligo-dT Primer (16T)	verschieden	Eurofins/MWG (Ebersberg, Deutschland)
PBS-Puffer	#L182-50	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Phosphomolybdic acid solution 0,2 %	#PQA250	ScyTek Laboratories (Logan, Utah, USA)
Picro-Sirius-Red-Solution (SRC-I)	#SRS250	ScyTek Laboratories (Logan, Utah, USA)
Platinum qPCR Supermix–UDG + Rox	#11743500	Invitrogen (Carlsbad, Kalifornien, USA)
Proteinase K	#EO 0491	Fermentas (Waltham, Massachusetts, USA)
Proteinase K Lösung	selbstangesetzt	
Random-Primer	#11034731001	Roche (Basel, Schweiz)
Resorcin Fuchsin	#2E-030	Waldeck (Münster, Deutschland)
Rodent decloaker	#RD913	Biocare Medical (Pacheco, Kalifornien, USA)
Sea Block	#37527	TFS (Waltham, Massachusetts, USA)
Streptavidin HRP	# P0397	Dako (Santa Clara, Kalifornien, USA)
Tatrazine	#TZQ125	ScyTek Laboratories (Logan, Utah, USA)
TBST-Puffer	selbstangesetzt	0.1M NaCL, 10mM Tris, 0.1% Tween 20, pH 7.5
TRI Reagent	#T9424	Sigma-Aldrich (St.Louis, Missouri, USA)
Tween-20	#P1379	Sigma-Aldrich (St.Louis, Missouri, USA)
Urea hydrogen peroxide tablets	#76411	Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Water high performance liquid chromatography (LC-MS Grade) LiChrosolv® (HPLC grade H ₂ O)	#115333	Merck (Darmstadt, Deutschland)
--	---------	--------------------------------

3.12 Antikörper

3.121 Primäre Antikörper

Antikörper	Bestellnummer	Hersteller
α-SMA	#sc53142	Santa Cruz (Santa Cruz, Kalifornien, USA)
α-SMA biotin markiert	#125057	Abcam (Cambridge, UK)
DAPI	#10236276001	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Klf4	#AF3158	R&D Systems (Minneapolis, Minnesota, USA)
Pro-SftpC	#AB3786	EMD Millipore (Burlington, Massachusetts, USA)
vWF	#20030046	Dako (Santa Clara, Kalifornien, USA)

3.122 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Bestellnummer	Hersteller
Goat-anti-rabbit, DyLight 488	#111-485-003	Jackson ImmunoResearch (West Grove, Pennsylvania, USA)
Goat-anti-mouse DyLight 488	#115-485-003	Jackson ImmunoResearch (West Grove, Pennsylvania, USA)
Goat-anti-rabbit Cy3	#111-165-003	Jackson ImmunoResearch (West Grove, Pennsylvania, USA)
Goat-anti-mouse Cy3	#115-165-003	Jackson ImmunoResearch (West Grove, Pennsylvania, USA)

3.13 Labormaterial

Material	Typ	Hersteller
96 Well Platte Objektträger	Vision Plate 96 Superfrost Plus	4titude (Wotton, England) Thermo Fischer Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Deckgläschen	24 x 50 mm	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

3.14 Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Folienschweiß- gerät		4titude (Wotton, England)
Heizblock	TK-23	Hettich (Tuttingen, Deutschland)
Heizplatte	ND-H500	Bartscher (Salzkotten, Deutschland)
Heizschrank	UM100	Memmert (Schwabach, Deutschland)
Kühlplatte	COP 30	Medite (Burgdorf, Deutschland)
Mikroskop	BX43	Olympus (Tokyo, Japan)
Mikroskop	HBO50- Axiovert25	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Mikrotom	2035 Biocut	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Vortexer	VTX-3000	LMS Laboratory & Medical supplies (Tokyo, Japan)
Waage	ES320A	Precisa (Dietikon, Schweiz)
Wasserbad	TFB 55	Medite (Burgdorf, Deutschland)

Slidescanner	SCN400	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Zentrifuge	Rotina 420 R	Hettich (Tuttingen, Deutschland)

3.15 Software

Verwendung	Software	Hersteller
RAC, Septendicke	ImageJ (1.52a)	Wayne Rasband (NIH) (Bethesda, Maryland, USA)
Snapshots	ImageScope (12.0.1.530)	Aperio (Leica) (Wetzlar, Deutschland)
MLI	CellD 3.4	Olympus (Tokyo, Japan)
Statistik	Prism 7.03	Graphpad (San Diego, Kalifornien, USA)

3.16 Kits

Kit	Bestellnummer	Hersteller
Goat-on-Rodent HRP-Polymer	#GHP516	Biocare Medical (Pacheco, Kalifornien, USA)
In situ Cell Death Detection Kit, Flourescein	#11684795910	Roche (Basel, Schweiz)
MaxBlock™ Autofluorescence Reducing kit	#MB-L	Dianova (Hamburg, Deutschland)
Tyramide Super Boost Kit Alexa Fluor 555	#B40933	TFS (Waltham, Massachusetts, USA)

3.17 Primer

3.171 TaqMan Primer Maus

Primer	Zusammensetzung
<i>Cdh5</i> (VE-Cadherin)	For 5'-TGGCCAAAGACCCTGACAAG-3' Rev 5'-TCGGAAGAATTGGCCTCTGT-3' Taq 5'-CTCAGCGCAGCATCGGGTACTCCAT-3'
<i>Vegfa</i>	For 5'-AGAAGTCCCATGAAGTGATCAAGTT-3' Rev 5'-CACAGGACGGCTTGAAGATGT-3' Taq 5'-TACCAGCGAAGCTACTGCCGTCCGAT-3'
<i>Aqp5</i>	For 5'-TCACTGGGTCTTCTGGGTAGGA-3' Rev 5'-CTGGCTCATATGTGCCTTTGAC-3' Taq 5'-TACTTCTACTTGCTTTTCCCCTCCTCGCTG-3'

3.172 SYBR Primer Maus

Primer	Zusammensetzung
<i>Col1a1</i>	For 5'-GCAGTGCTGTTGCGATCTTG-3' Rev 5'-CAGAGGGACAGAGCACAGCTT-3'
<i>Col3a1</i>	For 5'-GGTGGTTTTTCAGTTCAGCTATGG-3' Rev 5'-TTTTTGCAGTGGTATGTAATGTTCTG-3'
<i>Col4a2</i>	For 5'-GGAGTTTGTGGATCGGATATTCA-3' Rev 5'-GGAGTTTGTGGATCGGATATTCA-3'
<i>Col6a1</i>	For 5'-GGTGGCCACACAGGACATC-3' Rev 5'-GGTGTGCGAGCACGAAGAATAGA-3'
<i>Col18a1</i>	For 5'-CCACCCTCTCACTTGCTCATACT-3' Rev 5'-CACGCATGCCTCCAGACA-3'
<i>Slug</i>	For 5'-CCTCACCTCGGGAGCATACA-3' Rev 5'-GGCCACTGGGTAAAGGAGAGT-3'
<i>Pdgfra</i>	For 5'-AGGAAGAAGCCAAAATTGAAAGAG-3' Rev 5'-GCTCATCTCACCTCACATCTGTCT-3'
<i>Cdh2</i> (N-Cadherin)	For 5'-CTCCAGAACCCAACTCAATTAACA-3' Rev 5'-GAGCTGAGCAAATCACCATTAAG-3'
<i>Hopx</i>	For 5'-CGGAGGACCAGGTGGAGAT-3' Rev 5'-GCGCTGCTTAAACCATTTCTG-3'
<i>Popdc3</i>	For 5'-GCACTGCTACGCCATGCA-3' Rev 5'-TCGACTGTCACTCTGATTCTTCCT-3'
<i>Akap5</i>	For 5'-TCGCCATAGAAGTGGAAATTAGAAA-3' Rev 5'-CCGTGATCACCTTAGTCTCCTTTT-3'
<i>Igfbp2</i>	For 5'-GCCCCCTGGAACATCTCTACT-3' Rev 5'-AGAGACATCTTGCACTGCTTAAGGT-3'
<i>Acacab</i>	For 5'-CACCAGGAAGTGGATGAAGTCAT-3' Rev 5'-GAAGTGCACGCCTTACTGAAGA-3'
<i>Snip1</i>	For 5'-TCCATCGGCAGAGTGCATAC-3' Rev 5'-GCTTTGAGCAAGAGGGATGGT-3'
<i>Axin2</i>	For 5'-TGTCTGGCAGTGGATGTTAGAGA-3' Rev 5'-GGCAGACTCCAATGGGTAGCT-3'
<i>Apelin</i>	For 5'-CCCCTTTTAAGTCCTTTGGCATCT-3' Rev 5'-CTCGCTAAAAAGTCCCGAAAGTAT-3'
<i>Sftpa</i>	For 5'-TCAAACATCAGATTCTGCAAACAA-3' Rev 5'-TGAAGTCCCATTTGGTGGAA-3'
<i>Sftpb</i>	For 5'-TCAAACATCAGATTCTGCAAACAA-3' Rev 5'-TGAAGTCCCATTTGGTGGAA-3'
<i>Sftpc</i>	For 5'-CCTCGTTGTCGTGGTATTGTA-3' Rev 5'-GCTCATCTCAAGGACCATCTCAGT-3'
<i>Sftpd</i>	For 5'-CAGCAGATGGAGGCCTTAAAA-3' Rev 5'-GGGAACAATGCAGCTTTCTGA-3'
<i>Cdkn1a</i> (P21)	For 5'-GAACATCTCAGGGCCGAAAA-3' Rev 5'-CGTGGGCACTTCAGGGTTT-3'

3.2 Methoden

3.21 Tierversuche

3.211 experimentelles Setup für Hyperoxie-induzierte Lungenschädigung

Alle Tierexperimente wurden durch Prof. Dr. Dr. Miguel A. Miguel Alcazár (Klinik und Poliklinik für Kinder und Jugendmedizin - Translationale Experimentelle Pädiatrie - Experimentelle Pneumologie) und Dr. Jasmine Mohr (PhD) durchgeführt. Eine Genehmigung seitens des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen liegt vor (LANUV NRW-AZ.2015.A120; 2020.A095). Der genetische Hintergrund der Tiere war C57BL/6 B6 (Laboratory, 2021a).

Die Mäuse wurden in temperatur-/ und feuchtigkeitskontrollierten Räumen bei einem 12 h-Tag-Nacht-Rhythmus gehalten und mit Wasser und Futter *ad libitum* versorgt.

Innerhalb von 6-12 h nach Geburt wurden die neugeborenen Mäuse randomisiert und gleichmäßig auf eine Hyperoxiekammer (HYX; 85 % O₂) und eine Kammer mit Normalbedingungen (NOX; 21 % O₂) mit dem jeweiligen Muttertier verteilt. Um den Effekt durch das Muttertier zu minimieren, rotierten die Muttertiere täglich zwischen NOX und HYX. Die Exposition gegenüber 85 % O₂ wurde in einer 90 × 42 × 38 cm großen Plexiglaskammer bei konstantem O₂-Fluss von 3,5 l/Min. durchgeführt. Die Sauerstoffkonzentrationen wurden kontinuierlich mittels *miniox II monitor* (Catalyst Research, Owing Mills, MD) kontrolliert. Dieses Modell ist ein etabliertes Modell der BPD-Forschung (Tibboel et al., 2013; Barbara B Warner et al., 1998; Zhang et al., 2011) und wird in unserem Labor standardmäßig angewandt. Als „Wildtyp“ werden genetisch modifizierte Mäuse bezeichnet, bei denen es trotz Tamoxifengabe zu keinem Knockout von Klf4 gekommen ist (*Tierverzeichnis im Anhang*).

Daraus ergeben sich folgende vier Versuchsgruppen:

1. Klf4 - Wildtyp unter Normoxie gehalten: **NOX WT** (*n*=5-6)
2. Klf4 - Wildtyp unter Hyperoxie gehalten: **HYX WT** (*n*=6)
3. Klf4 - Knockout unter Normoxie gehalten: **NOX Klf4^{-/-}** (*n*=5-6)
4. Klf4 - Knockout unter Hyperoxie gehalten: **HYX Klf4^{-/-}** (*n*=6)

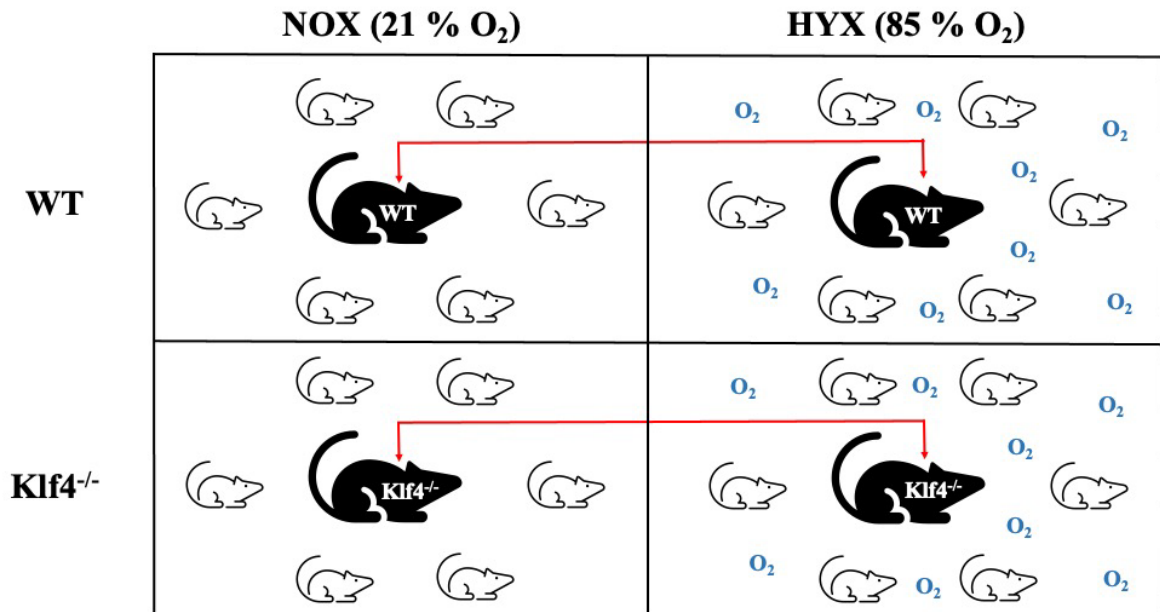


Abbildung 8: Tiermodell.

Die Muttertiere (schwarz) rotieren täglich zwischen Hyperoxie (85 % O₂, 3,5 l/min) und Normoxie (21 % O₂) innerhalb der genetischen Gruppe.

Die Kinder (weiß) bleiben in der jeweiligen Kammer bis zur Euthanasierung an P21. Die verschiedenen genetischen Gruppen (WT vs. Klf4^{-/-}) werden getrennt voneinander gehalten.

3.212 Generation eines AT2-spezifischen Knockouts von Klf4

Um die Funktion von Klf4 in AT2 zu untersuchen, wurde ein AT2-spezifischer Klf4-Knockout mit Cre-Loxp-System generiert.

Das Cre-Loxp-System ist ein etabliertes laborchemisches Verfahren, mit dem ein konditionaler Knockout einer mit Loxp flankierten DNA-Region möglich ist (Gossen & Bujard, 1992; Knippers, 2006; Nat Sternberg & Daniel Hamilton, 1981). In der Lungenforschung hat sich ein Mausmodell mit SFTPC-abhängiger Cre-Rekombinase etabliert (Sftpc-Cre-ERT). Das hinter einem Sftpc-Promotor liegende Gen für die Cre-Rekombinase wird unter Anwesenheit eines mutierten, Tamoxifen-induzierbaren Östrogenrezeptors (ERT) exprimiert (Gui et al., 2012). SFTPC wird in AT2 sezerniert und ist damit ein AT2-Marker (Martinez-Calle et al., 2018; Weaver et al., 2002). Durch Injektion von Tamoxifen erfolgt daher eine AT2-spezifische Aktivierung der Cre-Rekombinase. Ohne Tamoxifen ist das ER durch ein anderes Protein, z.B. heat shock protein 90 (HSP90), besetzt. Dieses Protein verhindert die Migration der Cre-Rekombinase in den Zellkern. Tamoxifen verdrängt dieses Protein aus seiner Bindungsstelle und ermöglicht so die Translokation der Rekombinase in den Nukleus (Hayashi & McMahon, 2002).

Die Cre-Rekombinase führt zu einer Exzision von Exon zwei und drei des Klf4 Gens und einer Rastermutation in Exon vier und damit zu einer zellspezifischen Deletion von Klf4 in AT2 (Aquila et al., 2018).

Mäuse mit heterozygoter Expression der SFTPC-abhängigen Cre-Rekombinase (SFTPC-Cre^{+/+}-ERT2-rtTA) wurden mit Mäusen mit Loxp-gefloxtem Klf4 Zielgen (B6.129S6-Klf4^{tm1/KhK/mmmh} = Klf4^{fl/fl}) und Mäusen, die ein Loxp-gefloxtes YFP-Reporter gen tragen (R26R-EYFP = YFP^{+/+}), gekreuzt. Die intraperitoneale Injektion von 0.1 mg Tamoxifen (gewichtsadaptiertes Injektionsvolumen von 0.01 ml/g KG) erfolgte an P3. Neben einer Deletion von Klf4, führt die Aktivierung der Cre-Rekombinase durch Tamoxifen zu einer Exzision des vor dem Reporter gen YFP liegenden Stopp-Codons, sodass bei erfolgreichem Knockout nun YFP exprimiert wird. (Abb. 9)

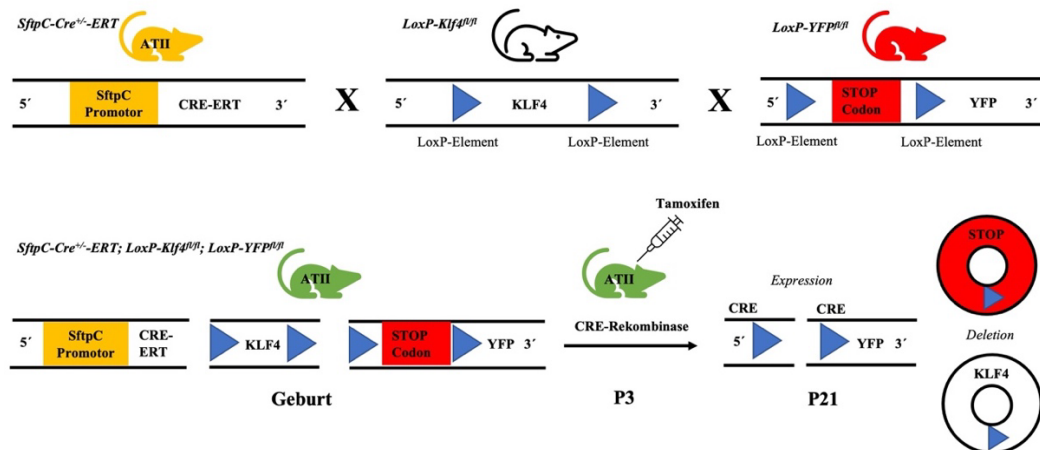


Abbildung 9: Übersicht CreLoxp.

3.213 Tötung der Tiere und Paraffineinbettung

Die Euthanasierung erfolgte wie beschrieben (Alejandre-Alcázar et al., 2007; Alejandre-Alcázar et al., 2008) an P21. Unter intraperitonealer Narkose mit Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (10 mg/kg Körpergewicht) in Natriumchlorid (NaCl) erfolgte die Euthanasierung durch Punktion und Ausbluten der Aorta abdominalis. Das Abdomen wurde mit einem medialen Hautschnitt und das Bauchfell mit einer stumpfen Schere eröffnet. Es wurde eine mit 4-0 Faden geflochtene chirurgische Struktur zwischen Trachea und Ösophagus platziert und der rechte Lungenflügel wurde mit einem chirurgischen Knoten vom Rest der Lunge getrennt. Nach Eintritt des Herzstillstandes wurde die rechte Lungenhälfte für spätere Gen- und Proteinanalysen entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die linke Lungenhälfte diente den histologischen Untersuchungen. Hierfür wurde die Luftröhre in der Nähe des Kehlkopfes zwischen den Luftröhrenknorpeln eingeschnitten, mit einer intravenösen Kanüle intubiert (26 G) und der linke Lungenlappen wurde bei einem konstanten Druck von 20 cmH₂O mit einem Fixiermittel [z.B. 4 % (Masse/Volumen) Paraformaldehyd (PFA)] insuffliert. Zur Fixierung wurde das PFA für 10 Min. bei RT belassen. Im Anschluss wurde die Trachea ligiert, die Lungen exzidiert und 24 h lang bei 4° C im Fixiermittel gelagert. Die Proben wurden für 24-72 h auf 70 % Isopropanol übertragen, gefolgt von einer Dehydrierung der Probe durch

schrittweise Inkubation in EtOH- und Isopropanol-Lösungen unter Verwendung einer Gewebeeinfiltrationsmaschine (Leica ASP 300s) (Tabelle 2). Zur histologischen Auswertung wurden die Lungen mit einem Paraffiniergerät (Leica EG 1150H) in Blöcken eingebettet und sofort mit einer Kühlplatte (Leica EG 1150C) abgekühlt.

Tabelle 2: Setup des Gewebeprozessors zur Paraffineinbettung.

Chemikalie	Inkubationszeit
70 % EtOH	30 Min.
99.5 % Isopropanol	3x30 Min.
99.5 % Isopropanol	45 Min.
99.5 % Isopropanol	3x75 Min.
Xylol	15 Min.
Paraffin (55-65°C)	3x120 Min.

3.22 Histologische Untersuchungen

3.221 IUR-Schneiden der Lungen

Die in PFA fixierten Lungen wurden durch **Isotrop Uniform Randomisiert (IUR)** mithilfe eines Rotationsmikrotoms (Leica 2035) in 3 µm dicke Schnitte geschnitten (Abb.10). Dafür wurden die Blöcke mit einem Orientator in einem zufälligen individuellen Winkel auf dem Kunststoffträger fixiert. So erfolgt eine zufällige dreidimensionale Ausrichtung der Schnittebene des Gewebes. Es handelt sich hierbei um eine beschriebene und etablierte Methode des randomisierten Gewebeschnidens (Blutke & Wanke, 2018).

Dann wurde vorsichtig bis an das Lungengewebe herangeschnitten. Vor der ersten Serie wurde eine zufällig gewürfelte Zahl an Lungenschnitten verworfen. Pro Tier wurden jeweils drei Serien à mindestens 15 aufeinanderfolgenden Schnitten angefertigt und zwischen den Serien wurden 40 Schnitte verworfen. Die Schnitte wurden mithilfe eines Wasserbades (*Medite Tissue Flotation Bath TFB55*) geglättet, auf die beschichteten Objektträger gezogen und über Nacht in einem Schlittengestell in den Trockenschrank gestellt. Insgesamt wurden pro Tier mindestens 45 Schnitte angefertigt.

Die Schnitte wurden dann mit unterschiedlichen immunhistochemischen oder histologischen Färbungen genauer untersucht. Die Auswahl der zu färbenden Schnitte erfolgte zufällig mittels einer randomisiert ermittelten Zahl zwischen 1-3 (Serie) und 1-15 (Schnitt der Serie). Hierfür half die Website *random.org*, die eine zufällige Zahl generiert.

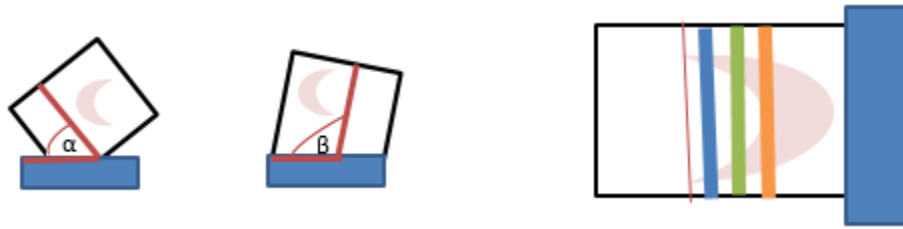


Abbildung 10: Isotrop Uniform Randomisiert (IUR).

links: randomisierte Fixierung der Paraffinblöcke auf dem Kunststoffträger in verschiedenen Winkeln (α und β) rechts: Schneiden der Paraffinblöcke am Mikrotom. rote Linie: Beginn des Gewebes, danach Verwerfen einer gewürfelten Zahl an Schnitten. Serie 1 (blau), Serie 2 (grün), Serie 3 (orange). Dazwischen werden je 40 Schnitte verworfen.

3.222 Färbungen

3.2221 H&E-Färbung

Die H&E Färbung ist die wichtigste histologische Übersichtsfärbung, die aus den Farbstoffen Hämatoxylin und Eosin besteht. Eine Färbung mit saurem Hämalaun wurde von Mayer 1920 etabliert und beschrieben. Hämatoxylin ist eine Farbvorstufe und wird durch Oxidation zum positiv geladenen basischen Kernfarbstoff Hämalaun, der den basophilen Nukleus blau anfärbt. Eine Färbung des Cytoplasmas wird durch die zugegebene Zitronensäure verhindert, die dem Cytoplasma eine positive Ladung verpasst. Eosin ist die wichtigste Gegenfärbung, durch die das acidophile Cytoplasma rot angefärbt wird. Durch Ansäuerung der Eosinlösung mit Eisessig (100 % Essigsäure), bekommt das Cytoplasma eine positive Ladung (H^+ Ionen vermittelt) und wird so anfärbbar für das negativ geladene Eosin (Cardiff et al., 2014; Chan, 2014; M. Mulisch & Welsch, 2010).

Es wurden zwei Schnitte pro Tier nach diesem Protokoll gefärbt.

Zunächst wurden die Lösungen angesetzt. Dafür wurden die gebrauchsfertige Hämalaunlösung sauer (nach Mayer) und die Eosinlösung filtriert. Zum Eosin wurde ein Tropfen 100 % Essigsäure pro 100 ml hinzugefügt.

Danach wurden die Schnitte dreimal fünf Min. in Neoclear entparaffiniert und daraufhin mit einer absteigenden Alkoholreihe je eine Min. (100 % EtOH - 96 % EtOH - 80 % EtOH - 70 % EtOH) gewässert. Nach kurzem Abspülen in aqua dest (a.d.) wurden die Schnitte 4 Min. lang in der Hämalaunlösung gefärbt. Daraufhin wurden die Schnitte kurz in a.d. abgewaschen und dann unter fließendem Leitungswasser fünf Min. lang gebläut. Die zweiminütige Färbung mit Eosin erfolgte nach kurzem Abwaschen der Schnitte. Nach Abwaschen des Eosins, wurden die Schnitte der aufsteigenden Alkoholreihe (70 % EtOH - 80 % EtOH - 96 % EtOH - 100 % EtOH) zur Dehydration zugeführt und nochmals zweimal fünf Min. in Neoclear geklärt. Anschließend erfolgte das Eindeckeln der Schnitte mit NeoMount.

Die Schnitte wurden über Nacht getrocknet, am nächsten Tag gereinigt und im Slidescanner eingescannt.

3.2222 Hart's stain

Das sogenannte Hart's stain, eine Elastika-/ bzw. Resorcinfuchsinfärbung nach Weigert, wurde 1898 von dem deutschen Pathologen Carl Weigert etabliert. Die Färbung färbt alle Komponenten des elastischen Fasersystems, nämlich das grobe Elastin sowie die zarteren Elastinfasern und die Mikrofibrillenbündel an der Oberfläche der elastischen Fasern, die sogenannten Oxytalanfasern, violett an. Dabei erfolgt die Anfärbung über die Disulfidgruppen (Cystin) der Mikrofibrillen auf der Oberfläche der elastischen Fasern; das rein zentral gelegene Elastin ist nicht anfärbbar. Es handelt sich um eine regressive Färbung, d.h. es wird erst überfärbt und dann durch Differenzierung überschüssige Färbelösung ausgewaschen. Die Resorcinfärbung kann gut mit einer Kernfärbung bzw. Gegenfärbung kombiniert werden; in unserem Fall wurde eine Tartrazine-Gegenfärbung durchgeführt (Mulisch & Welsch, 2010). Tartrazine (E102) ist ein gelborangener Farbstoff, der in der Lebensmittel-, Pharmazie - Kosmetik- und Textilindustrie Einsatz findet. Aufgrund gesundheitsschädlicher Wirkung, ist er jedoch in einigen Ländern für diese Zwecke nicht mehr zugelassen (Rovina et al., 2017). In diesem Fall wurde mithilfe von Tartrazine der Schnitt gelb gefärbt, sodass sich das violette Elastin gegen das gelb gefärbte restliche Lungengewebe abhebt.

Von jedem Tier wurde zunächst ein Schnitt nach diesem Protokoll gefärbt.

Zunächst wurden die Schnitte dreimal 10 Min. in Neoclear entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (100 % EtOH- 96 % EtOH- 80 % EtOH- 70 % EtOH) je eine Minute hydriert. Nach kurzem Abspülen in a.d. wurden die Schnitte über Nacht in einer Küvette mit Hart's Lösung gefärbt. Die Hart's Lösung wurde angesetzt aus 1 Volumen gebrauchsfertiger Resorcin- Fuchsin- Lösung nach Weigert in 9 Volumen 1 % HCL in 70 % EtOH. Am nächsten Tag erfolgte eine Differenzierung der Schnitte durch je kurzes Abwaschen in 96 % EtOH, 1 % HCL in 70 % EtOH, Leitungswasser und schließlich a.d.. Es folgte eine 30 Min. Gegenfärbung in 0,5 % Tartrazine in 0,25 % Essigsäure. Hierfür wurden 1mL Tartrazine und 0,5mL 100 % Essigsäure zu einer mit 200mL a.d. gefüllten Küvette gegeben. Kurzes Abwaschen in 96 % EtOH und eine Dehydrierung in 96 % EtOH für eine Min., gefolgt von zwei Min. in 100 % EtOH. Abschließend wurde zweimal vier Min. in Neoclear geklärt und die Schnitte wurden mit Neomount eingedeckelt.

3.2223 Sirius-Rot

Zur Darstellung von Kollagen wurde die Picro Sirius-Rot Färbung angewandt. Durch diese Färbung kann Kollagen sensitiv angefärbt werden und ist anderen Kollagenfärbungen wie der Trichrome-/ oder Fuchsin-Färbung aufgrund seiner leichten und schnellen Durchführbarkeit sowie langen Haltbarkeit überlegen. Die Sirius-Rot Färbung färbt Kollagen Typ 1 (dicke Fasern) und Typ 3 (dünne Fasern) rot, Zytoplasma und Muskelgewebe gelb (Chen et al., 2013; Huang et al., 2013; Junqueira et al., 1979; Segnani et al., 2015).

Von jedem Tier wurden zwei Schnitte nach diesem Protokoll gefärbt.

Entparaffinieren der Schnitte für dreimal 10 Min. in Neoclear. Rehydrierung der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (100 % EtOH- 96 % EtOH- 80 % EtOH- 70 % EtOH) und a.d. für je 1 Min. Inkubation der Schnitte mit Phosphomolybdic Acid Solution 0,2 % für 4 Min., gefolgt von kurzem Abwaschen in a.d.. Nun erfolgte das Färben der Schnitte für 75 Min. in *Picro-Sirius-Red Solution* (Dianova (SRC -I)). Daraufhin wurden die Schnitte zweimal kurz in 0,5 %ige Essigsäure gedippt und zweimal 30 Sek. in 100 % EtOH entwässert. Nach Klären in Neoclear für zweimal 30 Sek. wurden die Schnitte mit Neomount eingedeckelt.

3.2224 von Willebrand Faktor (vWF) + α -SMA

Diese Färbung wurde freundlicherweise in Kooperation mit der Pathologie der Uniklinik Köln von Marion Müller (MTA) durchgeführt.

Zunächst wurden die Schnitte für 25 Min. in *Citratpuffer* (pH 6) gekocht. Danach wurden sie mit *Dako® Biotin Blocking solution* behandelt: für 10 Min. mit *Avidin* inkubiert, 5 Min. mit TBS-Puffer gespült und daraufhin weitere 10 Min. mit Biotin geblockt. Der alpha-SMA-AK wurde 1:200 verdünnt und über 30 Min. bei Raumtemperatur einwirken gelassen. Nach 5 Min. Abspülen mit TBS wurden die Schnitte mit *Dako® Streptavidin HRP 1:300* in Tris-Puffer behandelt. Erneutes Spülen in TBS über 5 Min., danach wurden die Schnitte mit *3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-Substratlösung* (DAB) behandelt und daraufhin erneut mit TBS gespült. DAB gibt dem alpha-SMA die braune Farbe. Anschließend erfolgt die Färbung des VW-Faktors mit 1:200 verdünntem primärem AK und die Inkubation über 30 Min. bei RT. Nach 5 Min. Waschen mit TBS wurde mit *N-Histofine® Simple Stain AP* gearbeitet. Hierbei handelt es sich um ein Polymer aus Aminosäuren, das mit alkalischer Phosphatase (AP) und einem sekundären Antikörper beladen ist (Biosciences, 04/2005; INC, 2021). Nach erneutem Spülen mit TBS (5 Min.), wurde das rote Fluorophor *Zytomed® Fast Red* hinzugegeben. Es wurde 5 Min. mit a.d. gespült und das restliche Gewebe mit Hämalaun gefärbt. Danach wurden die Schnitte eingedeckelt.

3.2225 Immunfluoreszenzfärbungen

Mithilfe von Immunfluoreszenz (IF), können bestimmte Antigene spezifisch dargestellt werden. Es gibt zwei verschiedene Formen der IF; direkte (primäre) und indirekte (sekundäre) IF. Bei der direkten IF fluoresziert der primäre Antikörper (AK), der gegen das Ziel-Antigen gerichtet ist, selber. Bei der indirekten IF fluoresziert der sekundäre AK, der gegen den primären AK gerichtet ist. Dabei ist zu beachten, dass der sekundäre AK gegen die Spezies des primären AK gerichtet ist. Zum Beispiel wird ein primärer IgG Maus-AK durch einen fluoreszierenden sekundären *Goat-anti-Mouse-IgG-AK* markiert. Um Ko-Lokalisationen aufzuzeigen, kann eine

IF gegen verschiedene Antigene durchgeführt werden, wobei die primären AK nicht aus derselben Spezies stammen sollten (z.B. Maus und Hase) oder wenn aus derselben Spezies stammend, muss es sich um ein unterschiedliches Immunglobulin (Ig) handeln (z.B. IgG und IgE). Bei dem sekundären AK ist zu beachten, dass er gegen das Ig und die Spezies des primären AK gerichtet ist und dass es sich um unterschiedliche Farben der Fluoreszenz handelt (Donaldson, 2001). Das Mikroskop in unserem Labor erkennt die Kanäle grün=488, rot = Cy3 und blau, sodass mit diesen Farben gearbeitet wurde.

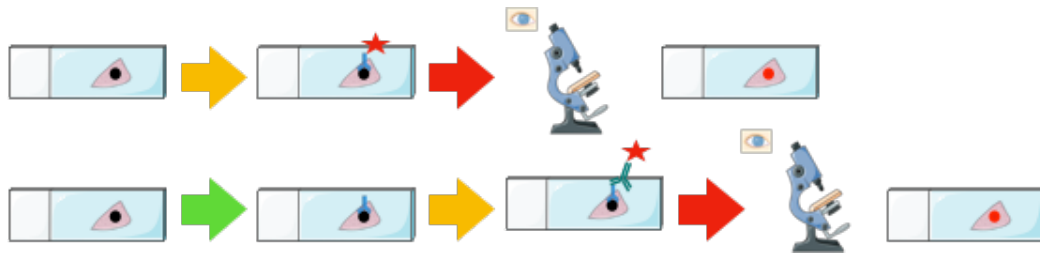


Abbildung 11: schematischer Ablauf der Immunfluoreszenz-Färbung (IF).

Oben: direkte IF. Der primäre AK (blau, z.B. Maus-IgG) bindet das Antigen und fluoresziert.

Unten: indirekte IF. Der primäre AK (blau, z.B. Maus-IgG) bindet das Antigen. Ein sekundärer fluoreszierender AK (grün, z.B. Ziege-IgG) bindet den primären AK. Unter dem Mikroskop erkennt man das Antigen z.B. als rot fluoreszierende Struktur.

Die IF-Färbungen wurden nach dem folgenden Protokoll durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben, wurden auf jeden Schnitt 50 µL AK pipettiert. Pro Tier wurde 1 Schnitt gefärbt.

Tag 1. Zunächst wurden die Schnitte für dreimal 10 Min. in Neoclear entparaffiniert. Während die Schnitte in der letzten Neoclear-Küvette standen, wurde die Küvette mit Rodent Decloaker für 10 Min. im Dampfgarer vorgewärmt (Klf4 und α -SMA) bzw. der 37° C Inkubator angeschaltet (TUNEL) und der Peroxidaseblock (3 % H₂O₂ = 1 Tbl. in 5 mL a.d.) angesetzt. Außerdem wurde die feuchte Kammer vorbereitet; hierfür wurde eine Objektträgerbox mit feuchten Tüchern ausgelegt. Danach folgte die absteigende Alkoholreihe (100 % EtOH – 96 % EtOH – 80 % EtOH – 70 % EtOH) zur Rehydrierung der Schnitte und kurzes Waschen in a.d. Nach Umrandung des Gewebes mit Fettstift, folgte die Inkubation mit *Autofluorescence reducing kit reagent A* für 5 Min. bei Raumtemperatur (RT). Danach wurden drei Waschschrte durchgeführt: 1 Min. in 60 % EtOH, 5 Min. in a.d. und zweimal 3 Min. in PBS. Nun wurde für die verschiedenen Färbungen unterschiedlich vorgegangen.

KLF4 + α -SMA:

Die Schnitte wurden in 300mM Glycin für 20 Min. inkubiert und dann 25 Min. in Rodent Decloaker gekocht. Daraufhin wurde die Fettgewebsumrandung erneuert und 10 Min. mit Peroxidaseblock inkubiert. Nach kurzem Waschen in PBS, wurde mit Seablock für 1 h blockiert. Zum Schluss wurde der primäre AK in Antibody Diluent verdünnt und über Nacht (ÜN) bei 4° C in feuchter Kammer inkubiert. (Tabelle 3)

α -SMA + SFTPC: α -SMA-AK 1:200
KLF4 + SFTPC: Pro-SFTPC-AK 1:500

Tag 2. Zunächst wurde der primäre AK für dreimal 5 Min. in PBS abgewaschen. Der Fluorochrom markierte Sekundärantikörper wurde 1:500 in PBS verdünnt und für 1h bei RT in feuchter Kammer inkubiert. Ab diesem Schritt wurde im Dunkeln gearbeitet.

α -SMA + SFTPC: CY3-Goat-anti-mouse (*gam*)
KLF4 + SFTPC: 488-Goat-anti-rabbit (*gar*)

Danach wurde der Sekundärantikörper erneut für dreimal 5 Min in PBS abgewaschen. Währenddessen wurde der zweite primäre AK in Antibody Diluent verdünnt und ÜN (α -SMA) bzw. über 48 h (KLF4) bei 4° C in feuchter Kammer inkubiert.

α -SMA + SFTPC: Pro-SFTPC-AK 1:500
KLF4 + SFTPC: Klf4-AK 1:200

Tag 3 (α -SMA + SFTPC) / 4 (KLF4 + SFTPC)

Erneut wurde der primäre AK mit PBS für dreimal 5 Min. abgewaschen.

Danach wurde mit Fluorochrom-markiertem Sekundärantikörper 1:500 in PBS für 1 h bei RT in feuchter Kammer inkubiert. (α -SMA + SFTPC)

α -SMA + SFTPC: 488-Goat-anti-rabbit (*gar*)

Beziehungweise das *Tyramide Kit* angewandt. (Klf4 + SFTPC)

ZytoChem Plus Goat Probe für 15 Min.

Waschen in PBS für 1 Min.

ZytoChem Plus Goat on rodent Polymer für 15 Min.

Waschen in PBS für dreimal 5 Min.

50 μ l Tyramide working solution für 6 Min.

50 μ l Reaction stop Reagent für 6 Min.

Nachdem für dreimal 5 Min. in PBS gewaschen wurde, erfolgte die Inkubation für 10 Min. mit DAPI 1:1000, verdünnt in PBS. Dann wurden die Schnitte 1 Min. in a.d. gespült und 5 Min. mit Reagent B des *Autofluorescent reducing kits* inkubiert. Schließlich wurden die Schnitte ein letztes Mal für dreimal 2 Min. in a.d. gewaschen und in wässrigem Mountingmedium gemountet.

TUNEL:

Folgend wurden die Schnitte für 10 Min. mit 3 % H₂O₂ inkubiert und zweimal 2 Min. in PBS gewaschen. Danach wurden die Schnitte im 37° C Schrank für 18 Min. mit Proteinase K (1 μ l Proteinase K in 1 mL Proteinase K-Solution) inkubiert. Es folgte kurzes Abwaschen in a.d. und Inkubation für 1 h mit Seablock bei RT. Währenddessen wurde TUNEL vorbereitet: die

Enzyme-Solution wurde mit der Label-Solution 1:10 verdünnt. Pro Objektträger wurden 25 µL angesetzt und ab diesem Schritt wurde im Dunkeln gearbeitet. Die Schnitte wurden für 1 h im 37°C Inkubator mit TUNEL inkubiert, währenddessen wurde der primäre Pro-SFTPC-AK 1:400 mit Antibody Diluent verdünnt. Nach Waschen für dreimal 2 Min. in PBS-Tween (0,1 %) wurde der primäre Pro-SFTPC-AK auf jeden Schnitt pipettiert und bei 4° C ÜN in feuchter Kammer inkubiert.

Tag 2. Zunächst wurde der primäre Pro-SFTPC-AK für dreimal 2 Min. in PBS-T gründlich abgewaschen. Der rote CY3 markierte *gar*-Sekundärantikörper wurde 1:500 in PBS verdünnt und für 1 h bei RT inkubiert. Währenddessen wurde DAPI 1:1000 in PBS verdünnt und nach 3 Min. waschen in PBS-T erfolgte die Inkubation mit DAPI für 10 Min. Danach wurden die Schnitte in flüssigem Fluormount gemountet und direkt mikroskopiert, da das TUNEL-Signal sehr schwach ist und schnell abnimmt. Deshalb wurden jeweils nur 4 Schnitte auf einmal gefärbt (1 Schnitt pro Tier).

Ergebnis

KLF4 + SFTPC: Klf4 rot, Pro-SFTPC grün, Zellkerne blau
 α-SMA + SFTPC: α-SMA rot, Pro-SFTPC grün, Zellkerne blau
 TUNEL: apoptotische Zellen grün, Pro-SFTPC rot, Zellkerne blau

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Antikörper bei den IF-Färbungen.

	Färbung 1	Färbung 2	Färbung 3
Primäre AK	KLF4 (Cy3) #AF3158 =Maus-AK (1:200) Pro-SFTPC #AB 3786 = Hase-AK (1:500) DAPI (1:1000) #10236276001	α-SMA #sc53142 = Maus-AK Pro-SFTPC #AB 3786 = Hase-AK (1:500) DAPI (1:1000) #10236276001	TUNEL-Kit #11684795910 Pro-SFTPC #AB 3786 = Hase-AK (1:500) DAPI (1:1000) #10236276001
Sekundäre AK (1:500 in PBS)	Tyramide Kit #B40933 488 (grün) goat-anti-rabbit-AK #111-485-003	CY3 (rot) goat -anti-mouse-AK # 115-165-003 488 (grün) goat-anti-rabbit-AK #111-485-003	Cy3 (rot) goat-anti-rabbit-AK #111-485-003

3.223 Histologische Auswertungen

3.2231 Snapshots

Nach dem Einscannen der Schnitte mit *Slidescanner*, wurden mit *ImageScope* sogenannte *Snapshots* (engl. Schnappschüsse) von diesen Schnitten angefertigt. Diese wurden in 20facher Vergrößerung aufgenommen und so gewählt, dass möglichst nur Alveolen zu sehen sind und alle anderen Strukturen (Gefäße, Bronchien) weniger als 10 % des Bildinhaltes ausmachen.

3.2232 RAC

Mit der Methode *Radial Alveolar Count* (RAC), die erstmals von Emery und Mithal 1960 beschrieben wurde, kann die Anzahl an Alveolen zwischen der Öffnung eines terminalen Bronchus und der Pleura bestimmt werden (Emery & Mithal, 1960).

Dafür wurden die eingescannten, H&E gefärbten Lungenschnitte mit dem Programm *ImageScope* ausgewertet. Es wurde eine zur Pleura orthogonal verlaufende Linie von der Mitte der Öffnung des terminalen Bronchus bis zur Pleura gezogen und dann wurde die Anzahl der durch diese Linie gekreuzten Alveolen gezählt und notiert. Auf jedem Lungenschnitt wurde dies für jeden terminalen Bronchus durchgeführt und am Ende wurde ein Mittelwert bestimmt (Abb. 12).

3.2233 MLI

Mean linear intercept (MLI) ist eine Anwendung, mit der Rückschlüsse auf den Abstand zwischen zwei Septen gezogen werden können. Mit dem Programm *OlympusCellD* wurden Snapshots ausgewertet. *OlympusCellD* ermittelt automatisch die Zahl der Schnittpunkte des Lungen-Snapshots mit einem kalibrierten Gitter (Einstellungen: Typ □, Breite 20, Korrelation 1,5 %, Rauschen 2,5, Horizontal/Vertikal 50). Diese Schnittpunkte wurden manuell korrigiert.

3.2234 Septendicke und Alveolendurchmesser

Die Septendicke und der Alveolendurchmesser wurden manuell mit dem Messtool von *ImageJ* bestimmt. Pro Snapshot wurde der maximale Durchmesser und eine durchschnittliche Stelle des Septums dieser Alveole ausgemessen. Mithilfe des Durchmessers und der Formel 1 wurde die Oberfläche der Alveole berechnet.

$$O = 4 * \pi * \left(\frac{d}{2}\right)^2$$

Formel 1 für die Berechnung der Oberfläche einer Kugel (Alveole).

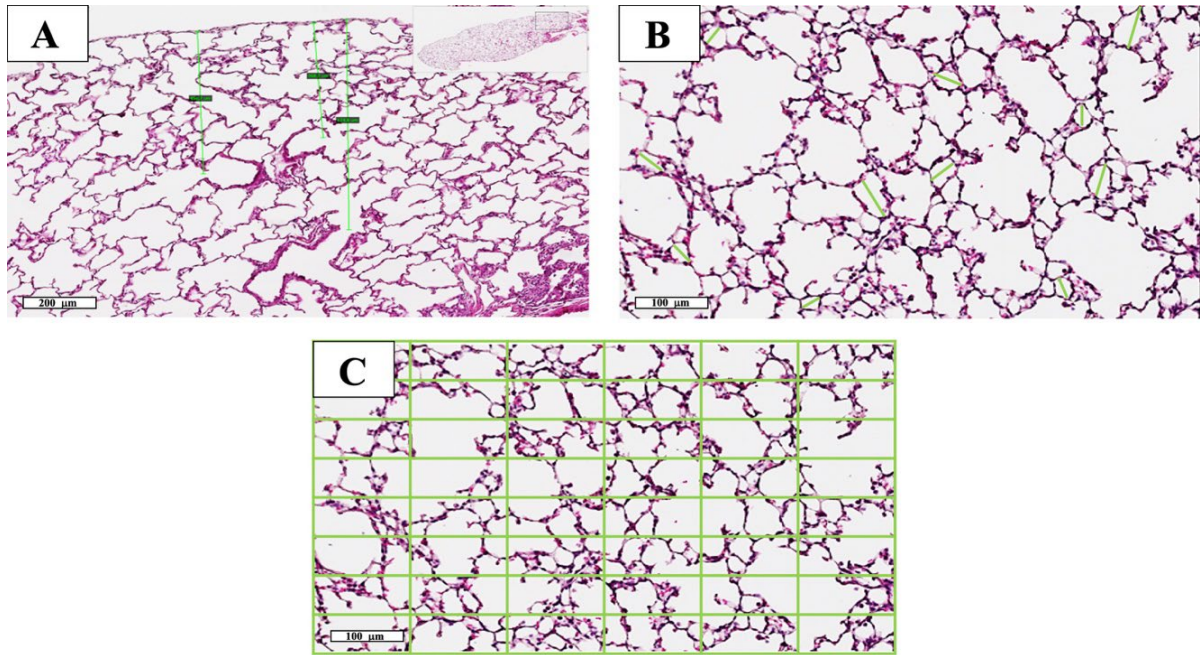


Abbildung 12: Quantitative histomorphometrische Untersuchungen (H&E).
 (A) RAC (10x) (B) Alveolendurchmesser (20x) (C) MLI (20x)

3.2235 Kollagen (Sirius-Rot)

Die Auswertung der Snapshots in 20facher Vergrößerung erfolgte mit *ImageJ*, bei dem der *Color Threshold* (*Hue* 185, *Saturation* 22, *Brightness* 116) eingestellt wurde, um zu definieren welche Rottöne das Programm als positiv bewertet. Dann wurde das Verhältnis von positiven, roten Kollagen-Fasern zum Gesamtgewebe ermittelt, um so den prozentualen Anteil von Kollagen am Gesamtgewebe zu bestimmen. Das Gesamtgewebe wurde durch Festlegung eines *Threshold*-Wertes (203) automatisch von *ImageJ* bestimmt.

3.2236 Elastin (Hart's stain)

Es wurden pro Schnitt 5-15 Bilder (so viele wie möglich, aber maximal 15 und minimal 5) in 40facher Vergrößerung mit derselben Belichtungszeit (200-250 bzw. 2,532 ms) am Mikroskop aufgenommen. Pro Tier wurde jeweils nur ein Schnitt gefärbt und ausgewertet, außer es war mit diesem Schnitt nicht möglich fünf Bilder aufzunehmen.

Bei der Auswahl des Bildausschnittes war darauf zu achten, dass möglichst keine leeren Ecken oder keine Bronchien oder großen Gefäße auf dem Bildausschnitt zu sehen waren (s. Snapshots). Vor jeder Aufnahme wurde ein Weißabgleich durchgeführt. Unter „Modus“ wurde Graustufen gewählt und ein automatischer Schwellenwert wurde unter „Zählen und Messen“ ausgewählt (Programm Nr. 1), sodass das Mikroskop unterschiedliche Grautöne erkannte. Die Fotos wurden gespeichert, die Daten wurden in Excel exportiert und es wurde ein Quotient aus Elastin/Gesamtgewebe berechnet.

3.2237 Mikrogefäße (α -SMA + vWF)

Die Auswertung erfolgte mit *ImageJ* durch Ermittlung aller Alveolen pro Gesichtsfeld und Ausmessung aller quer angeschnittenen Gefäße. Es wurde mit Snapshots in 20facher Vergrößerung gearbeitet. Alle 20-100 μ m großen Gefäße wurden notiert und ein Quotient im Verhältnis zu 100 Alveolen gebildet. Diese Methode ermittelt somit die Anzahl an Mikrogefäßen pro Alveole bzw. pro Gesichtsfeld und liefert damit Aussagen über die Mikrogefäßbildung der Lunge.

3.2238 IF-Auswertungen

Die Auswertung der IF-Färbungen erfolgte in 40facher Vergrößerung. Pro Schnitt wurden so viele Bilder wie möglich (aber maximal 10) im Dunkeln aufgenommen und von jedem Bildausschnitt wurde ein Bild in jedem Farbkanal (rot, grün, blau) bei angepasster Belichtungszeit aufgenommen. Zusätzlich wurden repräsentative Bilder in 100facher Vergrößerung angefertigt.

Alle 40fach vergrößerten Bilder (tif-Format) einer ausgewählten Stelle aller 3 Kanäle wurden in *ImageJ* geöffnet. Unter „Image“-> „Color“ -> „Channels Tool“ oder unter Eingabe des Kurzbefehls „Strg + Umschalt + Z“ wurde das sogenannte „Channel-Tool“ geöffnet, mit dem man die Farbeinstellungen vornehmen konnte. Das Bild wurde markiert und unter „more“ wurde die Farbe des Kanals des ausgewählten Bildes gewählt. Sobald dies für alle 3 Bilder festgelegt worden ist, wurde unter „more“ und „merge“ festgelegt, welcher Kanal welche Farbe hat. Die Farbintensitäten wurden dann unter „Image“ -> „adjust“ -> „color balance“ und unter Auswahl des Kanals eingestellt. In der Regel wurde mit der Einstellung „Auto“ gearbeitet. Abweichungen davon wurden bei jeder Färbung jeweils gleich übernommen.

Auf jedem Bild wurden alle blau markierten, **DAPI** positiven Zellen (nukleär) gezählt. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) bindet an die Adenosin-Thymin (A-T) reiche kleine Furche der DNA und zeichnet sich im Vergleich zu anderen Kernfarbstoffen durch die stärkste Photostabilität aus (Chazotte, 2011; Tarnowski et al., 1991).

α -SMA ist ein eindeutiger Marker für differenzierte Myofibroblasten (Darby et al., 1990) und die Anwesenheit von α -SMA führt zu einer erhöhten Kontraktilität dieser (Hinz et al., 2001). Daher wurde α -SMA als Marker für glatte Muskelzellen, unter anderem auch im Gefäßsystem verwendet.

Zudem wurde das Signal aller anderen gefärbten Kanäle ausgewertet; so z.B. SFTPC positive Zellen (perinukleär) (O. Solarin, 2001), KLF4 positive Zellen (nukleär und zytoplasmatisch)

(Shields & Yang, 1997), alle α -SMA positiven Zellen (zytoplasmatisch) (Cherng et al., 2008) und alle TUNEL positiven Zellen (nukleär) (Alberts et al., 2015a).

War das Signal unspezifisch, d.h. nicht eindeutig nukleär oder cytoplasmatisch, wurde ein Troubleshooting durchgeführt und die Färbung unter Veränderung einiger Parameter wiederholt. Für die Auszählung wurde ein persönlicher Treshold gesetzt, d.h. eine Zelle wurde nur als positiv gezählt, wenn sie eine festgelegte Intensität an Farbe aufzeigte.

3.23 Genexpressionsanalyse

Um die histomorphologischen Befunde zu objektivieren, wurden *real time* quantitative Reverse Transkriptase PCRs (*real time qRT-PCR*) von Bindegewebs-Genen durchgeführt. Dafür musste zunächst RNA aus dem schockgefrorenen Lungengewebe isoliert werden.

3.231 RNA-Isolation

Das Protokoll für die RNA- Isolation ist in Tabelle 4 dargestellt und wird im Folgenden genauer beschrieben.

Zunächst wurde die schockgefrorene Lunge in etwa gleichgroße Stücke geschnitten und in ein Mikroreaktionsgefäß (Eppi) gefüllt. Dann wurden 500 μ l TriReagent pro 50mg Lungengewebe dazugegeben, dieses wurde dann in einer Gewebemühle homogenisiert (20 Sek., 30 Hz) und für 5 Min. bei RT inkubiert. Daraufhin wurden 100 μ l Chloroform hinzugefügt, 15 Sek. lang gevortext und für 2-3 Min. bei RT inkubiert. Die Proben wurden zentrifugiert (15 Min., 1200 U/Min., 4°C) und dann wurde die klare flüssige oberste RNA-enthaltende Schicht abpipettiert und in ein neues Eppi gegeben. Die weiße, DNA-haltige Interphase und die orange braune untere Phase wurden verworfen. Dann wurden 250 μ l Isopropanol zur RNA-Ausfällung dazugegeben, die Proben wurden gemischt und für 20 Min. auf Eis inkubiert. Die Proben wurden erneut zentrifugiert (15 Min., 15000 U/Min., 4°C) und der isopropanolhaltige Überstand wurde verworfen. Zur Reinigung wurde das RNA-Pellet zweimal mit 75 % EtOH gewaschen und zentrifugiert (5 Min, 15000 U/Min., 4°C). Der Alkohol wurde abgegossen und das Pellet wurde für 30-60 Min. an der Luft getrocknet. Zuletzt wurde die kristalline RNA in 20-50 μ l DEPC-behandeltes H₂O (aqua bidest, RNase frei), Menge abhängig von der Pellettgröße, gelöst. Die RNA Reinheit und Konzentration wurde durch eine 260/280 nm- Verhältnis-Messung mit *Infinite® M200 PRO NanoQuant (Tecan)* (maximale Konzentration von 1 μ g/ μ l und ein 260/280 nm Verhältnis zwischen 1.8-2) ermittelt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80° C aufbewahrt.

Tabelle 4: Protokoll der RNA-Isolation.*(Mengenangaben beziehen sich auf 50mg Gewebe bzw. 0,5 mL TRIzol)*

Schritt		Volumen (µl)	Inkubation (min)	Temperatur (°C)
1	TriReagent Zugabe	500	5	RT
2	Chloroform Zugabe	100	2-3	RT
3	Zentrifugieren (12000 U/Min.)	-	15	4
4	Phasentrennung	-	-	RT
5	Isopropanol Zugabe	250	20	4
6	Zentrifugieren (15000 U/Min.)	-	15	4
7	Verwerfen des Isopropanol- Überstandes	-	-	RT
8	Waschen mit 75 % EtOH	500	-	RT
9	Zentrifugieren (15000 U/Min.)	-	5	4
10	Waschen mit 75 % EtOH	500	-	RT
11	Zentrifugieren (15000 U/Min.)	-	5	4
12	Pellet trocknen lassen	-	30-60 (bis trocken)	RT
13	Aqua bidest H ₂ O Zugabe	20-50	-	4

3.232 cDNA-Synthese

Durch reverse Transkription wurde mRNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Für die Synthese von cDNA wurde das in Tabelle 5 dargestellte Protokoll angewandt und mit einer gleichen Menge von 1 µg RNA gearbeitet. Mögliche DNA-Kontaminationen der RNA wurden zunächst durch Inkubation mit DNase (15 Min., RT) beseitigt. Zum Stopp der Reaktion wurde EDTA zugegeben und inkubiert (15 Min., 65° C). Danach wurden spezifische oligo-dT- und Random-Primer hinzugegeben und für die Anlagerung der Primer wurden die Proben bei 70° C 5 Min. inkubiert. Nach Abkühlen der Proben für 1 Min. auf Eis zum Stopp der Synthese und Abkühlen der Lösung wurde ein Mix aus *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase* (MMLV RT), dNTPs, RNase inhibitor (rRNasin), und ein MMLV Puffer hinzugefügt, um die vorlagenbasierte cDNA zu synthetisieren. Dieses Gemisch wurde für 1 Stunde bei 37° C inkubiert. Hier findet die Synthese der cDNA statt. Bis zur weiteren Benutzung wurde die cDNA bei -20° C gelagert.

Tabelle 5: Protokoll der cDNA-Synthese.

Schritt	Komponenten	Volumen [µl]	Volumen gesamt [µl]	Inkubationszeit [min]	Temperatur [° C]
<u>DNase-Verdau</u>					
1	10xDNAse I-buffer	1	2	15	RT
	DNase I (RQ1/Promega)	1			
2	25 mM EDTA (<i>stop solution</i>)	1	1	15	65
<u>Mastermix A</u>					
3	Random primer	0,6	5	5	70
	Oligo dT-primer (16T)	0,4			
	DEPC-behandeltes H ₂ O	4			
4	-	-	-	1	auf Eis
<u>Mastermix B</u>					
	5x MMLV-buffer	5			
	dNTP-Mix (10 mM)	1,25			
5	RNase-Inhibitor (rRNasin, Promega, 40 U/µL)	0,5	10	60	37
	MMLV (Promega, 200 U/µL)	1			
	DEPC- behandeltes H ₂ O	2,25			
6	-	-	-	1	auf Eis

3.233 qRT-PCR Ablauf

3.2331 Einleitung

Bei der *real time quantitative Reverse Transkriptase PCR (qRT-PCR)* werden zwei Primer eingesetzt (*forward und reverse*), sodass die beiden komplementären DNA-Stränge gleichzeitig sowohl in 3'-5' als auch in 5'-3' Richtung von der DNA-Polymerase verlängert werden können. Die PCR verläuft in drei nacheinander folgenden Stufen. In der *Denaturierungsphase* (98°C) werden die beiden komplementären DNA-Stränge voneinander getrennt, in der *Hybridisierungsphase* lagern sich Primer bei ihrer spezifischen Temperatur (57-62°C) an und in der *Elongationsphase* verlängert die Polymerase den DNA-Strang bei 72°C komplementär. Insgesamt laufen 40 Zyklen ab (Bachman, 2013).

Die *qRT-PCR* ermöglicht, Aussagen über die Menge an amplifizierter DNA zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu treffen. Um die Menge an DNA genauer quantifizieren zu können, werden entweder **(1)** fluoreszierende Farbstoffe (*SYBR Green*) oder **(2)** zusätzliche Primer (*TaqMan-Sonde*) verwendet, die sich an die synthetisierten DNA-Produkte anlagern und diese somit markieren.

(1) Der Farbstoff SYBR Green I wird unspezifisch an die neu synthetisierte DNA angelagert. Die Anlagerung an die doppelsträngigen DNA-Produkte (dsDNA) verstärkt die Fluoreszenz

des SYBR Greens um bis zu 1000fach und damit korreliert die Intensität der Fluoreszenz mit der Menge an dsDNA. Je früher das Maximum an Fluoreszenz erreicht wird, desto mehr DNA lag in der Probe vor. Durch eine Temperaturerhöhung am Ende der Amplifikation kommt es zu einer Denaturierung der neu synthetisierten DNA Stränge und das SYBR Green wird wieder freigegeben, was zu einem Abfall der Fluoreszenz führt (Wittwer et al., 1997). Die Temperatur, bei der die neu synthetisierten DNA-Stränge denaturieren, ist der sogenannte Schmelzpunkt und sollte bei einer Probe für alle DNA-Produkte gleich sein. Mithilfe dieser sogenannten Schmelzkurvenanalyse wurde somit die Spezifität des Bindungsverhaltens der Primer verifiziert. Zeigte diese sogenannte Schmelzkurvenanalyse ein unspezifisches Bindungsverhalten, wurde die PCR mit einer TaqMan Sonde oder einem anderen Primer wiederholt.

(2) Die TaqMan-qPCR arbeitet mit doppelmarkierten fluoreszierenden Hybridisierungs-Sonden (TaqMan-Sonden), bestehend aus einem Reporter (engl. *to report*: berichten) am 5'Ende (6-carboxyfluorescein; FAM) der Sonde und einem Quencher (engl. *to quench*: löschen) am 3'Ende (6-carboxy-tetramethyl- rhodamine; TAMRA). Normalerweise unterdrückt der Quencher die Fluoreszenz des Reporters, wenn jedoch die Verbindung zwischen Quencher und Reporter getrennt wird, entfaltet der Reporter seine Fluoreszenz. Diese Trennung erfolgt durch die Nukleaseaktivität der TaqMan Polymerase am 5'Ende; der Reporter wird abgespalten (Heid et al., 1996). Der Vorteil gegenüber der günstigeren SYBR Green Methode ist eine spezifischere Bindung der Sonde an die DNA und eine kürzere Dauer der Reaktion im Thermocycler, da die Schmelzphase wegfällt (1,5h versus 2,5h).

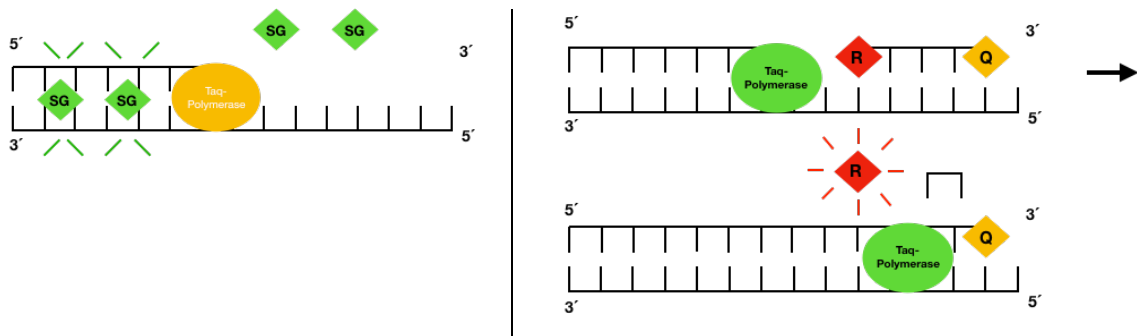


Abbildung 13: Schema SYBR-Green (L) & TaqMan (R) qRT-PCR.

L Der Farbstoff SYBR Green (SG) bindet unspezifisch an die neu synthetisierte DNA und fluoresziert dann.

R Eine mit Reporter (rot) und Quencher (gelb) markierte TaqMan - Sonde lagert sich komplementär an einen cDNA Strang an. Die Taq Polymerase synthetisiert einen neuen DNA-Strang in 5'-3'Richtung und spaltet den nicht-verlängerbaren Reporter ab. Dadurch wird er von seinem Quencher getrennt und fluoresziert.

3.2332 Durchführung

3.23321 Reaktionsansätze

(1) SYBR: Pro Well wurden 12,5µl des SYBR-Master-Mixes mit 5,5µl aqua bidest und je 0,5µl Primer (*forward*, *reverse*) gemischt. Zuletzt wurde 1µl cDNA des jeweiligen Tiers in das Well pipettiert. Das Endvolumen der Reaktion betrug 20µl.

(2) TaqMan: Pro Well wurden 12,5µl des Platinum Supermixes mit 8,5µl aqua bidest und je 0,5µl Primer (*forward*, *reverse*, *taqman*) gemischt. Zuletzt wurden 2,5µl cDNA des jeweiligen Tiers in das Well pipettiert. Das Endvolumen der Reaktion betrug 25µl. Die Platten wurden luftdicht versiegelt, bei 1200 U/min und 20°C für 3 Minuten zentrifugiert und im Thermocycler nach Standardprotokoll des Herstellers inkubiert.

Tabelle 6: Zusammensetzung eines Wells (qRT-PCR) & Cycler Einstellungen.

SYBR (links) benutzt einen grün fluoreszierenden Farbstoff zur Detektion.

Taqman (rechts) eine extra Probe.

	Substanz	Menge (µl)		Substanz	Menge (µl)	
SYBR qRT-PCR	SYBR-Master-Mix	12,5	TaqMan qRT-PCR	Platinum Supermix	12,5	
	Aqua bidest	5,5		Aqua bidest	8,5	
	Primer for (10 µM)	0,5		Primer for (6 µM)	0,5	
	Primer rev (10 µM)	0,5		Primer rev (6 µM)	0,5	
	Zielgen cDNA	1		Primer taq (2µM)	0,5	
	gesamt	20		Zielgen cDNA	2,5	
			gesamt	25		
	Phase	Temp.	Zeit	Phase	Temp.	Zeit
	Haltephase	50°C	2 min	Haltephase	50°C	2 min
		95°C	10 min		95°C	10 min
	Replikationsphase 40 Wdh.	95°C	15 sec	Replikationsphase 40 Wdh.	95°C	15 sec
		60°C	1 min		60°C	1 min
	Schmelzkurvenphase	95°C	15 sec			
		60°C	1 min			
		95°C	30 sec			
		60°C	15 sec			

3.23322 Housekeeping Gene

Die Menge an Zielgen-DNA muss immer auf ein möglichst stabiles Referenzgen, ein *Housekeeping Gene*, bezogen werden. Dieses *Housekeeping Gene* darf nicht beeinflusst werden von äußeren Faktoren, Zelltyp oder Zellstadium (Alberts et al., 2015b; Devlin, 2010). Als *Housekeeping Gene* wurde 18S-ribosomale RNA (18srRNA) herangezogen, da es sich in der PCR für die hier verwendeten 4 Gruppen am stabilsten zeigte.

3.23324 Relevante Genmarker und Proteine

IGFBP2 (*Insulin-like-growth factor binding protein 2*) und **HOPX** (*Homeobox only protein*) sind AT1 Marker. Neue Studien ergaben, dass die erwachsene Lunge aus zwei unterschiedlichen Formen der AT1 besteht: zum Großteil aus entdifferenzierten Hopx+Igfbp2+ AT1, die nach Lungenschädigung nicht proliferieren und nicht in AT2 differenzieren können und zu 5 % aus Hopx +Igfbp2- AT1, die während der Alveolarisierung und nach Lungenschädigung exprimiert werden und als Stammzelle fungieren (Wang et al., 2018). Außerdem wurde **AQ5** als AT1 Marker beschrieben (Barkauskas et al., 2013).

Surfactantproteine werden von AT2 produziert, in die Alveole sezerniert und dann von AT2 und Alveolarmakrophagen wieder resorbiert. Sie machen nur 5 % des gesamten Surfactants aus (Haagsman & Diemel, 2001).

SFTPA und **SFTPD** gehören zu den wasserlöslichen Surfactantproteinen und Kollektinen. Sie haben vor allem immunmodulatorische Funktionen und werden nicht nur von AT2, sondern in der Lunge auch von nicht-zilientragenden respiratorischen Epithelzellen (Clرازellen) und serösen Zellen der tracheo-bronchialen Drüsen sezerniert. Nicht nur in der Lunge, sondern auch in anderen Organen wie Herz, Prostata, Speicheldrüsen, Hoden, Nieren und Pankreas ist SFTPD zu finden; in deutlich geringerer Dosis. Das organübergreifende Vorkommen von SFTPA und SFTPD macht es wahrscheinlich, dass diese Surfactantproteine Funktionen an der Mukosaoberfläche haben, die über die Lunge hinausreichen (Hawgood & Poulain, 2001). In Menschen sind Clرازellen vorallem in respiratorischen Bronchiolen zu finden, während in Mäusen Clرازellen in den großen und kleinen Atemwegen vorkommen; somit scheint die Expression von SFTPA und SFTPD speziesspezifisch (Schneider et al., 2017). **SFTPB** und **SFTPC** sind hydroph und wichtig für die oberflächenaktive Funktion. Sie senken die Oberflächenspannung am Lipid- Flüssigkeitsfilm der Alveolen und verhindern so den Kollaps der Alveolen in der Expiration (Martinez-Calle et al., 2018). Anders als die anderen Surfactantproteine, wird SFTPC ausschließlich von AT2 produziert (Mulugeta & Beers, 2006). Hiermit ist SFTPC ein guter AT2-Marker und eignet sich als Promotor für den zellspezifischen Knockout mit CreLoxp.

Pdgfra (*platelet derived growth factor receptor alpha*) findet man in (Plin2, Tcf2 und α -SMA) Fibroblasten. Das Gen spielt eine wichtige Rolle in der sekundären Septierung der Alveolen und bei der Epithelproliferation (Gouveia et al., 2018). An einem Tiermodell der BPD konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion von *Pdgfra* zu alveolären und mikrovaskulären Defekten in der sich entwickelnden Lunge führt (Oak et al., 2017).

Snai2 (*Snail zinc finger 2*) codiert für das Slug Protein, das Mitglied der Zinkfinger Transkriptionsfaktoren ist. Das Protein ist ein transkriptionaler Repressor, der die Expression von E-Cadherin hemmt und somit an epithelialer-mesenchymaler Transition (EMT) beteiligt ist (Nieto, 2002).

Cdh2 codiert für N-Cadherin, ein Zell-Zell-Adhäsionsmolekül, das als Marker für EMT dient. Epitheliale Zellen exprimieren insbesondere E-Cadherin, mesenchymalen Zellen vor allem N-Cadherin. Ein Phänomen, das auch als „Cadherin-Switching“ bezeichnet wird (Wheelock et al., 2008).

Kollagene gehören zu dem Stützgewebe und bis heute wurden 28 verschiedene Kollagene identifiziert. Kollagen 1 (COL1) kommt in dicken Fibrillen in Dermis, Knochen, Sehnen, Bänder, Sklera und Kornea vor. Kollagen 3 (COL3) in dünnen Fibrillen der retikulären Fasern. Kollagen 6 (COL6) ist Teil der Mikrofibrillen der Basalmembran; am Muskel-Sehnen-Übergang, Endomysium, Blutgefäßwänden und Kollagen18 (Col18) verankert als Teil der Lamina fibroreticularis die BM in der Umgebung (Lüllmann-Rauch, 2006b).

VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) in hohen Konzentrationen verbessert im Mausmodell der Hyperoxie-induzierten Lungenschädigung Alveolarisation und Vaskularisation der Mäuselungen (Ahn et al., 2018; Thebaud, 2017; Thebaud et al., 2005). Weitere Studien zeigen, dass die Gabe eines VEGF-Rezeptors (Flt1) die Lungenstruktur der Mäuse verbessert (Wallace et al., 2018).

Das Gen ***Cdh5*** (VE-Cadherin) kodiert für ein Zell-Zell Adhäsionsmolekül, das endotheliale Adhäsion vermittelt (Gavard, 2014).

Das von ***Apln*** (*Apelin*) kodierte Protein ist ein endogener Ligand für den Apelin-Rezeptor. Seine Peptidfragmente aktivieren gewebespezifische Signalwege, die verschiedene biologische Funktionen wie Flüssigkeitshomöostase, kardiovaskuläre Funktion und Insulinsekretion regulieren (Antushevich & Wojcik, 2018).

AXIN2 (*Axin related protein*) spielt eine Rolle in der Regulation und Stabilität von beta-Catenin im Wnt-Signalweg (Bernkopf et al., 2015).

Das Protein **SNIP1** (*Smad nuclear interacting protein 1*) fungiert als Transkriptionsaktivator, ist er für Zellproliferation verantwortlich und induziert teilweise Karzinogenese (Q. Li et al., 2012).

CDKN1A (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 1*) oder P21 reguliert den Zellzyklus und führt bei Stress zu einem Zellzyklusarrest (Seneszenz). Die Genexpression wird eng kontrolliert durch den Tumorsuppressor p53 (Georgakilas et al., 2017).

Tabelle 7: Übersicht über die verschiedenen Genmarker nach Gruppe.

AT1	Surfactant	EMT	Kollagene	Gefäße	Transkriptions-aktivator	Seneszenz
<i>Hopx</i>	<i>Sftpa</i>	<i>Pdgfra</i>	<i>Col1a1</i>	<i>Vegfa</i>	<i>Snip1</i>	<i>Cdkn1a</i>
<i>Acacb</i>	<i>Sftpb</i>	<i>Snai2</i>	<i>Col3a1</i>	<i>Cdh5</i>	<i>Axin2</i>	
<i>Igfbp2</i>	<i>Sftpc</i>	<i>Cdh2</i>	<i>Col4a2</i>	<i>Apln</i>		
<i>Aqp5</i>	<i>Sftpd</i>		<i>Col18a1</i>			
<i>Popdc3</i>						
<i>Akap5</i>						

3.234 qRT-PCR Auswertung

Es wurde die $\Delta\Delta C_t$ -Methode angewandt (s. Gleichung 2) um Unterschiede in der Genexpression festzustellen. Hierfür wurden die durch *qRT-PCR* ermittelten C_t -Werte (*Cycle of threshold*) verwendet. Dieser Schwellenwert beschreibt den Zyklus der PCR, ab dem der Anstieg in der Fluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz übersteigt und als solche wahrgenommen wird. Je mehr cDNA ursprünglich in der Probe vorlag, desto früher kommt es zu einem solchen Anstieg und desto kleiner ist der C_t Wert.

Relative Werte der DNA-Expression wurden statistisch evaluiert und mittels GraphPad Prism 7 Software graphisch dargestellt (GraphPad Software, LLC).

$$\Delta C_{t \text{ Probe}} = C_{t \text{ Zielgen}} - C_{t \text{ housekeeping}}$$

$$\Delta C_{t \text{ Kontrolle}} = C_{t \text{ Zielgen}} - C_{t \text{ housekeeping}}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t \text{ Probe}} - \Delta C_{t \text{ Kontrolle}}$$

$$\text{relative Veränderung in der Genexpression} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Gleichung 2. $\Delta\Delta C_t$ -Methode zur Bestimmung der cDNA-Expression.

3.24 Statistische Auswertungen

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, LLC). Zum Vergleich von vier Gruppen (zwei unabhängige Variablen vergleichenden) wurde ein *two-way ANOVA mit Bonferroni test (column matching)* herangezogen. Signifikanz wurde definiert und im Graphen markiert als * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ (*Two-way ANOVA mit Bonferroni Test*) dargestellt als *the mean value \pm standard error of the mean (SEM)*.

4. Ergebnisse

4.1 Lungenstruktur

Wie bekannt ist, geht die BPD mit Veränderungen der Lungenstruktur einher, die auch durch Hyperoxie im Mausmodell rekonstruiert werden können. Dazu gehören eine Reduktion und Vergrößerung der Alveolen, sowie reduzierte und dysmorphe Gefäße mit epithelialen Läsionen (Coalson, 2003; Husain et al., 1998). Die Lungenstruktur wurde durch RAC, Alveolenoberfläche und MLI analysiert (Abb. 12). Zur Erklärung der Methoden siehe Abschnitt 4.2.3.

4.11 RAC

Beim RAC zeigten sich in der Normoxie signifikant mehr Alveolen in der Klf4-Knockout Gruppe. Die Anzahl der Alveolen war in beiden Gruppen durch Hyperoxie signifikant reduziert. Durchschnittlich lag der RAC bei den Gruppen NOX WT bei ca. 5, NOX Klf4^{-/-} bei ca. 7, HYX WT bei ca. 3 und HYX Klf4^{-/-} bei ca. 4 (Abb. 14A,B).

4.12 MLI

Der MLI wies keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf. Tendentiell waren die Werte der Knockout-Gruppe etwas kleiner, d.h. es lag ein minimal kleinerer Abstand zwischen den Alveolen vor. Hyperoxie führte unabhängig vom Genotyp zu einem signifikant höherem MLI (Abb. 14C).

4.13 Durchschnittliche Alveolaroberfläche

Die Alveolaroberfläche der Klf4-Knockout-Gruppe war unter Hyperoxie signifikant geringer als in der Kontrollgruppe. Dies lässt vermuten, dass die Lungen der Knockout-Tiere vor emphysemartigen Veränderungen durch Hyperoxie teilweise geschützt sind. Hyperoxie induzierte in beiden Gruppen eine Vergrößerung der Alveolen auf mehr als das Fünffache. Durchschnittlich lag die Alveolaroberfläche in der NOX WT-Gruppe bei 20.000 μm^2 , in der NOX Klf4^{-/-} Gruppe bei 10.000 μm^2 , in der HYX WT-Gruppe bei 100.000 μm^2 und in der HYX Klf4^{-/-} Gruppe bei 80.000 μm^2 (Abb. 14D).

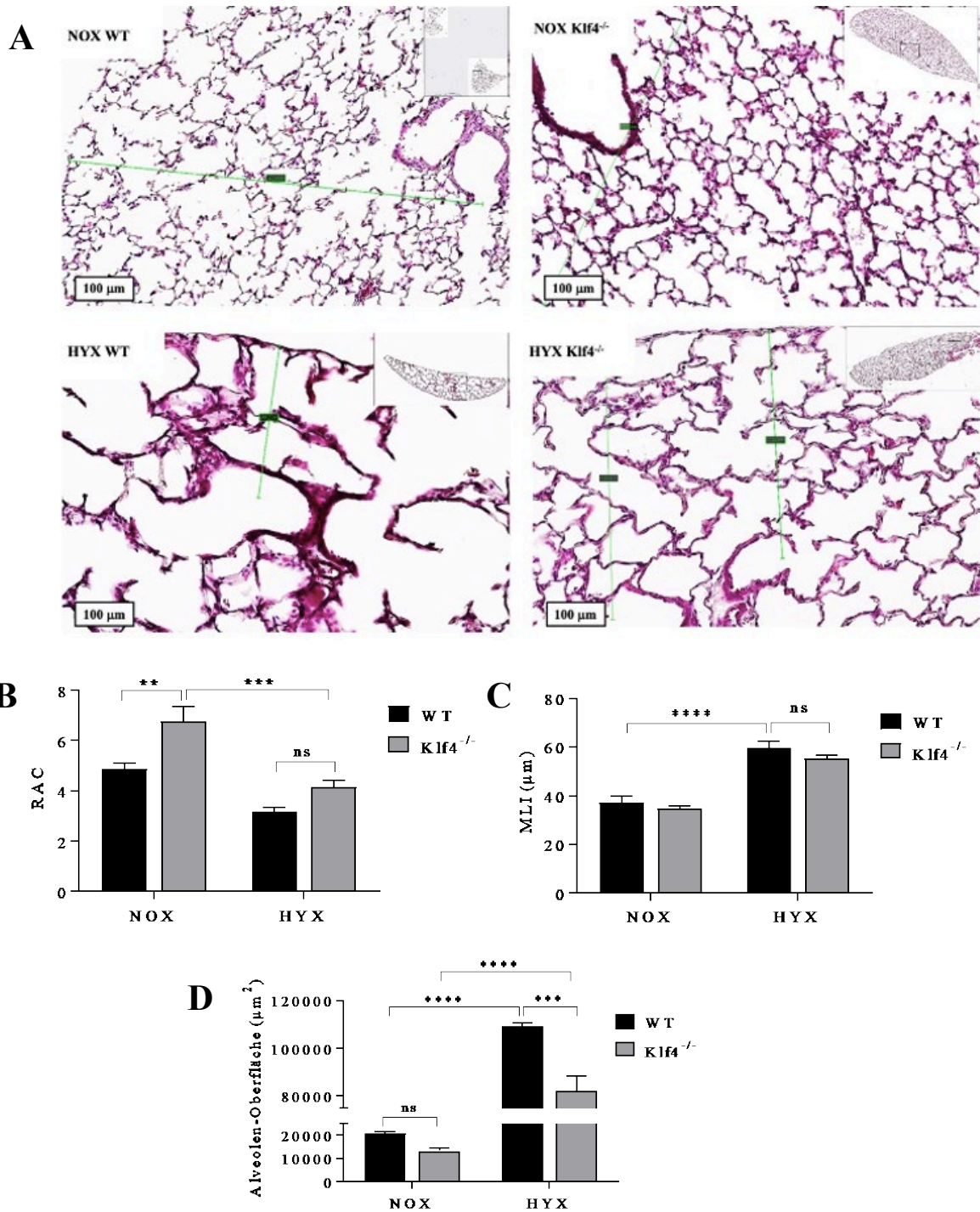


Abbildung 14: Exemplarische Bilder der quantitativen Histomorphometrie H&E (20x) & Ergebnisse.

(A) Repräsentative Bilder in Image Scope. (B-D) Ergebnisse der Parameter der quantitativen Histomorphometrie: radial alveolar count (RAC; B), mean linear intercept (MLI; C) und durchschnittliche Alveolenoberfläche (D). Two-way anova (Bonferroni * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$). n (NOX WT) = 5; n (NOX Klf4^{-/-}) = 5; n (HYX WT) = 6; n (HYX Klf4^{-/-}) = 6.

4.14 Mikrogefäße

Die Anzahl der 20-100 µm großen Gefäße (Mikrogefäße) pro 100 Alveolen (Abb. 15A,B) und pro Gesichtsfeld (Abb. 15C) war in der Klf4^{-/-} Gruppe in Hyperoxie und Normoxie signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Hyperoxie induzierte einen erwartungsgemäßen Gefäßverlust: die Zahl der Gefäße halbierte sich in beiden Gruppen durch Hyperoxie.

Durchschnittlich lag die Anzahl der Mikrogefäße pro Gesichtsfeld in den Gruppen NOX WT bei ca. 5, NOX Klf4^{-/-} bei ca. 11, HYX WT bei ca. 2 und HYX Klf4^{-/-} bei ca. 4. Pro 100 Alveolen lagen die Werte im Durchschnitt bei NOX WT bei ca. 4, NOX Klf4^{-/-} bei ca. 6, HYX WT bei ca. 4 und HYX Klf4^{-/-} bei ca. 8.

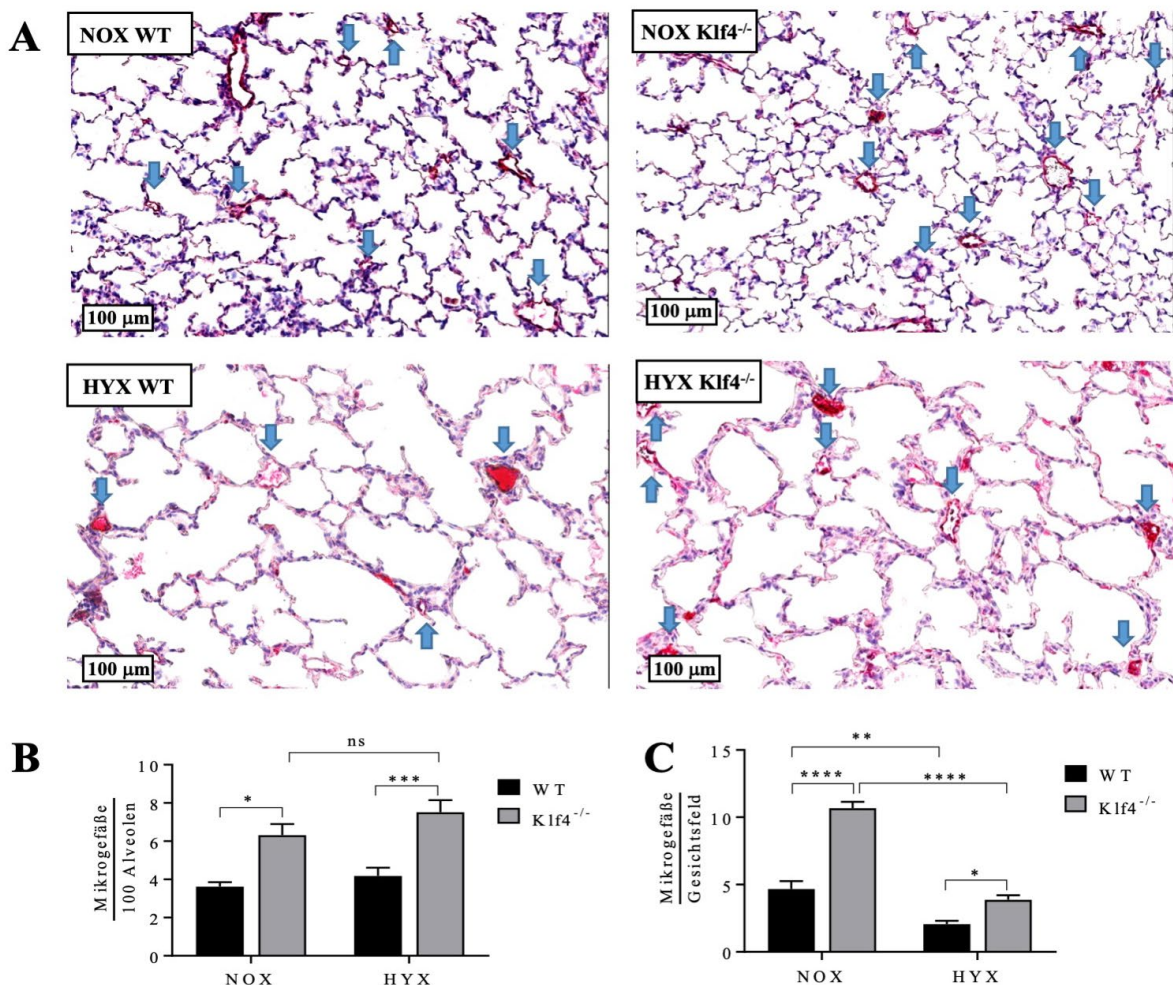


Abbildung 15: Exemplarische Bilder vwF + α-SMA Färbung (20x) & Ergebnisse.

(A) Repräsentative Bilder. Die blauen Pfeile zeigen exemplarisch ausgewertete Gefäße. αSMA: braun, vwF: rosa. (B+C) Ergebnisse: Zahl der Mikrogefäße (20-100µm groß) pro 100 Alveolen (B) und pro Gesichtsfeld in 20x Vergrößerung (C). Two-way anova (Bonferroni): * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

n (NOX WT) = 5; n (NOX Klf4^{-/-}) = 5; n (HYX WT) = 6; n (HYX Klf4^{-/-}) = 6 (pro 100 Alveolen)
 n (NOX WT) = 4; n (NOX Klf4^{-/-}) = 4; n (HYX WT) = 6; n (HYX Klf4^{-/-}) = 6 (pro Gesichtsfeld)

Die real time qRT-PCR von Gefäßmarkern (Abb. 16) zeigte keine direkten signifikanten Unterschiede. Unter Hyperoxie kam es zu einem signifikanten Abfall der Gefäßmarker *Vegf-α* und *Cdh5* in der WT- Gruppe, nicht jedoch in der *Klf4^{-/-}* Gruppe (Abb. 16A,B). Der Knockout von *Klf4* scheint somit partiell vor einem starken Abfall der Gefäßmarker durch Hyperoxie zu schützen. Apelin stieg unter Hyperoxie in beiden Gruppen signifikant an (Abb. 16C).

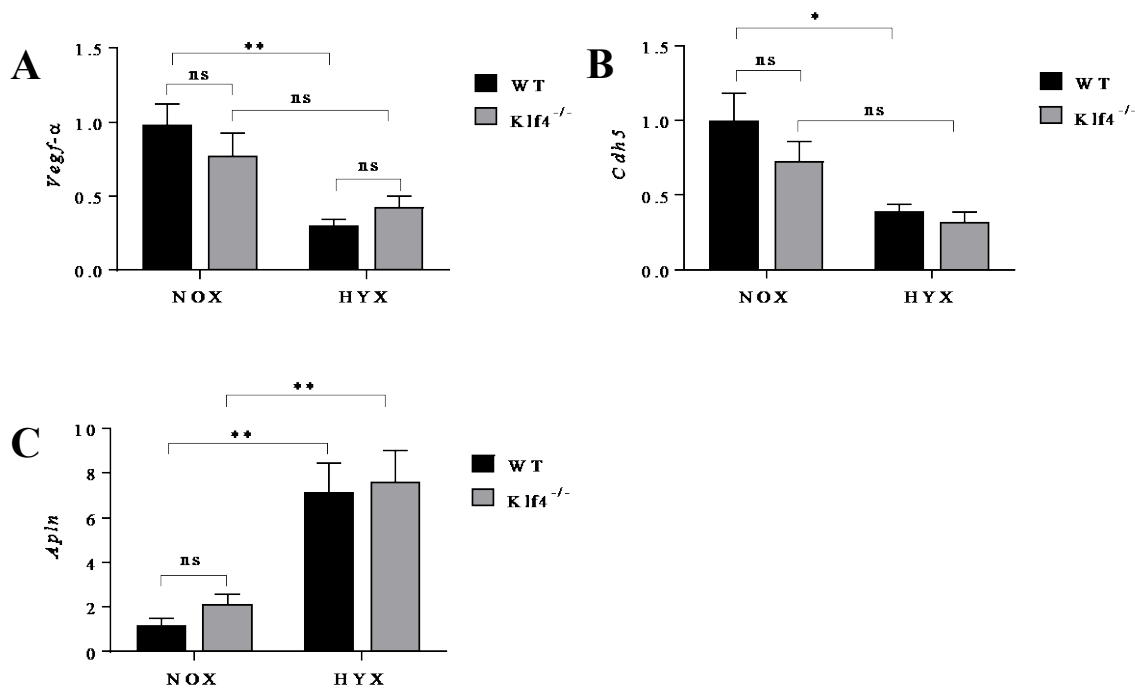


Abbildung 16: Messung der Genexpression von Gefäßmarkern mittels qRT-PCR.
 Two-way anova (Bonferroni): * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$. n (NOX WT) = 5; n (NOX *Klf4^{-/-}*) = 6; n (HYX WT) = 6; n (HYX *Klf4^{-/-}*) = 5 (A,B) TAQMAN (C) SYBR-GREEN.
 Housekeepinggen 18srRNA.

4.2 Matrixumbau (remodeling)

Ebenso ist die BPD charakterisiert durch Veränderungen der Lungenmatrix. Durch eine leichte Verdickung der glatten Muskulatur der Atemwege (Coalson, 2003; Husain et al., 1998) und einen Mangel elastischer Fasern, geht die BPD mit einer reduzierten Elastizität und Compliance einher (Kalikkot Thekkevedu et al., 2017). Die frühere Definition der BPD umfasste zusätzlich den Aspekt der Fibrose (Bonikos et al., 1976; Northway et al., 1967). Als Marker für den Matrixumbau der Lungen wurden Kollagen, Elastin und die Septendicke untersucht.

4.2.1 Kollagen

Die Sirius-Rot Färbung für Kollagen (Kollagen 1 und 3) zeigte eine nicht-signifikante Reduktion des Kollagenanteils in der *Klf4^{-/-}* Gruppe unter Normoxie (Abb. 17A obere Zeile), in der Hyperoxie wiesen die Lungen beider Gruppen erwartungsgemäß mehr Kollagen auf ohne Unterschiede zwischen WT und *Klf4^{-/-}* (Abb. 17A untere Zeile). Die Menge an Kollagen wurde

relativ pro Gewebe (Abb. 17B) sowie absolut als Fläche (Abb. 17C) ermittelt. Durchschnittlich lag der prozentuale Kollagenanteil in den Gruppen NOX WT bei ca. 8 %, NOX Klf4^{-/-} bei ca. 5 %, HYX WT bei ca. 11 % und HYX Klf4^{-/-} bei ca. 16 %.

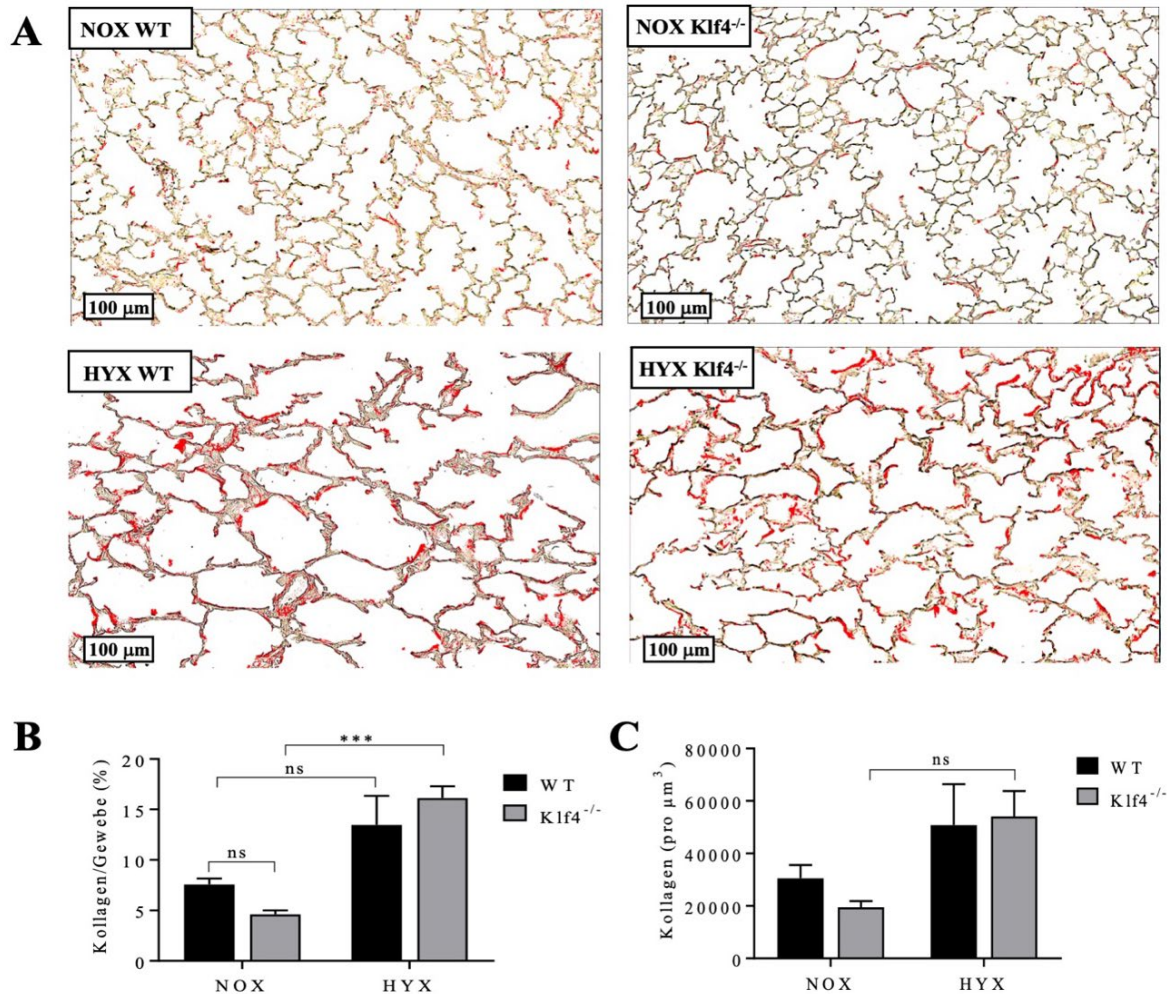


Abbildung 17: Exemplarische Bilder Sirius-Rot Färbung (20x) & Ergebnisse.

(A) Repräsentative Bilder der 4 Gruppen (li oben). Kollagen erscheint rot, restliches Gewebe gelb. (B+C) Ergebnisse: Kollagenanteil in % des Gesamtlungengewebes (B); Kollagenanteil pro Fläche (C). Two-way anova (Bonferroni): * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$. n (NOX WT) = 3; n (NOX Klf4^{-/-}) = 5; n (HYX WT) = 5; n (HYX Klf4^{-/-}) = 6

In der *qRT-PCR* verschiedener Kollagene (*Col1a1*, *Col3a1*, *Col4a1*, *Col18a1*) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Klf4^{-/-} Gruppe und der Kontrollgruppe. Hyperoxie-induziert konnte ein Anstieg des Kollagens gezeigt werden (Abb. 18A-D).

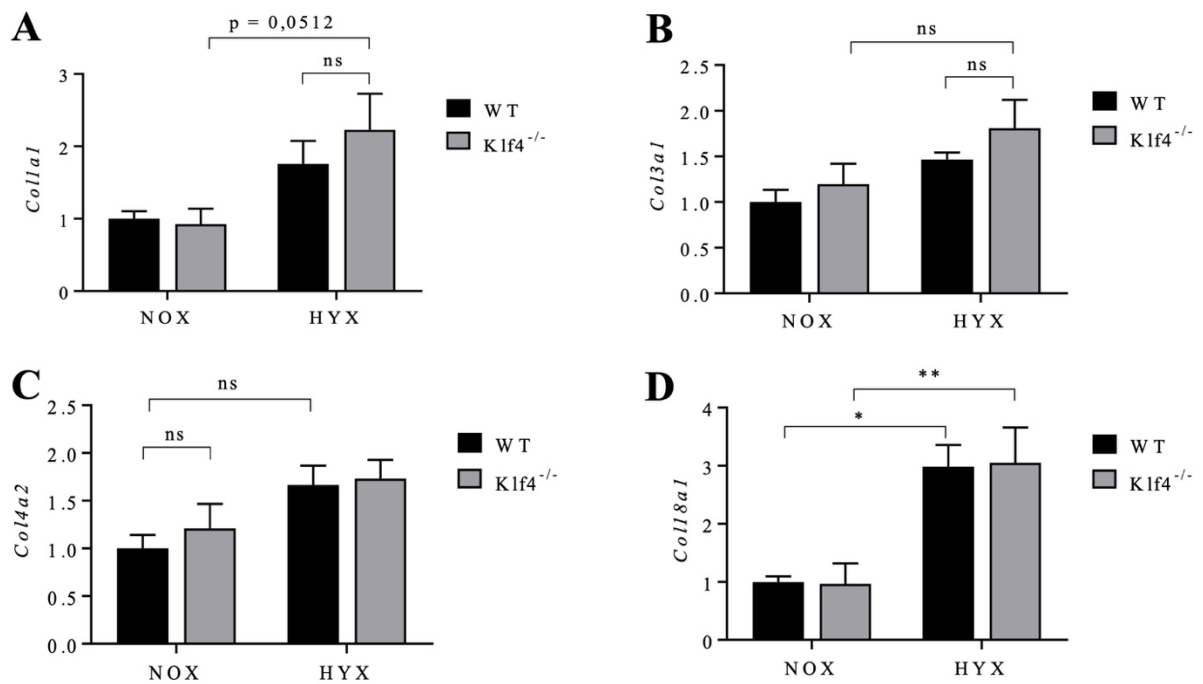


Abbildung 18: Genexpressionsmessungen von Kollagenen mittels qRT-PCR. Col1a1 (A), Col3a1 (B), Col4a2 (C) und Col18a1 (D). Two-way anova (Bonferroni): * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$. n (NOX WT) = 5; n (NOX Klf4^{-/-}) = 6; n (HYX WT) = 6; n (HYX Klf4^{-/-}) = 5. SYBR-Green. Housekeepinggen 18srRNA.

4.22 Elastin

Der prozentuale Elastinanteil der Lungen wurde mittels Hart's stain (Elastikafärbung nach Weigert) bestimmt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. In der Knockout-Gruppe blieb der Elastingehalt unter Normoxie und Hyperoxie gleich, während er in der Kontrollgruppe eher abnahm. Durchschnittlich lag der prozentuale Elastinanteil in den Gruppen NOX WT bei ca. 35 %, NOX Klf4^{-/-} bei ca. 30 %, HYX WT bei ca. 23 % und HYX Klf4^{-/-} bei ca. 29 % (Abb. 19 A-D).

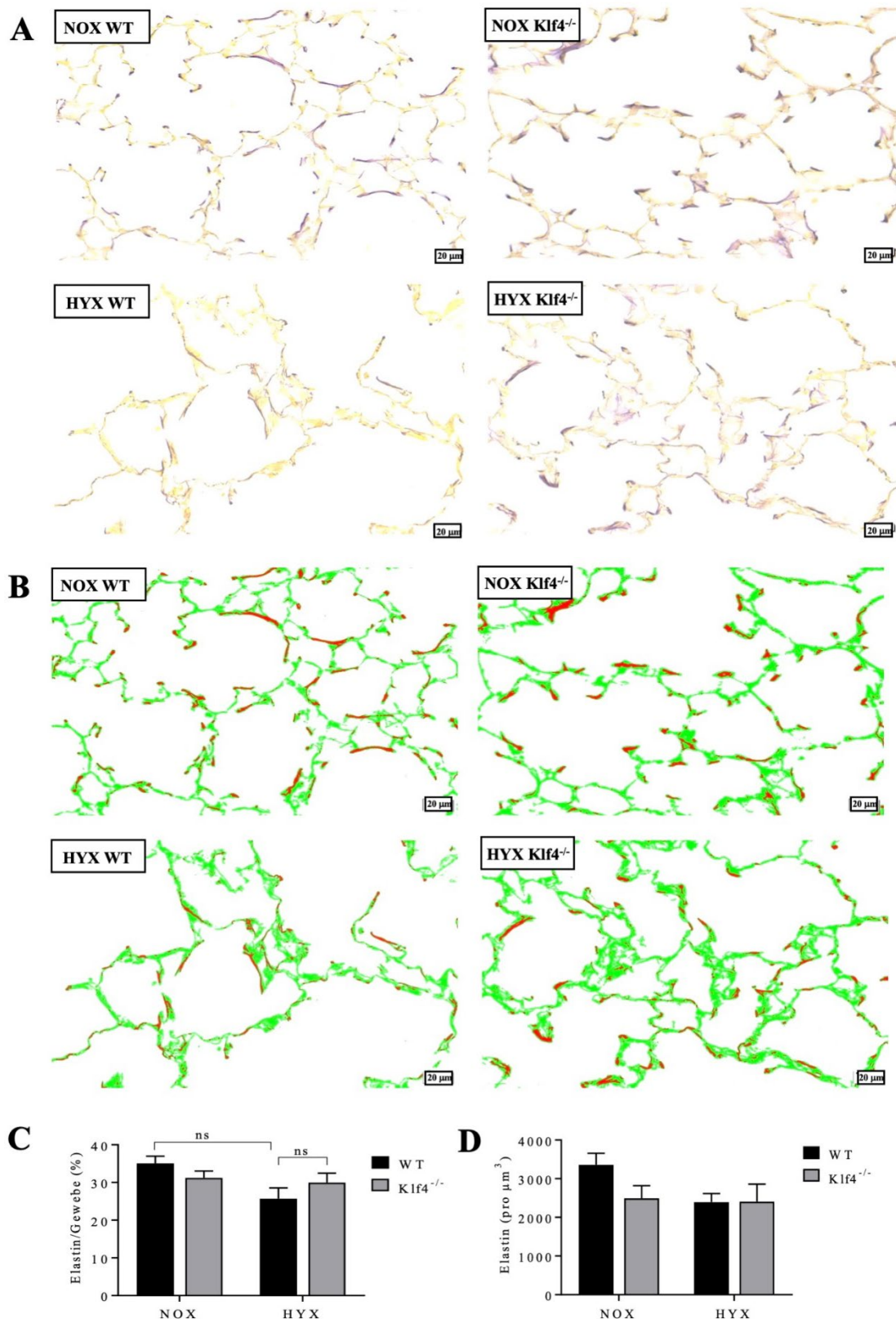


Abbildung 19: Exemplarische Bilder Hart's Stain (40x) & Ergebnisse.

(A) Originalbilder. Elastin = lila, Lungengewebe = gelb. (B) Bilder mit festgelegtem automatischen Schwellenwert (C) Elastinanteil am Gesamtlungengewebe in % (D) Elastingehalt in μm^3 . Two-way anova (Bonferroni). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.
 n (NOX WT) = 5 n (NOX Klf4^{-/-}) = 4; n (HYX WT) = 5; n (HYX Klf4^{-/-}) = 6

4.23 Septendicke

Bei der Septendicke der Alveolen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen in Hyperoxie oder Normoxie. Allerdings zeigte sich bei den WT Tieren durch die Hyperoxie eine signifikante Vergrößerung der Septendicke, bei den *Klf4*^{-/-} Tieren hingegen blieb die Septendicke unter Hyperoxie ungefähr gleich. Somit kann von einem eingeschränkten Schutz vor Septenverdickung durch Knockout von *Klf4* in AT2 ausgegangen werden. Durchschnittlich lag die Septendicke in den Gruppen NOX WT bei 3.7 μm , NOX *Klf4*^{-/-} bei 4.3 μm , HYX WT bei 5.5 μm und HYX *Klf4*^{-/-} bei 4.6 μm (Abb. 20).

Als Grundlage dienten H&E Schnitte in 20x Vergrößerung (Abschnitt 4.2.3.4).

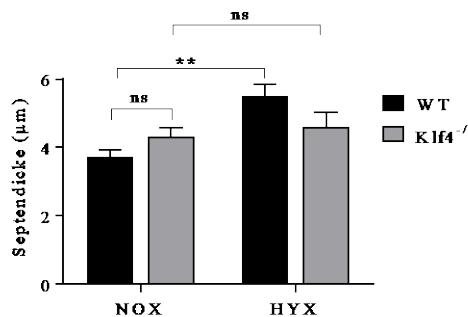


Abbildung 20: Septendicke in μm (H&E, 20x).

Signifikante Zunahme der Septendickt unter Hyperoxie in der Wildtyp-Gruppe, nicht jedoch in der *Klf4*^{-/-} Gruppe. Two-way anova (Bonferroni): * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.
 n (NOX WT) = 5; n (NOX *Klf4*^{-/-}) = 5; n (HYX WT) = 6; n (HYX *Klf4*^{-/-}) = 6

4.3 Differenzierung der AT2

Zuletzt wurde der Effekt des zellspezifischen Knockouts von *Klf4* auf AT2 selbst untersucht. Es wurde die Proliferation, Apoptose und Stammzellkapazität der AT2 sowie die Differenzierung von AT2 in AT1, in mesenchymale Zellen (EMT) und in andere Surfactant-produzierende Zellen untersucht. (Abb. 21) Hierfür wurde mit IF-Färbungen und *real time qRT-PCR* gearbeitet. Als Marker für AT2 wurde das Surfactantprotein C (SFTPC) verwendet (Khan et al., 2018), als Marker für AT1 Aquaporin 5 (AQ 5) (Liebler et al., 2016).

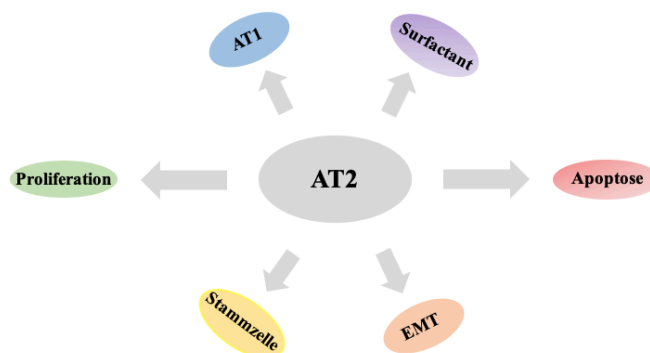


Abbildung 21: Funktionelle und zelluläre Plastizität der AT2.

Es wird die Proliferation, Apoptose und Differenzierung von AT2 in andere Zellen (AT1, mesenchymale Zellen), sowie die Expression spezifischer Proteine (Surfactantproteine und Stammzellfaktoren) betrachtet.

4.31 Nachweis des erfolgreichen Knockouts von Klf4 (IF Klf4 + SFTPC)

Zunächst wurde eine Immunfluoreszenz-Kofärbung von KLF4 und SFTPC durchgeführt. Hiermit konnte der erfolgreiche Knockout von Klf4 in den SFTPC-Zellen der Cre-Linie bestätigt werden; die Lungen dieser Tiere wiesen signifikant weniger KLF4 + SFTPC-Zellen auf als die Wildtyptiere. Ebenfalls zeigte diese Färbung einen signifikanten Abfall von SFTPC (prozentual und absolut) in der Klf4^{-/-} Gruppe unter Hyperoxie (Abb. 22,23).

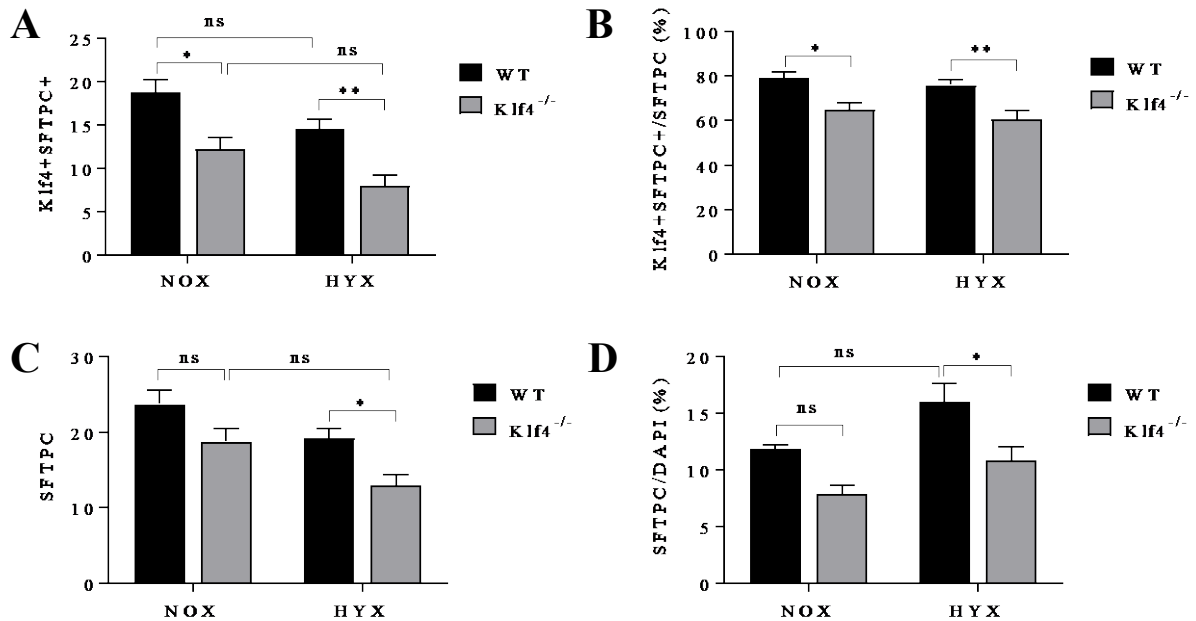


Abbildung 22: Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung von Klf4 + SFTPC.

(A) absolute Anzahl von Klf4+ und SFTPC+ Zellen pro Gesichtsfeld; (B) Anteil der Klf4+ und SFTPC+ Zellen bezogen auf die SFTPC+ Zellen (in %); (C) absolute Anzahl SFTPC+ Zellen pro Schnitt (D) und Anteil der SFTPC+ Zellen bezogen auf alle Zellen (DAPI+) (in %).

n (NOX WT) = 5; n (NOX Klf4^{-/-}) = 5; n (HYX WT) = 6; n (HYX Klf4^{-/-}) = 6

Two-way anova (Bonferroni): *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001.

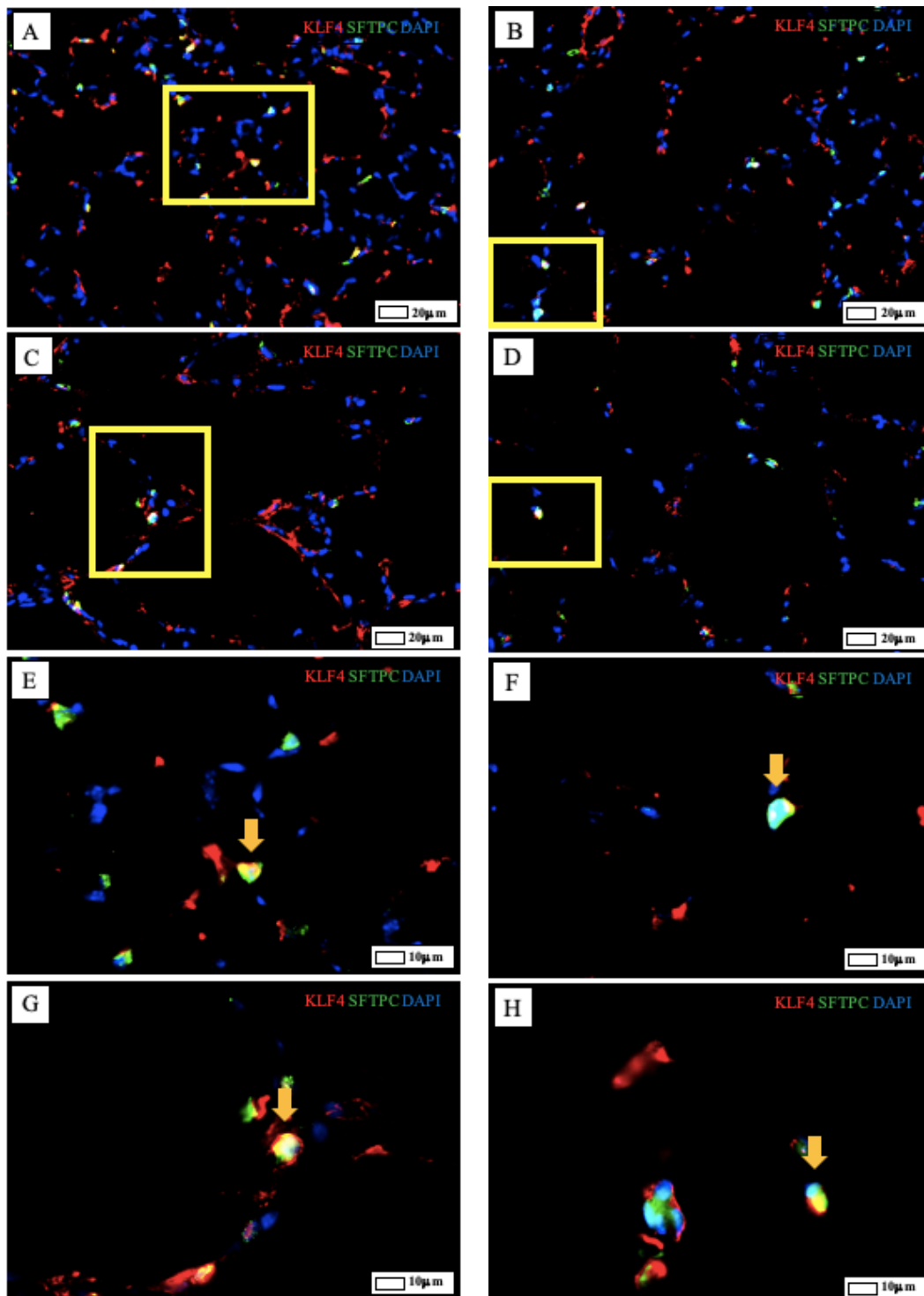


Abbildung 23: Exemplarische Bilder der Immunfluoreszenzfärbung Klf4 + SFTPC.

Der gelbe Ausschnitt in 40x Vergrößerung (A-D) wurde in 100x Vergrößerung (E-H) gezeigt. Der Pfeil zeigt eine KLF4+ SFTPC+ Zelle. (A) Wildtyp unter Normoxie. Man sieht eine ausgeprägte Expression von KLF4 (rot) und SFTPC (grün). (B) *Klf4*^{-/-} Tiers unter Normoxie. Die Expression von KLF4 ist reduziert, wodurch der erfolgreiche Knockout nachgewiesen werden kann. (C) Wildtyp Tier unter Hyperoxie. (D) *Klf4*^{-/-} Tier unter Hyperoxie. Man sieht eine Reduktion von KLF4, SFTPC verglichen mit den Wildtyptieren unter Hyperoxie.

4.32 Analyse des Einflusses einer AT2-spezifischen Deletion von Klf4 auf die Lungenapoptose mittels TUNEL Färbung und Genexpressionsmessung von Apoptosemarkern

Es wurde untersucht, wie viele Zellen der Lungen insgesamt apoptotisch sind und wie viele SFTPC-Zellen in Apoptose gehen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Tendenziell war die Apoptose durch Klf4^{-/-} in AT2 und Hyperoxie erhöht. Durchschnittlich lagen in der Kontrollgruppe (NOX WT) 15 % apoptotische Zellen vor. Dieser Wert wurde als Kontrollwert festgelegt (Co=1) (Abb. 24).

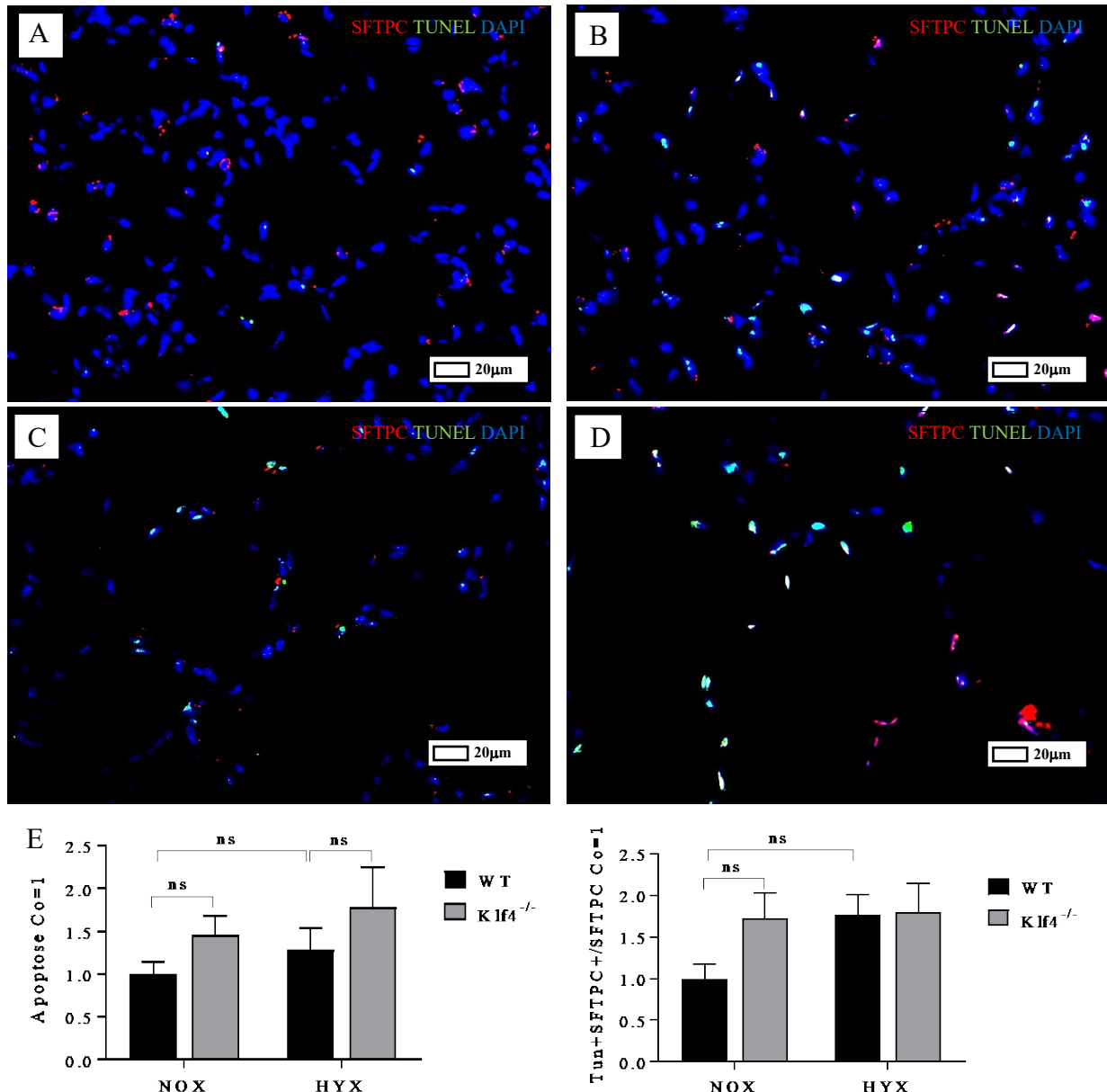


Abbildung 24: Exemplarische Bilder der Immunfluoreszenzfärbung TUNEL (40x) & Ergebnisse.

(A) WT unter Normoxie mit ca. 15% apoptotischen Zellen (grün). (B) Klf4^{-/-} unter Normoxie. (C) WT unter Hyperoxie. (D) Klf4^{-/-} unter Hyperoxie. (E) Ergebnisse. Graph links: verglichen zur Kontrolle (apoptotische Zellen der Gruppe NOX WT=1) Graph rechts: Anteil der apoptotischen SFTPC gemessen an allen SFTPC Zellen. n (NOX WT) = 4; n (NOX Klf4^{-/-}) = 3; n (HYX WT) = 5; n (HYX Klf4^{-/-}) = 4 Two-way anova (Bonferroni): *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001. Blau= DAPI; Rot= SFTPC; Grün= TUNEL

In der Genexpressionsanalyse des Seneszenzmarkers *Cdkn1a* (P21) zeigte sich durch Hyperoxie ein signifikanter Anstieg dieses Markers und tendenziell (aber nicht signifikant) höhere Werte in der Knockoutgruppe (Abb. 25).

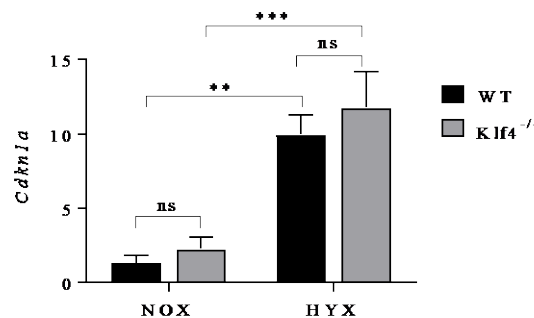


Abbildung 25: qRT-PCR von *Cdkn1a* (P21).

Vermehrte Expression des Seneszenzmarkers unter Hyperoxie, v.a. in der *Klf4*^{-/-} Gruppe. SYBR-Green, Housekeepinggen 18srRNA. Two-way anova (Bonferroni): * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$. n (NOX WT) = 5; n (NOX *Klf4*^{-/-}) = 6; n (HYX WT) = 6; n (HYX *Klf4*^{-/-}) = 5

4.33 EMT

Mesenchymale Zellen unterscheiden sich nicht nur morphologisch von epithelialen Zellen, sondern zeichnen sich ebenfalls durch eine erhöhte Mobilität aus, was es ihnen ermöglicht, ihren Ursprungsort zu verlassen und zu anderen Regionen zu migrieren. Damit sich eine epitheliale Zelle in eine mesenchymale Zelle umwandelt, bedarf es der Anwesenheit mesenchymaler Differenzierungsmarker wie N-Cadherin oder Slug (s.o.) (Hay, 2005; Lee et al., 2006). EMT ist ein reversibler biologischer Prozess, der in der normalen Embryogenese und Organogenese abläuft. Jedoch auch in pathophysiologischen Prozessen wie der Wundheilung und in der Tumorgenese. Hierbei geht EMT mit dem Stadium, der Invasivität und dem Metastasierungsgrad des Tumors einher (Krisanaprakornkit & Iamaron, 2012).

4.331 IF α -SMA+ SFTPC

Mithilfe der Immunfluoreszenzfärbung α -SMA und SFTPC sollte gezeigt werden, wie viele SFTPC-Zellen sich in mesenchymale Zellen mit kontraktilelementen (α -SMA+) differenzieren. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede. Der Anteil mesenchymaler Zellen mit kontraktilelementen an allen Zellen (bzw. α -SMA+SFTPC an SFTPC) lag in den Gruppen NOX WT bei 12 % (4 %), NOX *Klf4*^{-/-} bei 9 % (3 %), HYX WT bei 13 % (4 %) und HYX *Klf4*^{-/-} bei 12 % (4 %) (Abb. 26).

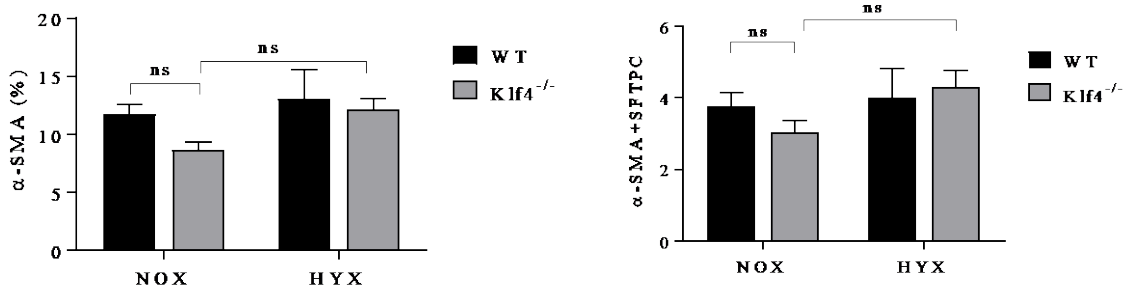
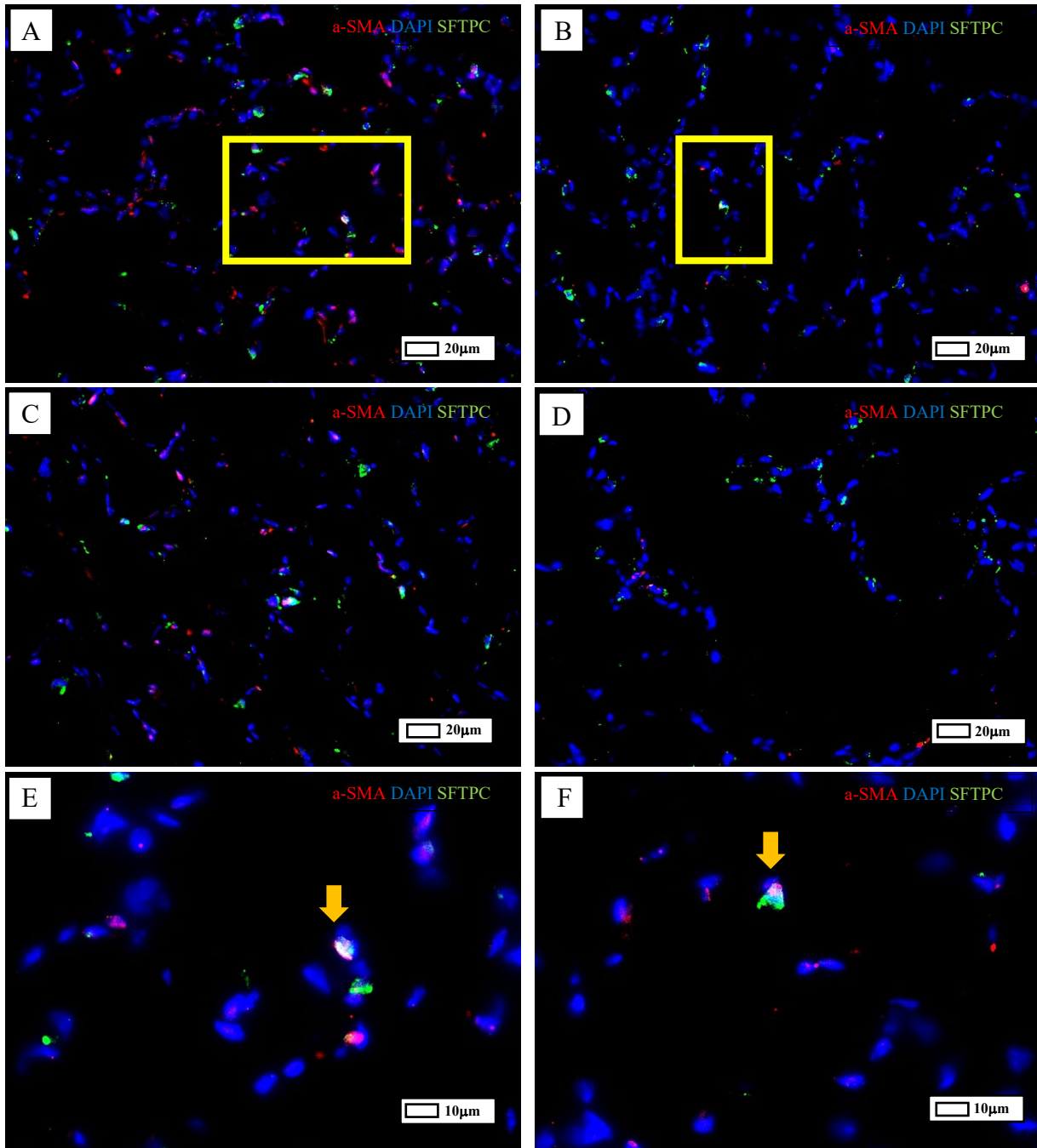


Abbildung 26: Bilder der Immunfluoreszenzfärbung a-SMA+ SFTPC & Ergebnisse. (A) WT NOX (40x) (B) NOX (40x) (C) WT HYX (40x) (D) HYX 40x (E/F) Ausschnitt A/B in 100x Mit Pfeil ist eine a-SMA + SFTPC + Zelle gezeigt. Ergebnisse: Links: Anteil α -SMA positiver Zellen an allen Zellen (DAPI) in %. Rechts: Anteil a-SMA + SFTPC Zellen an SFTPC in %. Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede. (NOX WT) = 4; n (NOX Klf4^{-/-}) = 5; n (HYX WT) = 5; n (HYX Klf4^{-/-}) = 5. Two-way anova (Bonferroni): *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001.

4.332 real time PCR von mesenchymalen Zellmarker

Hyperoxie-induziert nahm die Expression des Markers *Pdgfr* in der Knockoutgruppe ab.

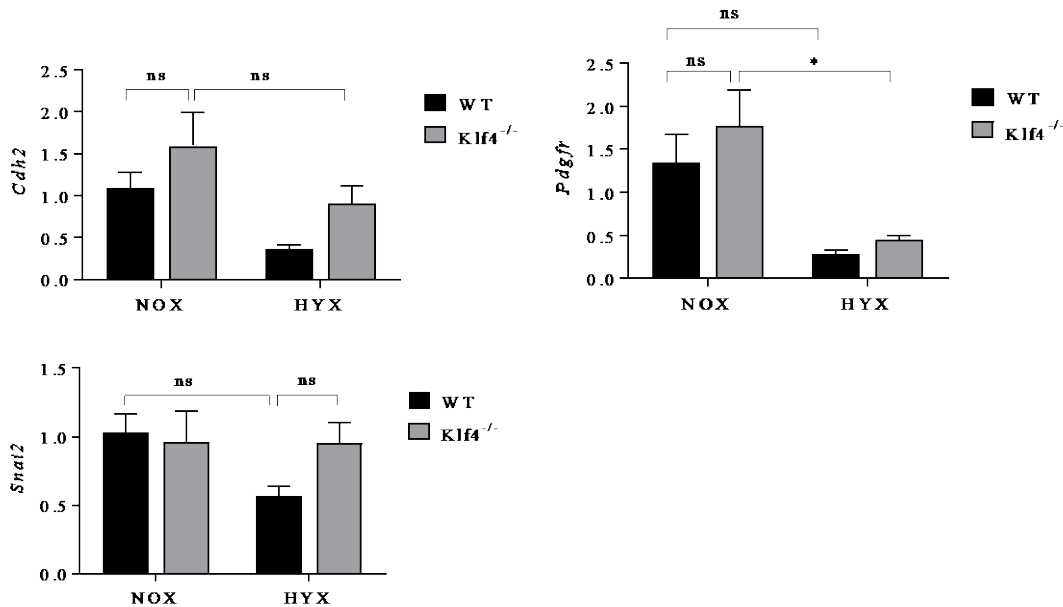


Abbildung 27: qRT-PCR von mesenchymalen Zellmarkern (*Cdh2*, *Pdgfr*, *Snai2*).

Es kam zu einer Abnahme mesenchymaler Zellmarker unter Hyperoxie. Two-way anova (Bonferroni): * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$. n (NOX WT) = 5; n (NOX Klf4^{-/-}) = 6; n (HYX WT) = 6; n (HYX Klf4^{-/-}) = 5 SYBR-Green, Housekeepinggen 18srRNA.

4.34 real time PCR von Surfactant Proteinen

Hyperoxie-induziert kam es zu einer reduzierten Expression von *Sftpa* in der Knockoutgruppe.

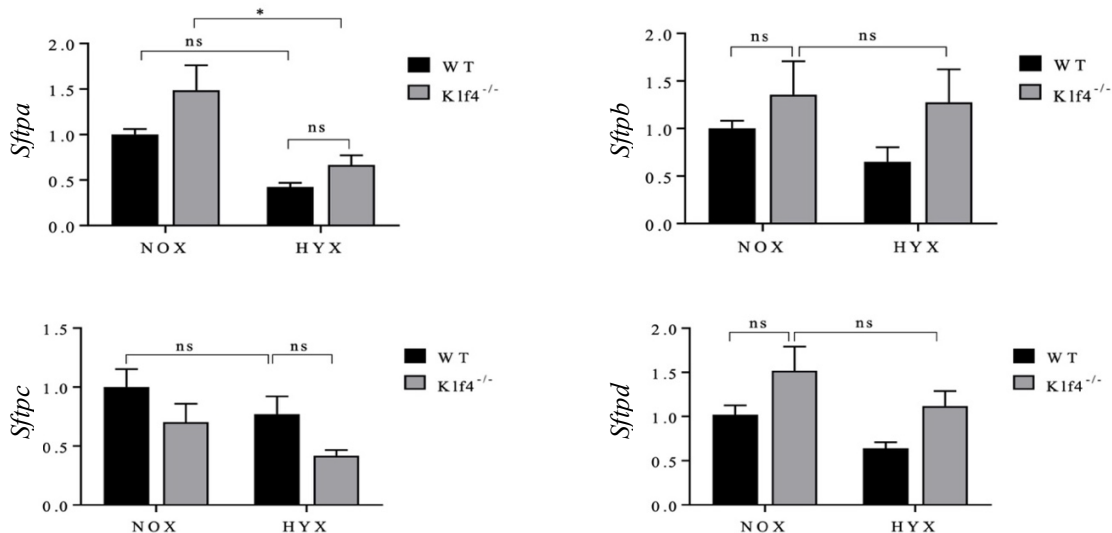


Abbildung 28: qRT-PCR von Surfactantproteinen (*Sftpa-d*).

Reduzierte Expression von *Sftpa* unter Hyperoxie. Zwischen den Gruppen WT und Knockout zeigen sich keine signifikanten Unterschiede. Two-way anova (Bonferroni): * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$. n (NOX WT) = 5; n (NOX Klf4^{-/-}) = 6; n (HYX WT) = 6; n (HYX Klf4^{-/-}) = 5. SYBR-Green, Housekeepinggen 18srRNA.

4.35 real time PCR von AT1 Markern

Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der WT und Knockoutgruppe. Hyperoxie- induziert verändert sich die Expression von AT1 Markern (teilweise signifikant, siehe Popdc3).

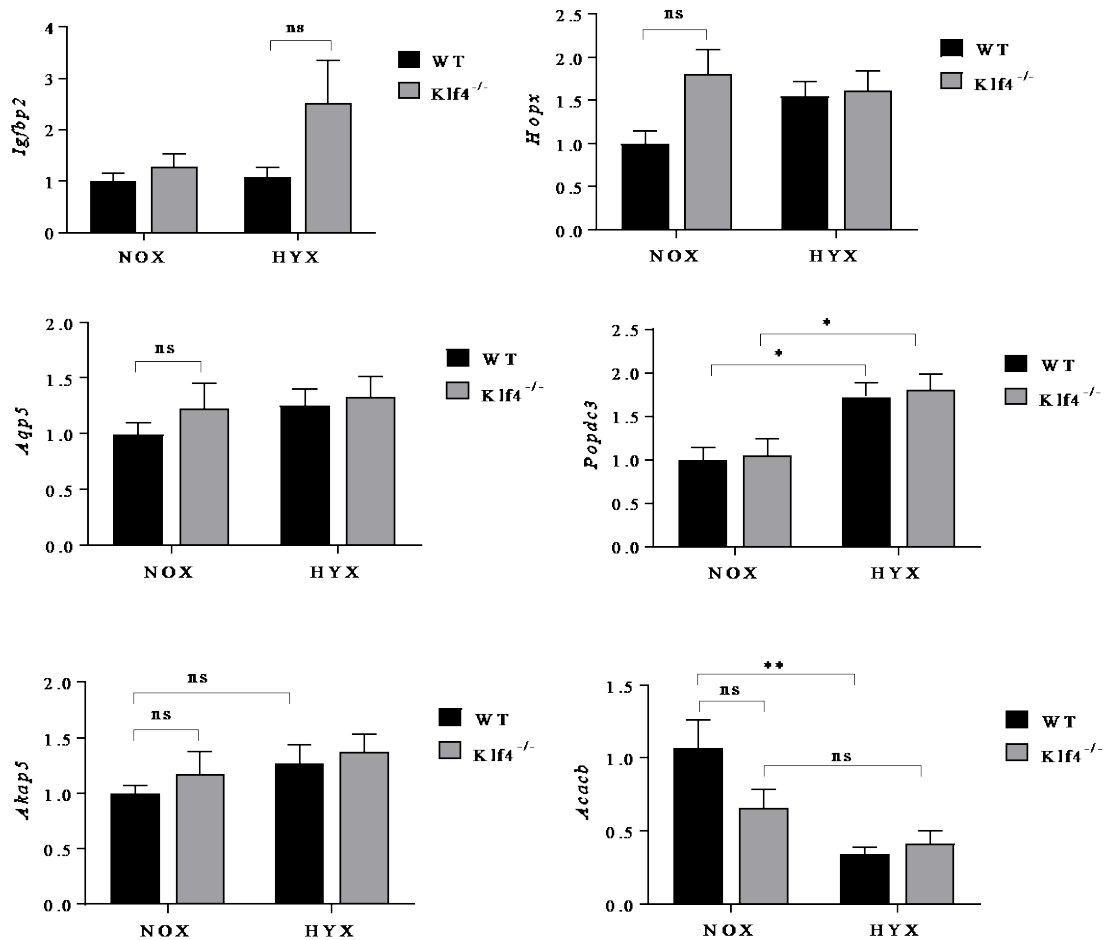


Abbildung 29: qRT-PCR von sechs unterschiedlichen AT1 Markern.

Keine signifikanten Unterschiede. Two-way anova (Bonferroni): * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$. n (NOX WT) = 5; n (NOX Klf4^{-/-}) = 6; n (HYX WT) = 6; n (HYX Klf4^{-/-}) = 5. SYBR Green (Igfbp2, Hopx, Popdc3, Akap5, Acacb) und TAQMAN (Aqp5), Housekeeping 18srRNA.

4.36 real time PCR von Stammzellmarkern

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

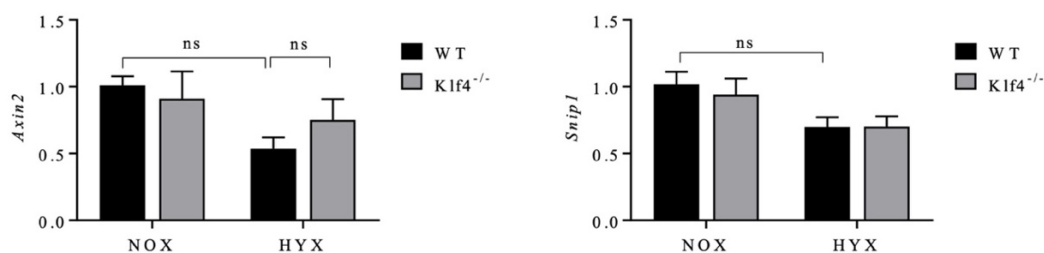


Abbildung 30: qRT-PCR von Stammzellmarkern (Axin2, Snip1).

Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede. Two-way anova (Bonferroni): * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$. n (NOX WT) = 5; n (NOX Klf4^{-/-}) = 6; n (HYX WT) = 6; n (HYX Klf4^{-/-}) = 5 SYBR-Green, Housekeeping 18srRNA.

5. Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Kernaussagen

In der vorliegenden Dissertationsschrift wurde die funktionelle Rolle des Transkriptionsfaktors Klf4 in der alveolären Progenitorzelle AT2 während der normalen postnatalen Lungenentwicklung der Maus sowie in der Pathogenese der BPD in einem hyperoxie-basierten neonatalen Mausmodell untersucht.

Hierzu wurden eine genetisch modifizierte Reporter-Mauslinie mit einer an P3 durch Tamoxifengabe induzierbaren AT2 spezifischen Deletion von Klf4 und Expression von YFP sowie die entsprechenden Kontrollmäuse genutzt. Die Lungen wurden an P21 entnommen und nachfolgend mittels quantitativer Histomorphometrie, histologischen Färbungen der Lungenmatrix, Immunfluoreszenzfärbungen sowie Genexpressionsmessungen analysiert. Die wesentlichen Ergebnisse zeigen, dass ein AT2-spezifischer Verlust von Klf4 während der postnatalen Lungenentwicklung (i) die Alveolen- und Gefäßbildung unter Normoxie sowie unter Hyperoxie fördert. Dies ist assoziiert mit (ii) einem Verlust von AT2, möglicherweise infolge einer Zelldifferenzierung. (iii) Die Untersuchung der Lungenmatrix zeigt keine signifikanten Veränderungen des Anteils an elastischen Fasern oder der Expression von Genen, die für Kollagene (wie z.B. *Col1a1*) kodieren. Interessanterweise waren die Mäuse mit AT2 spezifischer Deletion von Klf4 im Vergleich zu den Kontrolltieren trotz Zunahme des Kollagenanteils geschützt vor der Zunahme der Septendicke unter Hyperoxie. (iv) Letztlich zeigten die Genexpressionsmessungen im totalen Lungenhomogenat milde Effekte einer AT2-spezifischen Deletion von Klf4 auf die Expression von Seneszenzmarker (*Cdkn1a*) mesenchymalen, endothelialen (z.B. *Apln*, *Vegfa*, *Cdh5*), AT1 (z.B., *Hopx*, *Popdc3*) und AT2 (z.B. *Sftpc*) Marker.

5.2 Ist das angewandte Modell passend für die BPD? (Modellkritik)

5.21 Hyperoxie

Der schädliche Effekt von Hyperoxie auf den Organismus, insbesondere auf Gehirn und Lunge, ist schon lange bekannt (Smith, 1899). Auch die Bedeutung von Hyperoxie in der Genese der BPD ist seit einiger Zeit beschrieben (B. B. Warner et al., 1998). Die unreife Lunge des Frühgeborenen, mit wenigen Schutzmechanismen versehen, ist anfällig gegenüber oxidativem Stress und einer dadurch ausgelösten Entzündungsreaktion. Es kommt adaptiv zu irreversiblen Umbauprozessen, durch welche die Lunge des Frühgeborenen langfristig geschädigt und in ihrer Funktion einschränkt wird. Je unreifer die Lunge, desto höher der Sauerstoffbedarf und desto ausgeprägter die pulmonale Schädigung (Buczynski et al., 2013). Die bekannten histologischen Veränderungen der Hyperoxie-induzierten Lungenschädigung (emphysematöse Veränderungen der Alveolen, Gefäßrarifizierung, Verdickung der interalveolären Septen und Kollagenvermehrung) (Barbara B Warner et al., 1998) konnten an

unserem Mausmodell nach Exposition gegenüber 85 % Sauerstoff über 21 Tage dargestellt werden (*Abschnitt 4.1, 4.2*). Andere Studien, die eine Exposition gegenüber gleicher Sauerstoffkonzentration anwenden, weisen die typischen Veränderungen am Mausmodell nach (Kumar et al., 2016; Rogers et al., 2009). Ein AT2 spezifischer Knockout von Klf4 scheint diesen morphologischen Veränderungen zum Teil entgegenzuwirken.

Eine Beatmung mit einer Sauerstoffkonzentration von 85 % über 21 Tage findet in der Praxis kaum mehr Anwendung. Daher liegen aktuell mehrere Studien vor, die eine Exposition gegenüber geringeren Sauerstoffkonzentrationen untersuchen.

Unterschiede zwischen milder (40 %) und hoher (70 % - 80 %) Sauerstoffexposition können auf verschiedenen Ebenen dargestellt werden: funktionell (Resistance, Compliance, Atemwegs-Hyperreagibilität) sowie morphologisch (immunhistochemische Darstellung von Atemwegen und Alveolen). Unter milder Sauerstoffexposition liegt eine Atemwegs-Hyperreagibilität, sowie eine Abnahme von Compliance, Zunahme von Resistance und oxidativer Stress vor. Durch die steigende Sauerstoffkonzentration kommt es, statt zu einer Proliferation glatter Muskelzellen (wie unter milder Sauerstoffexposition), vermehrt zu Apoptose. Damit ändern sich die pulmonale Compliance und Resistance unter 80 % Sauerstoffkonzentration kaum (Dylag et al., 2020; Onugha et al., 2015; Wang et al., 2014; Yi et al., 2011). Ob und inwieweit typische morphologische Veränderungen der BPD (rarifiziertes Lungengewebe, Kollagenvermehrung) unter 40 % Sauerstoffexposition nachzuweisen sind, wird in Studien nicht einheitlich beschrieben (Bouch et al., 2015; Onugha et al., 2015; Wang et al., 2014). Eine Exposition gegenüber niedrigen Sauerstoffkonzentrationen führt nicht zum Umbau der Lungenmatrix im Sinne einer Kollagenvermehrung, jedoch zum Arrest von Alveolen- / und Gefäßbildung (Ettore Lignelli et al., 2019). Unter Berücksichtigung dieser Aspekte (der „neuen BPD“), die sich nicht mehr nur durch fibroproliferative Veränderungen der Bronchien und Alveolen, sondern insbesondere durch einen Arrest des Lungenwachstums und somit auch durch funktionelle Aspekte auszeichnet, sollten ergänzende Untersuchungen (Messung von Compliance, Resistance, Atemwegs-Hyperreagibilität) und die Exposition gegenüber geringeren Sauerstoffkonzentrationen erfolgen.

5.22 Alternativmodell: *Continuous Positive Airway Pressure (CPAP)*

Neben der Hyperoxie spielen Druck- / und Volumen der Beatmungsmodi sowie Dauer der Beatmung eine wichtige Rolle auf Outcome und Risiko der Entstehung einer BPD. Mechanische Beatmung (MV) kann, selbst bei kurzer Anwendung, durch Volu- / und Barotrauma eine BPD induzieren - auch ohne Hyperoxie (L. J. Björklund et al., 1997; Fischer et al., 2018; Ikegami & Jobe, 2002; Mokres et al., 2010).

Das Ziel neuartiger Beatmungsverfahren ist eine Reduktion der durch die Beatmung induzierten Lungenschädigung. Nichtinvasive Verfahren gelten als lungenprotektiv (Hummler et al., 2002) und werden der MV vorgezogen. Laut aktueller Empfehlung der „*European Consensus Guideline*“ von 2019 sollen spontan atmende Frühgeborene mit CPAP versorgt werden (Schmölzer et al., 2013; Sweet et al., 2019). CPAP ist ein Beatmungsverfahren, das den Patienten durch kontinuierlich positiven Druck in In-/ und Expiration (PEEP) unterstützt (Pinto & Sharma, 2022). Durch dieses Verfahren ist ein geringerer Druck für die Ventilation ausreichend. Zudem herrschen andere Sauerstoffkonzentrationen in der Beatmungsluft. Die Empfehlung ist der Einsatz einer FiO₂ von 0.3 bei Neugeborenen < 28. SSW, einer FiO₂ von 0.21-0.3 bei Neugeborenen der 28.-32. SSW und einer FiO₂ von 0.21 bei Neugeborenen der >= 32. SSW (Sweet et al., 2019) .

Tabelle 8: Beatmungsgerät-Parameter CPAP vs MV (O. & C., 2021)

CPAP PEEP: 5-8mbar (max 10mbar), Atemfrequenz: 30-60/min, FiO₂ 0.21-0.3

MV PIP (Spitzendruck): 10-20mbar, Atemfrequenz: ca. 60/min, FiO₂-Ziel < 0.4

Zielwerte PaO₂ 50 – 70 mmHg, PaCO₂ 40 – 55 (65) mmHg

Eine Studie aus 2020 zeigt eine 30 % reduzierte Mortalität durch CPAP verglichen mit alleiniger Applikation von Sauerstoff über die Nasenbrille (Mwatha et al., 2020). Reviews bestätigen, dass frühe CPAP-Therapie ein geringeres Therapieversagen (KI relative Risikodifferenz (RR) 0.49-0.74; KI absolute Risikodifferenz (RD) 0.34-0.02) und eine geringere BPD-Inzidenz aufweist (KI relative Risikodifferenz (RR) 0.51-1.14) als nasale Sauerstoffgabe (Ho et al., 2020; Subramaniam et al., 2021). *HFNC* (d.h. Applikation von Sauerstoff über die *High-Flow* Nasenbrille ist dem CPAP unterlegen, da Kinder häufiger eine „*Rescue*“-Therapie benötigen (Manley et al., 2018; Roberts et al., 2015).

Es scheint bestätigt, dass die CPAP-Therapie einer reinen Sauerstoffgabe über die Nasenbrille überlegen ist. Ob und inwieweit Folgeschäden wie die BPD durch Einsatz von CPAP anstelle von MV effektiv verhindert werden, ist noch nicht final bewiesen. Hierzu bedarf es weiterer klinischer Studien. Um den Einfluss von CPAP an murinen neonatalen Lungen zu untersuchen, wurde ein Tiermodell etabliert (Mayer et al., 2015). Mithilfe dieses Modelles konnte gezeigt werden, dass der toxische Effekt von Hyperoxie durch Applikation über CPAP partiell aufgehoben werden kann. Während murine Lungen unter Exposition gegenüber 50 % Sauerstoff eine höhere pulmonale Resistance, geringere Compliance und signifikant weniger Alveolen im RAC aufwiesen, ergaben sich bei Applikation von 50 % Sauerstoff über CPAP keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe (Reyburn et al., 2016).

5.23 Genetische Modifikation durch das Cre-Loxp System

Seit der Entwicklung durch Sternberg und Hamilton 1981, wurde das CreLoxp Verfahren mehrfach weiterentwickelt (N. Sternberg & D. Hamilton, 1981). 1995 wurde das Tamoxifen-induzierbare CreLoxp Verfahren von Metzger et al erstbeschrieben; dieses Verfahren ermöglicht eine zeitliche und örtliche Kontrolle der Genexpression (Kos, 2004; Metzger et al., 1995) und wird daher insbesondere bei sich entwickelnden Prozessen (z.B. der Organogenese) angewandt (McLellan et al., 2017). Neben einer Aktivierung durch Tamoxifen existiert die Möglichkeit einer Aktivierung über Doxycyclin.

Die Beeinflussbarkeit des Östrogenrezeptors durch schwankende Östrogenspiegel oder andere Transkriptionsfaktoren galt lange Zeit als Nachteil des Verfahrens (Littlewood et al., 1995).

Durch mehrfache Weiterentwicklungen des Östrogenrezeptors (Danielian et al., 1993; Feil et al., 1997; Littlewood et al., 1995; Verrou et al., 1999) konnte die Sensitivität des Rezeptors maximiert und der hormonelle Einfluss minimiert werden; endogenes Östrogen wird kaum gebunden während 4-hydroxy Tamoxifen (4OH-T), der aktive Metabolit des Tamoxifen, stark gebunden wird (Hayashi & McMahon, 2002). Die Verwendung eines solchen, mehrfach modifizierten Östrogenrezeptors, abgekürzt als cre-ERT2, ist heutzutage Standard (Feil et al., 1997) und es existieren mehr als 150 Mauslinien mit modifiziertem Östrogenrezeptor (Laboratory, 2021b). Cre-ERT2 wird durch die Anwesenheit von Tamoxifen, trotz mehrfacher Weiterentwicklung, nicht zu 100 % aktiviert, sondern nur zu ca. 50 % (Danielian et al., 1993; Hayashi & McMahon, 2002).

Dies spiegelt sich auch in den Ergebnissen der Immunfluoreszenzfärbung von Klf4 wider, mit denen die erfolgreiche partielle Deletion von Klf4 in SFTPC nachgewiesen werden soll. In der WT-Gruppe lagen in Normoxie bzw Hyperoxie durchschnittlich 9.4 bzw 12.2 % Klf4 + SFTPC Zellen vor, in der Knockoutgruppe immerhin noch 5.1 bzw 6.6 % Klf4+ SFTPC Zellen, entsprechend ca. 54 % (*Abschnitt 4.31*).

Die Verwendung einer Tamoxifen-induzierbaren Cre-Rekombinase wurde erstmals im adulten Tier beschrieben und galt lange Zeit in der späten Gestations-/ und Perinatalperiode, unter anderem aufgrund der komplizierten Injektion, als technisch anspruchsvoll. Inzwischen ist die Applikation von Tamoxifen an P3 mehrfach beschrieben (Danielian et al., 1998; Hayashi & McMahon, 2002; Lizen et al., 2015; Santagati et al., 2005) und auch in unserer AG etabliert. Die postnatale Verabreichung erfolgt in der Regel intragastral. Bei pränataler Applikation erhält das Muttertier Tamoxifen oral oder intraperitoneal (Lizen et al., 2015). Die Applikation von Tamoxifen oder seines aktiven Metaboliten kann toxisch sein. Pränatal führt eine Applikation in der frühen Schwangerschaft zu verschiedenen embryonalen Phänotypen, später in der Schwangerschaft zu gehäuften Aborten (Hayashi & McMahon, 2002) . Eine geringere Toxizität und höhere Effektivität wird durch die orale Applikation in der Schwangerschaft beschrieben

(Park et al., 2008). Beim Menschen wird Tamoxifen in der Regel zur Behandlung des Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinoms eingesetzt. Zur Behandlung des Mammakarzinoms wird laut S3-Leitlinie eine Dosierung von 20 mg täglich über mindestens 5 Jahre empfohlen (AWMF, November 2017). Für das Modell der BPD sind gängige Dosierungen wie sie z.B. von Monvoisin et al (0.05-0.1 mg/Tier/Tag für 3 Tage) (Monvoisin et al., 2006) oder Imayoshi et al (0.6 mg/Maus/Tag (intraperitoneal) an P1 und P7) (Imayoshi et al., 2010) beschrieben worden sind, nicht anwendbar. Eine Dosierung von 2 * 0.4 mg appliziert an P1 und P2 führt unter Hyperoxie (FiO₂ 0.85) in Experimenten von Morty et al zu 100 % Letalität. Dies ist auf die Akkumulation von Sauerstoff- und Tamoxifen-Toxizität zurückzuführen. Eine Dosis von 0.2 mg appliziert an P1 wird als sicher beschrieben (Ruiz-Camp et al., 2017). In dem vorgelegten Experiment wird eine Dosis von 0.1 mg Tamoxifen (gewichtsadaptiertes Injektionsvolumen von 0.01 ml/g KG) verwendet.

Zusammenfassend ist das CreLoxp-Verfahren ein in der Forschung häufig verwendetes Verfahren, um einen (konditionalen) Knockout eines Gens zu induzieren. Ein Grund dafür sind einfache Anwendung, Flexibilität mit guter Steuerbarkeit und geringe Kosten. Zwischen 1981-2017 wurden 3000 Artikel veröffentlicht, die mit dem CreLoxp-Verfahren arbeiten (McLellan et al., 2017). Das für unsere Experimente verwendete Verfahren, ein AT2-spezifischer Knockout von Klf4, wurde von Gui et. al 2012 beschrieben (Gui et al., 2012) und ist heutzutage weiterhin etabliert in der Lungenforschung (Royer & Cook, 2021; Wilson et al., 2022). Verbesserungsbedarf besteht an einer stärkeren sowie spezifischeren Aktivierung des Östrogenrezeptors durch Tamoxifen zB durch weitere Steigerung der Sensitivität dieses Rezeptors. Die Toxizität des Tamoxifens ist bei der verwendeten Dosis zu vernachlässigen.

5.24 Zeitpunkt der Analyse

Zu diskutieren sind der Zeitpunkt der Euthanasie sowie der Zeitpunkt der Tamoxifen-Injektion. Die Euthanasie an P21 wurde gewählt, da hier die Expression von Klf4 postnatal am höchsten ist. Dies wurde durch Experimente unserer Arbeitsgruppe gezeigt. Zudem entspricht der Zeitpunkt dem Ende der Alveolenbildung bei der Maus (Warburton et al., 2010). Mögliche weitere Zeitpunkte zur Analyse der Lungen wären vor Beginn bzw. nach abgeschlossener Alveolenbildung. Diese reicht von P5-P30 (Hussain et al., 2017), die Proliferation der Alveolarepithelzellen reicht von P7-P21 (Kauffman et al., 1974). Der Zeitpunkt P5 eignet sich zur Untersuchung des präventiven Potentials, P30 gäbe Aufschluss über das regenerative Potential eines Verlusts von Klf4 in AT2.

Die Tamoxifen-Gabe erfolgte an P3. Eine Mäuselunge an P3 befindet sich im sakkulären Entwicklungsstadium d.h. dem Stadium vor der Alveolenbildung. Dieses Stadium entspricht dem eines frühgeborenen Kindes (Warburton et al., 2010). Die gestörte Alveolarisation ist von

zentraler Bedeutung in der Pathophysiologie der BPD. Um die AT2 Homöostase zu untersuchen, eignet sich die Gabe von Tamoxifen an P3, da so die Deletion von Klf4 in den Peak der Proliferation der Alveolarepithelzelle fällt.

Studien, die nach P30 durchgeführt wurden – und damit langfristige Folgen der Hyperoxie Exposition untersuchen - liegen bereits vor (Kumar et al., 2016; B. B. Warner et al., 1998) und wären auch für vorliegendes Projekt interessant (s. *AT2 Verlust – Freund oder Feind?*).

Die Wirkung des Tamoxifens, inklusive Wirkungsbeginn und Wirkungsdauer, ist von mehreren Faktoren wie Alter des Tieres, Zelltyp, Gewicht und Dosis abhängig. Im murinen Gewebe setzt die Wirkung des Tamoxifens ungefähr nach 6 Stunden ein und hält ca. 48 Stunden an. (Hayashi & McMahon, 2002) Bei einer Zeitspanne von 18 Tagen zwischen Injektion und Euthanasierung, kann davon ausgegangen werden, dass die Wirkung des Tamoxifens eingesetzt und die Cre-Recombinase aktiviert worden ist.

5.25 Spezies

Eine murine Lunge wird physiologischerweise im sakkulären Stadium ihrer Lungenentwicklung geboren und ist hiermit auf eine Exposition gegenüber erhöhten Sauerstoffkonzentrationen vorbereitet. Dahingegen ist die infantile Lunge normalerweise erst im alveolären Stadium einer erhöhten Sauerstoffexposition ausgesetzt, die Lunge im sakkulären Stadium ist normalerweise nur Hypoxie in utero exponiert. Daher ist fraglich, inwieweit die pulmonalen Veränderungen am murinen Modell auf den Menschen zu übertragen sind (Buczynski et al., 2013). Modelle, die mit größeren Tieren arbeiten umgehen dieses Problem. Schafe und Affen werden, wie der Mensch, physiologischerweise im alveolären Stadium ihrer Lungenentwicklung geboren. Auch in Struktur und Dimension kommen die Lungen eher an eine menschliche Lunge heran, weshalb sie sich insbesondere für funktionelle Untersuchungen (z.B. Surfactantgabe, Wahl der Tidalvolumina) eignen (Lars J Björklund et al., 1997; Ikegami & Jobe, 2002). In den Modellen wird eine Frühgeburt mittels Sectio ausgelöst (Lämmer nach 80-85% der Schwangerschaft und Paviane nach 65-75% der Schwangerschaft) (Albertine, 2015).

5.26 Unterschiede zwischen den Geschlechtern

Es gibt Studien, die eine Atemwegs-Hyperreaktivität in männlichen Frühgeborenen im frühen Stadium nachweisen (Laughon et al., 2011). Zu einem späteren Zeitpunkt lässt sich beim weiblichen Geschlecht eine Atemwegsüberempfindlichkeit nachweisen: bei erwachsenen Mäusen zeichnet sich das Weibchen durch eine erhöhte Empfindlichkeit auf Methacholin aus (McKenzie et al., 2010; Regal et al., 2014), beim 19 Jahre alten Menschen ist die Prävalanz von Asthma erhöht (Vrijlandt et al., 2005). Die Unterschiede sind am ehesten hormonell bedingt – Östrogen reguliert über Zytokine und Chemokine Inflammation (Neriishi & Frank, 1984; Speyer et al., 2005).

In dem vorliegenden Projekt wurden die Geschlechter nicht getrennt betrachtet.

5.3 AT2-Verlust: Freund oder Feind?

Mithilfe von qRT-PCR sowie immunhistochemischen Verfahren wurde untersucht, wie sich die AT2 unter dem Einfluss von Hyperoxie und zellspezifischen Klf4-Knockout verändert. Es zeigten sich wenig signifikante Ergebnisse. Der Knockout von Klf4 führt zu signifikant weniger AT2 unter Hyperoxie (Abb. 22,24). Im Verhältnis zu allen Zellen, nimmt die Anzahl der AT2 unter Hyperoxie in beiden Gruppen zu (Abb. 22,24). In der Knockoutgruppe kommt es unter Hyperoxie zu einer signifikant gesteigerten Expression des Seneszenzmarkers P21 (Abb. 25). An diesem Punkt ist zu erwähnen, dass es sich bei der Analyse von Genexpressionsmarkern um Lungenhomogenate handelt. Das heißt, es bleibt letztlich unklar, welche Zellen P21 produzieren und zur Erhöhung des Seneszenzmarkers beitragen. Um das herauszufinden müsste man zum Beispiel *single cell* Analysen mittels RNA-Sequenzierung (Slovin et al., 2021) durchführen. Eine andere Möglichkeit wäre eine histologische Co-Färbung (IF P21 + SFTPC).

Studien zeigen, dass Hyperoxie kurzfristig zu einer Expansion von AT2 und einer vermehrten Produktion von Surfactant führt. Nach Beendigung der Sauerstoff-Exposition kommt es jedoch langfristig zu einem Verlust von AT2 (Kumar et al., 2016; Yee et al., 2006). AT2, als alveoläre Stammzelle, generiert Zellerneuerung. Über die Produktion von Surfactant ist sie ebenfalls an der Immunabwehr beteiligt (Wert et al., 1993). Daher geht ein Verlust von AT2 mit einer erhöhten Infektanfälligkeit und emphysematösen Veränderungen einher und ist mitverantwortlich für die langfristigen Folgeerscheinungen der BPD (Kumar et al., 2016).

5.31 Crosstalk AT2 + Endothelzelle

In dem vorliegenden Projekt kommt es Hyperoxie-induziert zu einem Verlust von VEGFA und Cdh5, dieser Verlust ist jedoch nur in der Kontrollgruppe signifikant (Abb. 16). In der Klf4-/- Gruppe liegen signifikant mehr Gefäße vor (Abb. 15). Die gestörte Vaskulo- und Angiogenese ist elementarer Bestandteil in der Pathogenese der BPD. Für die Regulation der Gefäßbildung spielen der Wachstumsfaktor VEGFA sowie die endothelialen Vorläuferzellen (EPC) eine entscheidende Rolle.

VEGFA wird u.a. durch AT2 und Alveolarepithelzellen sezerniert und wirkt parakrin auf endotheliale Vorläuferzellen. Durch einen Hyperoxie-induzierten Untergang von AT2 kommt es in der Folge auch zu einem Verlust von VEGFA (Yee et al., 2006). Studien zeigen jedoch kontroverse Daten (Buczynski et al., 2013) zur Wirkung von VEGFA auf Alveolenbildung und Lungenstruktur: durch Gabe von VEGFA kann eine gestörte Alveolenbildung behandelt werden und VEGF – Inhibitoren lösen alveoläre Schädigung aus, eine Überexpression von

VEGFA jedoch schädigt die Lungenstruktur (Bancalari & Jain, 2019; M. J. Evans et al., 1975; Hussain et al., 2017; Kunig et al., 2005; Le Cras et al., 2002; McGrath-Morrow et al., 2005).

Endothelzellen erneuern sich alle 7 Tage im Gegensatz zu AT2, die sich alle 4 Wochen erneuern. Daher sind Endothelzellen sensibel auf Einflüsse durch Hyperoxie (Evans & Hackney, 1972). Anders als die Alveolarepithelzellen, proliferieren die Endothelzellen insbesondere bis Tag 10 (Kauffman et al., 1974; B. B. Warner et al., 1998). Sie bilden sich aus endothelialen Vorläuferzellen. Die Gabe von EPC verbessert die Lungenfunktion in Kindern mit BPD, bei denen die Zahl dieser signifikant reduziert ist (Kolesnichenko et al., 2021).

Klf4 stimuliert die Sekretion von VEGFA: hohe Konzentrationen von Klf4 gehen in Normoxie und Hypoxie mit hohen Leveln von VEGFA einher, niedrige Mengen von Klf4 mit niedrigen Leveln von VEGFA (Cuttano et al., 2016; Wang et al., 2015). Infolge der Klf4-Überexpression kommt es zu einer Überexpression von VEGFA und Aktivierung des Notch-Pathways und hierdurch zu einer ineffektiven Angiogenese (Hale et al., 2014).

Der stärkere Verlust von AT2 unter Hyperoxie in der Klf4-Knockoutgruppe kann durch vermehrte Apoptose erklärt werden. Eine vermehrte Expression von AT1-Markern weist darauf hin, dass es zudem zu einer verstärkten Umwandlung von AT2 zu AT1 gekommen sein könnte. Um dies nachzuweisen, bedarf es weiterer Untersuchungen mittels single cell Analysen oder Co-Immunfluoreszenzfärbungen (*fate mapping*).

Die deutlich verbesserte Gefäßversorgung in Hyperoxie-exponierten Lungen mit AT-spezifischem Klf4^{-/-} ist auffallend. Anders als in Vorstudien führte der Knockout von Klf4 zu keinem gesteigerten Verlust von VEGFA, sondern eher zu einem stabilisierenden Effekt unter Hyperoxie. Damit könnte ein protektiver Effekt des AT2 spezifischen Klf4^{-/-} und damit ein positiver Effekt des AT2 Verlustes postuliert werden.

Die Frage ob ein AT2 Verlust Freund oder Feind ist, kann letztendlich nur mit Langzeitstudien geklärt werden. Nach Rückführung der Tiere unter Raumluft könnten die Frage geklärt werden, ob der Knockout von Klf4 in AT2 langfristig protektiven Effekt auf Lungenstruktur und Funktion hat oder ob durch einen frühen „Verbrauch“ das regenerative Potential (Stammzellkapazität) der AT2 aufgebraucht wird.

5.4 Welche Rolle hat Klf4 in anderen Lungenerkrankungen?

Im Folgenden werden einige pulmonale Erkrankungen diskutiert, in denen Klf4 eine Rolle spielt: (i) Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) kann pathophysiologisch in eine emphysemdominante (E) und eine atemwegsdominante Form (A) eingeteilt werden. Die zweite Form geht auf eine Überreaktion der Makrophagen zurück, die wiederum von Faktoren wie Klf4 stimuliert werden. In Männern mit COPD Typ A wurde eine signifikante Elevation von

Klf4 nachgewiesen. Hier spielt die Abhängigkeit vom Geschlecht eine starke Rolle: bei Frauen mit COPD A ist Klf4 nicht relevant erhöht (Esteve-Codina et al., 2021). (ii) In der Pathogenese des Asthmas reguliert Klf4 die inflammatorische Komponente über die Fibrozytenaktivierung und proinflammatorische Zytokine. Hier wird durch den Knockout von Klf4 die Atemwegshyperreaktivität gesenkt sowie fibrotische Veränderungen reduziert (Nimpong et al., 2017; Song et al., 2021; Song et al., 2018). (iii) In der Pathogenese der idiopathischen Lungenfibrose (IPF) wurde die Funktion der AT2 beschrieben. Über externe Stressoren kommt es zur Freisetzung von proinflammatorischen Wachstumsfaktoren und hierüber unter anderem durch Klf4 zur epithelial-mesenchymalen Transformation sowie Einwanderung von Fibroblasten (Zhang & Wang, 2023). (iv) Die pulmonal arterielle Hypertension (PAH) geht mit einer reduzierten nukleären Expression von Klf4 einher. Über die Reduktion des Stickstoffmonoxid und einer Erhöhung von Endothelin-1 verschlechtert sich die PAH bei endotheliale Knockout von Klf4 unter Hypoxie (Ban et al., 2019; Shatat et al., 2014).

Wir konnten zeigen, dass ein Knockout von Klf4 die neonatalen Lungen vor einer Zunahme der Septendicke nach Hyperoxie-Exposition schützt (*Abb. 20*). Andererseits wiesen diese Lungen einen signifikant höheren Kollagenanteil auf und auch auf mRNA-Ebene exprimierten diese Tiere teils tendenziell mehr Kollagen (*Abb. 17, 18*).

Wie bereits erwähnt, stimuliert Klf4 die Expression von endothelialen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren unter Hypoxie. Wir konnten unter Hyperoxie einen gegenteiligen Effekt nachweisen – hier scheint ein Knockout von Klf4 die Produktion von VEGFA teilweise zu stabilisieren und vor einem Gefäßverlust zu schützen.

Die zellspezifische Rolle von Klf4 führt zu einer unterschiedlicher Funktion von Klf4 in Lungenerkrankungen, die in Pathogenese und Ausprägung sehr heterogen sind.

5.5 Ausblick

Wie bereits erwähnt, ist ein Nachteil der vorliegenden Untersuchungen, dass RNA-Analysen nicht AT2-spezifisch durchgeführt wurden. Um zum Beispiel die AT2-spezifische Expression von VEGFA oder Apoptosemarkern zu untersuchen, wären *single-cell* Analysen hilfreich. Mithilfe von *single-cell* Verfahren kann durch Markierung, Selektion und Lyse die zellspezifische Genexpression untersucht werden (Ashton et al., 2021; Ziegenhain et al., 2017). Eine Methode ist die Markierung über *yellow fluorescent protein* (YFP) und die Selektion über *fluorescent-activated cell sorting* (FACS) (Dutta et al., 2013). Diese Methode ist auch in unserer AG etabliert (Bultmann-Mellin et al., 2017). Hiermit könnte der Verlust von AT2 durch Klf4 Knockout im Rahmen eines *fate mappings* (Differenzierung oder Apoptose) analysiert werden.

Die Analyse des vermutlich protektiven Effekts eines Klf4-Knockouts in AT2 auf die pulmonale Gefäßstruktur könnte durch folgende Untersuchungen ergänzt werden: Knockout von Klf4 in Endothelzellen (EC) oder Analyse der AT2-Endothelzellinteraktion. Diese Interaktion über verschiedene Transmitter wie *insulin-like growth factor 1* wurde in Studien bereits gezeigt. An diesem Punkt ist auch zu erwähnen, dass in der Lunge sechs Arten EC vorkommen, die in der Pathogenese der BPD (aber auch anderer Lungenerkrankungen wie der COPD, Fibrose, Pneumonie und PAH) von Relevanz sind (Schupp et al., 2021; Vonk Noordegraaf et al., 2019). Eine Analyse der Bedeutung der Interaktionen der verschiedenen EC mit AT2, aber auch ein EC-spezifischer Knockout von Klf4 könnte klären, warum ein Knockout von Klf4 in AT2 die Gefäßstruktur in neonatalen Hyperoxie-exponierten murinen Lungen verbessert.

Möglichkeiten, die AT2 Homöostase langfristig zu verschiedenen Zeitpunkten *in vivo* zu untersuchen und zu beeinflussen werden im Folgenden erwähnt.

Mittels *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* und *CRISPR related protein* (CRISPR-Cas) wird eine Endonuklease bzw. das genetische Material für eine Endonuklease sowie eine *single-guide RNA (sgRNA)* über einen Vektor in den Zellkern eingeführt. Über die *sgRNA* wird die Bindung der Endonuklease an das Zielgen initiiert, in der Folge entstehen Doppelstrangbrüche. Im Gegensatz zu CreLoxp besteht über CrispCas neben einer Gendeletion auch die Möglichkeit, die Expression eines Gens zu steigern (Bhatia et al., 2023; Vaghari-Tabari et al., 2022). Aktuell werden 3 Vektoren untersucht (Nanopartikel, virale Vektoren und *Virus-like particles*) (Raguram et al., 2022). Hierbei werden Nanopartikel zum Gebrauch im Menschen bevorzugt (Nayerossadat et al., 2012; Wu et al., 2018) und bei genetischen Erkrankungen mit Über-/ oder Unterexpression eines bestimmten Gens (Raguram et al., 2022) wie der Amyloidose (Gillmore et al., 2021), aber auch in der Krebstherapie (Chakraborty et al., 2021) eingesetzt. Die COVID19-Impfung (Moderna, BionTech) ist die erste Impfung, die ihre Wirkung über Nanopartikel entfaltet (Hadj Hassine, 2022; Polack et al., 2020). Nur bei wenigen Zellen u.a. humanen Stammzellen besteht die Möglichkeit, diese *in vitro* zu bearbeiten und danach in den Organismus zurückzuführen (Ferrari et al., 2022) daher ist die Anwendung v.a. auf Versuche *in vitro* beschränkt (Raguram et al., 2022; Vaghari-Tabari et al., 2022).

In vitro wurde eine Methode etabliert, um humane AT2 mittels Nanopartikel zu immortalisieren. Immortalisierte AT2 zeichnen sich durch eine starke Expression von Surfactant sowie AT1 Charakteristika aus (Katsumiti et al., 2020). Diese Methode stellt ggf. eine Rescue-Therapie eines Hyperoxie-induzierten Verlusts von AT2-Stammzellkapazität dar.

Mit CRISPR-Cas und Nanopartikeln wäre zukünftig auch ein Knockout von Klf4 *in vivo* denkbar, wobei *off-target* Effekte (d.h. ein ungewollter Knockout anderer Gene als des Zielgens) und der fehlende zell-/ organspezifische Knockout sowie die fehlende Möglichkeit

der zeitlichen Steuerung zu beachten sind. Die inhalative Applikation von Nanopartikeln stellt eine Möglichkeit dar, weniger systemische Nebenwirkungen zu erzielen. Beim Pferd konnten über die inhalative Applikation von CpG-DNA entzündliche und allergische Prozesse im Asthma reduziert werden (Klier et al., 2022), in der Krebstherapie wurden durch die inhalative Applikation von Chemotherapeutika Erfolge erzielt (Mangal et al., 2017). So besteht die Möglichkeit eines lungen-spezifischen Knockouts von Klf4 in vivo - ein zellspezifischer Knockout (AT2) mit Nanopartikeln ist bislang noch nicht möglich.

6. Literaturverzeichnis

- Ahmad, S., White, C. W., Chang, L.-Y., Schneider, B. K., Allen, C. B. J. A. J. o. P.-L. C., & Physiology, M. (2001). Glutamine protects mitochondrial structure and function in oxygen toxicity. *280*(4), L779-L791.
- Ahmed, M. N., Suliman, H. B., Folz, R. J., Nozik-Grayck, E., Golson, M. L., Mason, S. N., Auten, R. L. J. A. j. o. r., & medicine, c. c. (2003). Extracellular superoxide dismutase protects lung development in hyperoxia-exposed newborn mice. *167*(3), 400-405.
- Ahn, S. Y., Park, W. S., Kim, Y. E., Sung, D. K., Sung, S. I., Ahn, J. Y., & Chang, Y. S. (2018). Vascular endothelial growth factor mediates the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles against neonatal hyperoxic lung injury. *Experimental and Molecular Medicine*, *50*(4), 26. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0055-8>
- Albertine, K. H. (2015). Utility of large-animal models of BPD: chronically ventilated preterm lambs. *American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology*, *308*(10), L983-L1001. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00178.2014>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015a). *Molecular biology of the cell* (6th ed.). Garland Science.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015b). *Molecular biology of the cell* (6th ed.). Garland Science.
- Alder, J. K., Georgantas, R. W., 3rd, Hildreth, R. L., Kaplan, I. M., Morisot, S., Yu, X., McDevitt, M., & Civin, C. I. (2008). Kruppel-like factor 4 is essential for inflammatory monocyte differentiation in vivo. *Journal of Immunology*, *180*(8), 5645-5652. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.8.5645>
- Alejandre Alcazar, M. A., Kaschwich, M., Ertsey, R., Preuss, S., Milla, C., Mujahid, S., Masumi, J., Khan, S., Mokres, L. M., Tian, L., Mohr, J., Hirani, D. V., Rabinovitch, M., & Bland, R. D. (2018). Elafin Treatment Rescues EGFR-Klf4 Signaling and Lung Cell Survival in Ventilated Newborn Mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *59*(5), 623-634. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-0332OC>
- Alejandre-Alcázar, M. A., Kwapiszewska, G., Reiss, I., Amarie, O. V., Marsh, L. M., Sevilla-Pérez, J., Wygrecka, M., Eul, B., Köbrich, S., Hesse, M., Schermuly, R. T., Seeger, W., Eickelberg, O., & Morty, R. E. (2007). Hyperoxia modulates TGF-beta/BMP signaling in a mouse model of bronchopulmonary dysplasia. *American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology*, *292*(2), L537-549. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00050.2006>
- Alejandre-Alcázar, M. A., Michiels-Corsten, M., Vicencio, A. G., Reiss, I., Ryu, J., de Krijger, R. R., Haddad, G. G., Tibboel, D., Seeger, W., Eickelberg, O., & Morty, R. E. (2008). TGF-beta signaling is dynamically regulated during the alveolarization of rodent and human lungs. *Developmental Dynamics*, *237*(1), 259-269. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21403>
- Ali, Z., Schmidt, P., Dodd, J., & Jeppesen, D. L. (2013). Bronchopulmonary dysplasia: a review. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, *288*(2), 325-333. <https://doi.org/10.1007/s00404-013-2753-8>
- Alvira, C. M., & Morty, R. E. (2017). Can We Understand the Pathobiology of Bronchopulmonary Dysplasia? *Journal of Pediatrics*, *190*, 27-37. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2017.08.041>
- Anderson, K. P., Kern, C. B., Crable, S. C., & Lingrel, J. B. (1995). Isolation of a gene encoding a functional zinc finger protein homologous to erythroid Kruppel-like factor: identification of a new multigene family. *Molecular and Cellular Biology*, *15*(11), 5957-5965. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.11.5957>
- Andres, R. L., & Day, M. C. (2000). Perinatal complications associated with maternal tobacco use. *Seminars in Neonatology*, *5*(3), 231-241. <https://doi.org/10.1053/siny.2000.0025>
- Antushevich, H., & Wojcik, M. (2018). Review: Apelin in disease. *Clinica Chimica Acta*, *483*, 241-248. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.05.012>
- Aquila, I., Marino, F., Cianflone, E., Marotta, P., Torella, M., Mollace, V., Indolfi, C., Nadal-Ginard, B., & Torella, D. (2018). The use and abuse of Cre/Lox recombination to identify adult

- cardiomyocyte renewal rate and origin. *Pharmacological Research*, 127, 116-128.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.06.012>
- Armanian, A., Mohammadzadeh, M., & Soleimani, R. J. I. J. I. M. S. (2015). The rehospitalization rates of low-birth-weight infants in Isfahan Shahid Beheshti Hospital. *33*(351), 1547-1554.
- Armanian, A.-M., Mohammadzadeh, M., Soleimani, R., Salehimehr, N., & Hasanzadeh, A. J. I. J. o. N. I. (2015). The duration of hospitalization and readmission rate of low birth weight infants in a tertiary referral hospital in Isfahan, Iran. *6*(3), 17-21.
- Armanian, A. M., Barekatin, B., Sohrabi, F., Salehimehr, N., & Mansourian, M. (2019). The Prevalence of Complications of Prematurity among 1000 Newborns in Isfahan, Iran. *Adv Biomed Res*, 8, 12. https://doi.org/10.4103/abr.abr_84_18
- Ashbaugh, D. G., Bigelow, D. B., Petty, T. L., & Levine, B. E. (1967). Acute respiratory distress in adults. *Lancet*, 2(7511), 319-323. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(67\)90168-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(67)90168-7)
- Ashton, J. M., Rehrauer, H., Myers, J., Myers, J., Zanche, M., Balys, M., Foox, J., Mason, C. E., Steen, R., Kuentzel, M., Aquino, C., Garcia-Reyero, N., & Chittur, S. V. (2021). Comparative Analysis of Single-Cell RNA Sequencing Platforms and Methods. *Journal of Biomolecular Techniques*, 32(4). <https://doi.org/10.7171/3fc1f5fe.3eccea01>
- Auten, R. L., O'Reilly, M. A., Oury, T. D., Nozik-Grayck, E., Whorton, M. H. J. A. J. o. P.-L. C., & Physiology, M. (2006). Transgenic extracellular superoxide dismutase protects postnatal alveolar epithelial proliferation and development during hyperoxia. *290*(1), L32-L40.
- AWMF, D., DKS. (November 2017). *Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms*
 AWMF-Registernummer: 032-045OL
 Retrieved 16.05.2023 from
- Bachman, J. (2013). Reverse-transcription PCR (RT-PCR). *Methods in Enzymology*, 530, 67-74.
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-420037-1.00002-6>
- Balasubramaniam, V., Mervis, C. F., Maxey, A. M., Markham, N. E., Abman, S. H. J. A. J. o. P.-L. C., & Physiology, M. (2007). Hyperoxia reduces bone marrow, circulating, and lung endothelial progenitor cells in the developing lung: implications for the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *292*(5), L1073-L1084.
- Ban, Y., Liu, Y., Li, Y., Zhang, Y., Xiao, L., Gu, Y., Chen, S., Zhao, B., Chen, C., & Wang, N. (2019). S-nitrosation impairs KLF4 activity and instigates endothelial dysfunction in pulmonary arterial hypertension. *Redox Biol*, 21, 101099. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101099>
- Bancalari, E., & Jain, D. (2019). Bronchopulmonary Dysplasia: 50 Years after the Original Description. *Neonatology*, 115(4), 384-391. <https://doi.org/10.1159/000497422>
- Barkauskas, C. E., Counce, M. J., Rackley, C. R., Bowie, E. J., Keene, D. R., Stripp, B. R., Randell, S. H., Noble, P. W., & Hogan, B. L. (2013). Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *Journal of Clinical Investigation*, 123(7), 3025-3036. <https://doi.org/10.1172/jci68782>
- Beck, S., Wojdyla, D., Say, L., Betran, A. P., Merialdi, M., Requejo, J. H., Rubens, C., Menon, R., & Van Look, P. F. (2010). The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity. *Bulletin of the World Health Organization*, 88(1), 31-38.
<https://doi.org/10.2471/BLT.08.062554>
- Beigi, A., Taheri, N., & Norouzi, H. R. J. T. U. M. J. (2013). The prevalence of very preterm deliveries, risk factors, and neonatal complications in Arash women hospital: a brief report. *71*(3).
- Bernkopf, D. B., Hadjihannas, M. V., & Behrens, J. (2015). Negative-feedback regulation of the Wnt pathway by conductin/axin2 involves insensitivity to upstream signalling. *Journal of Cell Science*, 128(1), 33-39.
- Bhandari, V. (2010). Hyperoxia-derived lung damage in preterm infants. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*,
- Bhandari, V., Bizzarro, M. J., Shetty, A., Zhong, X., Page, G. P., Zhang, H., Ment, L. R., & Gruen, J. R. (2006). Familial and genetic susceptibility to major neonatal morbidities in preterm twins. *Pediatrics*, 117(6), 1901-1906. <https://doi.org/10.1542/peds.2005-1414>

- Bhatia, S., Pooja, & Yadav, S. K. (2023). CRISPR-Cas for genome editing: Classification, mechanism, designing and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 238, 124054. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124054>
- Biosciences, N. (04/2005). *Instructions* Retrieved 31.08.2021 from <https://www.nichirei.co.jp/bio/english/products/pdf/414261f.pdf>
- Björklund, L. J., Ingimarsson, J., Curstedt, T., John, J., Robertson, B., Werner, O., & Vilstrup, C. T. (1997). Manual ventilation with a few large breaths at birth compromises the therapeutic effect of subsequent surfactant replacement in immature lambs. *Pediatric Research*, 42(3), 348-355. <https://doi.org/10.1203/00006450-199709000-00016>
- Björklund, L. J., Ingimarsson, J., Curstedt, T., John, J., Robertson, B., Werner, O., & Vilstrup, C. T. (1997). Manual ventilation with a few large breaths at birth compromises the therapeutic effect of subsequent surfactant replacement in immature lambs. *Pediatric Research*, 42(3), 348-355.
- Blencowe, H., Cousens, S., Oestergaard, M. Z., Chou, D., Moller, A. B., Narwal, R., Adler, A., Vera Garcia, C., Rohde, S., Say, L., & Lawn, J. E. (2012). National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. *Lancet*, 379(9832), 2162-2172. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(12\)60820-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(12)60820-4)
- Blutke, A., & Wanke, R. (2018). Sampling Strategies and Processing of Biobank Tissue Samples from Porcine Biomedical Models. *J Vis Exp*(133). <https://doi.org/10.3791/57276>
- Bonikos, D. S., Bensch, K. G., Northway, W. H., Jr., & Edwards, D. K. (1976). Bronchopulmonary dysplasia: the pulmonary pathologic sequel of necrotizing bronchiolitis and pulmonary fibrosis. *Human Pathology*, 7(6), 643-666. [https://doi.org/10.1016/s0046-8177\(76\)80077-9](https://doi.org/10.1016/s0046-8177(76)80077-9)
- Bose, C., Van Marter, L. J., Laughon, M., O'Shea, T. M., Allred, E. N., Karna, P., Ehrenkranz, R. A., Boggess, K., & Leviton, A. (2009). Fetal growth restriction and chronic lung disease among infants born before the 28th week of gestation. *Pediatrics*, 124(3), e450-458. <https://doi.org/10.1542/peds.2008-3249>
- Bouch, S., O'Reilly, M., Harding, R., & Sozo, F. (2015). Neonatal exposure to mild hyperoxia causes persistent increases in oxidative stress and immune cells in the lungs of mice without altering lung structure. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 309(5), L488-L496.
- Bourbon, J., Boucherat, O., Chailley-Heu, B., & Delacourt, C. J. P. r. (2005). Control mechanisms of lung alveolar development and their disorders in bronchopulmonary dysplasia. 57(5 Part 2), 38R.
- Buczynski, B. W., Maduekwe, E. T., & O'Reilly, M. A. (2013). The role of hyperoxia in the pathogenesis of experimental BPD. *Seminars in Perinatology*,
- Bührer, C., Felderhoff-Müser, U., Gembruch, U., Hecher, K., Kainer, F., Kehl, S., Kidszun, A., Kribs, A., Krones, T., Lipp, V., Maier, R. F., Mitschdörfer, B., Nicin, T., Roll, C., & Schindler, M. (2020). [Not Available]. *Zeitschrift für Geburtshilfe und Neonatologie*, 224(5), 244-254. <https://doi.org/10.1055/a-1230-0810> (Frühgeborene an der Grenze der Lebensfähigkeit (Entwicklungsstufe S2k, AWMF-Leitlinien-Register Nr. 024/019, Juni 2020).)
- Bultmann-Mellin, I., Dinger, K., Debuschewitz, C., Loewe, K. M. A., Melcher, Y., Plum, M. T. W., Appel, S., Rappl, G., Willenborg, S., Schauss, A. C., Jungst, C., Kruger, M., Dressler, S., Nakamura, T., Wempe, F., Alejandre Alcazar, M. A., & Sterner-Kock, A. (2017). Role of LTBP4 in alveolarization, angiogenesis, and fibrosis in lungs. *American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology*, 313(4), L687-L698. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00031.2017>
- Burri, P. (1997). Growth and Development of the Lung.
- Burri, P. (1999). Lung disease.
- Burri, P. H. (1984). Fetal and postnatal development of the lung. *Annual Review of Physiology*, 46, 617-628. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.46.030184.003153>
- Burri, P. H. (2006). Structural aspects of postnatal lung development - alveolar formation and growth. *Biology of the Neonate*, 89(4), 313-322. <https://doi.org/10.1159/000092868>

- Butler, J. P., Loring, S. H., Patz, S., Tsuda, A., Yablonskiy, D. A., & Mentzer, S. J. (2012). Evidence for adult lung growth in humans. *New England Journal of Medicine*, 367(3), 244-247. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1203983>
- Cardiff, R. D., Miller, C. H., & Munn, R. J. (2014). Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections. *Cold Spring Harb Protoc*, 2014(6), 655-658. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot073411>
- Cardoso, W. V. (1995). Transcription factors and pattern formation in the developing lung. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 269(4), L429-L442.
- Chakraborty, C., Sharma, A. R., Sharma, G., & Lee, S. S. (2021). Therapeutic advances of miRNAs: A preclinical and clinical update. *J Adv Res*, 28, 127-138. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.08.012>
- Chan, J. K. (2014). The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology. *International Journal of Surgical Pathology*, 22(1), 12-32. <https://doi.org/10.1177/1066896913517939>
- Chang, H. H., Larson, J., Blencowe, H., Spong, C. Y., Howson, C. P., Cairns-Smith, S., Lackritz, E. M., Lee, S. K., Mason, E., Serazin, A. C., Walani, S., Simpson, J. L., & Lawn, J. E. (2013). Preventing preterm births: analysis of trends and potential reductions with interventions in 39 countries with very high human development index. *Lancet*, 381(9862), 223-234. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(12\)61856-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(12)61856-x)
- Chazotte, B. (2011). Labeling nuclear DNA using DAPI. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2011(1), pdb.prot5556.
- Chen, C., Yang, S., Zhang, M., Zhang, Z., Zhang, B., Han, D., Ma, J., Wang, X., Hong, J., Guo, Y., Okunieff, P., & Zhang, L. (2013). In vitro Sirius Red collagen assay measures the pattern shift from soluble to deposited collagen. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 765, 47-53. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4989-8_7
- Chen, X., Johns, D. C., Geiman, D. E., Marban, E., Dang, D. T., Hamlin, G., Sun, R., & Yang, V. W. (2001a). Kruppel-like factor 4 (gut-enriched Kruppel-like factor) inhibits cell proliferation by blocking G1/S progression of the cell cycle. *Journal of Biological Chemistry*, 276(32), 30423-30428. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101194200>
- Chen, X., Johns, D. C., Geiman, D. E., Marban, E., Dang, D. T., Hamlin, G., Sun, R., & Yang, V. W. (2001b). Kruppel-like factor 4 (gut-enriched Kruppel-like factor) inhibits cell proliferation by blocking G1/S progression of the cell cycle. *Journal of Biological Chemistry*, 276(32), 30423-30428. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101194200>
- Chen, Z., Couble, M. L., Mouterfi, N., Magloire, H., Chen, Z., & Bleicher, F. (2009). Spatial and temporal expression of KLF4 and KLF5 during murine tooth development. *Archives of Oral Biology*, 54(5), 403-411. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2009.02.003>
- Cherng, S., Young, J., & Ma, H. (2008). Alpha-smooth muscle actin (α -SMA). *Journal of American Science*, 4(4), 7-9.
- Chiplunkar, A. R., Curtis, B. C., Eades, G. L., Kane, M. S., Fox, S. J., Haar, J. L., & Lloyd, J. A. (2013). The Kruppel-like factor 2 and Kruppel-like factor 4 genes interact to maintain endothelial integrity in mouse embryonic vasculogenesis. *BMC Developmental Biology*, 13, 40. <https://doi.org/10.1186/1471-213x-13-40>
- Coalson, J. J. (2003). Pathology of new bronchopulmonary dysplasia. *Seminars in Neonatology*, 8(1), 73-81. [https://doi.org/10.1016/s1084-2756\(02\)00193-8](https://doi.org/10.1016/s1084-2756(02)00193-8)
- Coalson, J. J., Kuehl, T. J., Escobedo, M. B., Hilliard, J. L., Smith, F., Meredith, K., Null Jr, D. M., Walsh, W., Johnson, D., Robotham, J. L. J. E., & pathology, m. (1982). A baboon model of bronchopulmonary dysplasia: II. Pathologic features. 37(3), 335-350.
- Coalson, J. J., Winter, V. T., Siler-Khodr, T., Yoder, B. A. J. A. j. o. r., & medicine, c. c. (1999). Neonatal chronic lung disease in extremely immature baboons. 160(4), 1333-1346.
- Collins, J. J. P., Tibboel, D., de Kleer, I. M., Reiss, I. K. M., & Rottier, R. J. (2017). The Future of Bronchopulmonary Dysplasia: Emerging Pathophysiological Concepts and Potential New Avenues of Treatment. *Front Med (Lausanne)*, 4, 61. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00061>

- Conde-Agudelo, A., Rosas-Bermudez, A., & Kafury-Goeta, A. C. (2006). Birth spacing and risk of adverse perinatal outcomes: a meta-analysis. *JAMA*, *295*(15), 1809-1823. <https://doi.org/10.1001/jama.295.15.1809>
- Cowan, C. E., Kohler, E. E., Dugan, T. A., Mirza, M. K., Malik, A. B., & Wary, K. K. (2010). Kruppel-like factor-4 transcriptionally regulates VE-cadherin expression and endothelial barrier function. *Circulation Research*, *107*(8), 959-966. <https://doi.org/10.1161/circresaha.110.219592>
- Cuttano, R., Rudini, N., Bravi, L., Corada, M., Giampietro, C., Papa, E., Morini, M. F., Maddaluno, L., Baeyens, N., Adams, R. H., Jain, M. K., Owens, G. K., Schwartz, M., Lampugnani, M. G., & Dejana, E. (2016). KLF4 is a key determinant in the development and progression of cerebral cavernous malformations. *EMBO Molecular Medicine*, *8*(1), 6-24. <https://doi.org/10.15252/emmm.201505433>
- Danielian, P. S., Muccino, D., Rowitch, D. H., Michael, S. K., & McMahon, A. P. (1998). Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase. *Current Biology*, *8*(24), 1323-1326. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(07\)00562-3](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(07)00562-3)
- Danielian, P. S., White, R., Hoare, S. A., Fawell, S. E., & Parker, M. G. (1993). Identification of residues in the estrogen receptor that confer differential sensitivity to estrogen and hydroxytamoxifen. *Molecular Endocrinology*, *7*(2), 232-240. <https://doi.org/10.1210/mend.7.2.8469236>
- Darby, I., Skalli, O., & Gabbiani, G. (1990). α -Smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Laboratory Investigation*, *63*(1), 21-29.
- Datta-Nemdharry, P., Dattani, N., & Macfarlane, A. J. H. S. Q. (2012). Linking maternity data for Wales, 2005-07: methods and data quality. *54*, 1-24.
- Dauger, S., Le Bourgeois, F., Guichoux, J., & Brissaud, O. (2017). [Acute respiratory distress syndrome in childhood: Changing definition and news from the Pediatric Consensus Conference]. *Archives de Pédiatrie*, *24*(5), 492-498. <https://doi.org/10.1016/j.arcped.2017.02.019> (Syndrome de detresse respiratoire aigue de l'enfant : evolution de la definition et nouveautes de la conference de consensus pediatrique.)
- Delaney, C., Wright, R. H., Tang, J.-R., Woods, C., Villegas, L., Sherlock, L., Savani, R. C., Abman, S. H., & Nozik-Grayck, E. J. P. r. (2015). Lack of EC-SOD worsens alveolar and vascular development in a neonatal mouse model of bleomycin-induced bronchopulmonary dysplasia and pulmonary hypertension. *78*(6), 634.
- Delobel-Ayoub, M., Arnaud, C., White-Koning, M., Casper, C., Pierrat, V., Garel, M., Burguet, A., Roze, J.-C., Matis, J., & Picaud, J.-C. J. P. (2009). Behavioral problems and cognitive performance at 5 years of age after very preterm birth: the EPIPAGE Study. *123*(6), 1485-1492.
- Denis, D., Fayon, M. J., Berger, P., Molimard, M., de Lara, M. T., Roux, E., & Marthan, R. J. P. r. (2001). Prolonged moderate hyperoxia induces hyperresponsiveness and airway inflammation in newborn rats. *50*(4), 515.
- Desai, T. J., Brownfield, D. G., & Krasnow, M. A. (2014). Alveolar progenitor and stem cells in lung development, renewal and cancer. *Nature*, *507*(7491), 190-194. <https://doi.org/10.1038/nature12930>
- Devlin, T. M. (Ed.). (2010). *Textbook of biochemistry with Clinical Correlations* (7th ed.). John Wiley & Sons Inc.
- Donaldson, J. G. (2001). Immunofluorescence staining. *Current Protocols in Cell Biology*, Chapter 4, Unit 4.3. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0403s00>
- Dong, P., Kaneuchi, M., Watari, H., Hamada, J., Sudo, S., Ju, J., & Sakuragi, N. (2011). MicroRNA-194 inhibits epithelial to mesenchymal transition of endometrial cancer cells by targeting oncogene BMI-1. *Molecular Cancer*, *10*, 99. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-99>
- Dutta, D., Xiang, J., & Edgar, B. A. (2013). RNA expression profiling from FACS-isolated cells of the *Drosophila* intestine. *Current Protocols in Stem Cell Biology*, *27*, 2F 2 1-2F 2 12. <https://doi.org/10.1002/9780470151808.sc02f02s27>
- Dytag, A. M., Haak, J., Yee, M., & O'Reilly, M. A. (2020). Pulmonary mechanics and structural lung development after neonatal hyperoxia in mice. *Pediatric Research*, *87*(7), 1201-1210.

- El Faleh, I., Faouzi, M., Adams, M., Gerull, R., Chnayna, J., Giannoni, E., & Roth-Kleiner, M. (2021). Bronchopulmonary dysplasia: a predictive scoring system for very low birth weight infants. A diagnostic accuracy study with prospective data collection. *European Journal of Pediatrics*, 1-9.
- Eldredge, L. C., Treuting, P. M., Manicone, A. M., Ziegler, S. F., Parks, W. C., McGuire, J. K. J. A. J. O. R. C., & Biology, M. (2016). CD11b+ mononuclear cells mitigate hyperoxia-induced lung injury in neonatal mice. *54*(2), 273-283.
- Emery, J., & Mithal, A. (1960). The number of alveoli in the terminal respiratory unit of man during late intrauterine life and childhood. *Archives of Disease in Childhood*, *35*(184), 544.
- Esteve-Codina, A., Hofer, T. P., Burggraf, D., Heiss-Neumann, M. S., Gesierich, W., Boland, A., Olaso, R., Bihoreau, M. T., Deleuze, J. F., Moeller, W., Schmid, O., Soler Artigas, M., Renner, K., Hohlfeld, J. M., Welte, T., Fuehner, T., Jerrentrup, L., Koczulla, A. R., Greulich, T., . . . Ziegler-Heitbrock, L. (2021). Gender specific airway gene expression in COPD sub-phenotypes supports a role of mitochondria and of different types of leukocytes. *Scientific Reports*, *11*(1), 12848. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91742-x>
- Evans, M. J., Cabral, L. J., Stephens, R. J., & Freeman, G. (1975). Transformation of alveolar type 2 cells to type 1 cells following exposure to NO₂. *Experimental and Molecular Pathology*, *22*(1), 142-150. [https://doi.org/10.1016/0014-4800\(75\)90059-3](https://doi.org/10.1016/0014-4800(75)90059-3)
- Evans, M. J., Cabral, L. J., Stephens, R. J., & Freeman, G. (1975). Transformation of alveolar type 2 cells to type 1 cells following exposure to NO₂. *Experimental and Molecular Pathology*, *22*(1), 142-150.
- Evans, M. J., & Hackney, J. D. (1972). Cell proliferation in lungs of mice exposed to elevated concentrations of oxygen. *Aerospace Medicine*, *43*(6), 620-622. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5035549>
- Fadous-Khalife, M. C., Aloulou, N., Jalbout, M., Hadchity, J., Aftimos, G., Paris, F., & Hadchity, E. (2016). Kruppel-like factor 4: A new potential biomarker of lung cancer. *Mol Clin Oncol*, *5*(1), 35-40. <https://doi.org/10.3892/mco.2016.883>
- Farber, S., & Wilson, J. L. (1932). Hyaline membrane in the lung: A descriptive study *Archives of Pathology*, *14*, 437.
- Farstad, T., Bratlid, D., Medbø, S., Markestad, T., & paediatrica, N. E. P. S. G. J. A. (2011). Bronchopulmonary dysplasia—prevalence, severity and predictive factors in a national cohort of extremely premature infants. *100*(1), 53-58.
- Feil, R., Wagner, J., Metzger, D., & Chambon, P. (1997). Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *237*(3), 752-757. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7124>
- Feinberg, M. W., Cao, Z., Wara, A. K., Lebedeva, M. A., Senbanerjee, S., & Jain, M. K. (2005). Kruppel-like factor 4 is a mediator of proinflammatory signaling in macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(46), 38247-38258. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509378200>
- Ferrari, S., Jacob, A., Cesana, D., Laugel, M., Beretta, S., Varesi, A., Unali, G., Conti, A., Canarutto, D., Albano, L., Calabria, A., Vavassori, V., Cipriani, C., Castiello, M. C., Esposito, S., Brombin, C., Cugnata, F., Adjali, O., Ayuso, E., . . . Naldini, L. (2022). Choice of template delivery mitigates the genotoxic risk and adverse impact of editing in human hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*, *29*(10), 1428-1444 e1429. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2022.09.001>
- Fischer, H. S., Schmolzer, G. M., Cheung, P. Y., & Buhner, C. (2018). Sustained inflations and avoiding mechanical ventilation to prevent death or bronchopulmonary dysplasia: a meta-analysis. *European Respiratory Review: An Official Journal of the European Respiratory Society*, *27*(150). <https://doi.org/10.1183/16000617.0083-2018>
- Foster, K. W., Frost, A. R., McKie-Bell, P., Lin, C. Y., Engler, J. A., Grizzle, W. E., & Ruppert, J. M. (2000). Increase of GKLf messenger RNA and protein expression during progression of breast cancer. *Cancer Research*, *60*(22), 6488-6495.
- Frank, L., Bucher, J. R., & Roberts, R. J. J. O. A. P. (1978). Oxygen toxicity in neonatal and adult animals of various species. *45*(5), 699-704.

- Frank, L. J. F. R. B., & Medicine. (1991). Developmental aspects of experimental pulmonary oxygen toxicity. *11*(5), 463-494.
- Fujikawa, J., Tanaka, M., Itoh, S., Fukushi, T., Kurisu, K., Takeuchi, Y., Morisaki, I., Wakisaka, S., & Abe, M. (2014). Kruppel-like factor 4 expression in osteoblasts represses osteoblast-dependent osteoclast maturation. *Cell and Tissue Research*, *358*(1), 177-187. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1931-8>
- Gavard, J. (2014). Endothelial permeability and VE-cadherin: a wacky comradeship. *Cell Adh Migr*, *8*(2), 158-164. <https://doi.org/10.4161/cam.29026>
- Georgakilas, A. G., Martin, O. A., & Bonner, W. M. (2017). p21: a two-faced genome guardian. *Trends in Molecular Medicine*, *23*(4), 310-319.
- Ghaleb, A. M., Katz, J. P., Kaestner, K. H., Du, J. X., & Yang, V. W. (2007). Kruppel-like factor 4 exhibits antiapoptotic activity following gamma-radiation-induced DNA damage. *Oncogene*, *26*(16), 2365-2373. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210022>
- Ghaleb, A. M., McConnell, B. B., Kaestner, K. H., & Yang, V. W. (2011). Altered intestinal epithelial homeostasis in mice with intestine-specific deletion of the Kruppel-like factor 4 gene. *Developmental Biology*, *349*(2), 310-320. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.11.001>
- Ghaleb, A. M., & Yang, V. W. (2017). Kruppel-like factor 4 (KLF4): What we currently know. *Gene*, *611*, 27-37. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.02.025>
- Gibbs, R. S., Romero, R., Hillier, S. L., Eschenbach, D. A., & Sweet, R. L. (1992). A review of premature birth and subclinical infection. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *166*(5), 1515-1528. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(92\)91628-n](https://doi.org/10.1016/0002-9378(92)91628-n)
- Gillmore, J. D., Maitland, M. L., & Lebowitz, D. (2021). CRISPR-Cas9 In Vivo Gene Editing for Transthyretin Amyloidosis. Reply. *New England Journal of Medicine*, *385*(18), 1722-1723. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2114592>
- Goldenberg, R. L., Culhane, J. F., Iams, J. D., & Romero, R. (2008). Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet*, *371*(9606), 75-84. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(08\)60074-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(08)60074-4)
- Gossen, M., & Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *89*(12), 5547-5551.
- Gouveia, L., Betsholtz, C., & Andrae, J. (2018). PDGF-A signaling is required for secondary alveolar septation and controls epithelial proliferation in the developing lung. *Development*, *145*(7). <https://doi.org/10.1242/dev.161976>
- Gui, Y. S., Wang, L., Tian, X., Feng, R., Ma, A., Cai, B., Zhang, H., & Xu, K. F. (2012). SPC-Cre-ERT2 transgenic mouse for temporal gene deletion in alveolar epithelial cells. *PLoS One*, *7*(9), e46076. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046076>
- Haagsman, H. P., & Diemel, R. V. (2001). Surfactant-associated proteins: functions and structural variation. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, *129*(1), 91-108. [https://doi.org/10.1016/s1095-6433\(01\)00308-7](https://doi.org/10.1016/s1095-6433(01)00308-7)
- Hadj Hassine, I. (2022). Covid-19 vaccines and variants of concern: A review. *Reviews in Medical Virology*, *32*(4), e2313. <https://doi.org/10.1002/rmv.2313>
- Hale, A. T., Longenecker, C. T., Jiang, Y., Debanne, S. M., Labatto, D. E., Storer, N., Hamik, A., & McComsey, G. A. (2015). HIV vasculopathy: role of mononuclear cell-associated Kruppel-like factors 2 and 4. *AIDS*, *29*(13), 1643-1650. <https://doi.org/10.1097/qad.0000000000000756>
- Hale, A. T., Tian, H., Anih, E., Recio, F. O., 3rd, Shatat, M. A., Johnson, T., Liao, X., Ramirez-Bergeron, D. L., Proweller, A., Ishikawa, M., & Hamik, A. (2014). Endothelial Kruppel-like factor 4 regulates angiogenesis and the Notch signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(17), 12016-12028. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.530956>
- Hamik, A., Lin, Z., Kumar, A., Balcells, M., Sinha, S., Katz, J., Feinberg, M. W., Gerzsten, R. E., Edelman, E. R., & Jain, M. K. (2007). Kruppel-like factor 4 regulates endothelial inflammation. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(18), 13769-13779. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700078200>
- Harrison, M. S., & Goldenberg, R. L. (2016). Global burden of prematurity. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, *21*(2), 74-79. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2015.12.007>
- Hawgood, S., & Poulain, F. R. (2001). The pulmonary collectins and surfactant metabolism. *Annual Review of Physiology*, *63*, 495-519. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.63.1.495>

- Hay, E. D. (2005). The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 233(3), 706-720.
- Hayashi, S., & McMahon, A. P. (2002). Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Developmental Biology*, 244(2), 305-318. <https://doi.org/10.1006/dbio.2002.0597>
- Heese Hde, V., Harrison, V. C., Klein, M., & Malan, A. F. (1970). Intermittent positive pressure ventilation in hyaline membrane disease. *Journal of Pediatrics*, 76(2), 183-193. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(70\)80161-5](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(70)80161-5)
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6(10), 986-994. <https://doi.org/10.1101/gr.6.10.986>
- Hendler, I., Goldenberg, R. L., Mercer, B. M., Iams, J. D., Meis, P. J., Moawad, A. H., MacPherson, C. A., Caritis, S. N., Miodovnik, M., Menard, K. M., Thurnau, G. R., & Sorokin, Y. (2005). The Preterm Prediction Study: association between maternal body mass index and spontaneous and indicated preterm birth. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 192(3), 882-886. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2004.09.021>
- Hilgendorff, A., & O'Reilly, M. A. (2015). Bronchopulmonary dysplasia early changes leading to long-term consequences. *Front Med (Lausanne)*, 2, 2. <https://doi.org/10.3389/fmed.2015.00002>
- Hinz, B., Celetta, G., Tomasek, J. J., Gabbiani, G., & Chaponnier, C. (2001). Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Molecular Biology of the Cell*, 12(9), 2730-2741.
- Ho, J. J., Subramaniam, P., & Davis, P. G. (2020). Continuous positive airway pressure (CPAP) for respiratory distress in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*, 10(10), CD002271. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002271.pub3>
- Huang, Y., de Boer, W. B., Adams, L. A., MacQuillan, G., Rossi, E., Rigby, P., Raftopoulos, S. C., Bulsara, M., & Jeffrey, G. P. (2013). Image analysis of liver collagen using sirius red is more accurate and correlates better with serum fibrosis markers than trichrome. *Liver Int*, 33(8), 1249-1256. <https://doi.org/10.1111/liv.12184>
- Hummler, H., Thome, U., & Schulze, A. (2002). Neue Beatmungsstrategien in der Neonatologie. *Monatsschrift Kinderheilkunde*, 150(6), 669-682.
- Husain, A. N., Siddiqui, N. H., & Stocker, J. T. (1998). Pathology of arrested acinar development in postsurfactant bronchopulmonary dysplasia. *Human Pathology*, 29(7), 710-717. [https://doi.org/10.1016/s0046-8177\(98\)90280-5](https://doi.org/10.1016/s0046-8177(98)90280-5)
- Hussain, M., Xu, C., Ahmad, M., Yang, Y., Lu, M., Wu, X., Tang, L., & Wu, X. (2017). Notch Signaling: Linking Embryonic Lung Development and Asthmatic Airway Remodeling. *Molecular Pharmacology*, 92(6), 676-693. <https://doi.org/10.1124/mol.117.110254>
- Ikegami, M., & Jobe, A. H. (2002). Injury responses to different surfactants in ventilated premature lamb lungs. *Pediatric Research*, 51(6), 689-695. <https://doi.org/10.1203/00006450-200206000-00005>
- Imayoshi, I., Sakamoto, M., Yamaguchi, M., Mori, K., & Kageyama, R. (2010). Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains. *Journal of Neuroscience*, 30(9), 3489-3498.
- INC, N. B. (2021). Retrieved 30.08.2021 from https://www.nichirei.co.jp/bio/english/tech_info/adv/hss14.html#03
- Iosef, C., Liu, M., Ying, L., Rao, S. P., Concepcion, K. R., Chan, W. K., Oman, A., & Alvira, C. M. (2018). Distinct roles for I κ B kinases alpha and beta in regulating pulmonary endothelial angiogenic function during late lung development. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 22(9), 4410-4422. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13741>
- Irwin, D., Helm, K., Campbell, N., Imamura, M., Fagan, K., Harral, J., Carr, M., Young, K. A., Klemm, D., Gebb, S. J. A. J. o. P.-L. C., & Physiology, M. (2007). Neonatal lung side population cells demonstrate endothelial potential and are altered in response to hyperoxia-induced lung simplification. 293(4), L941-L951.

- Jackson, R. A., Gibson, K. A., Wu, Y. W., & Croughan, M. S. (2004). Perinatal outcomes in singletons following in vitro fertilization: a meta-analysis. *Obstetrics and Gynecology*, *103*(3), 551-563. <https://doi.org/10.1097/01.Aog.0000114989.84822.51>
- Jacobs, S. E., Berg, M., Hunt, R., Tarnow-Mordi, W. O., Inder, T. E., & Davis, P. G. J. C. d. o. s. r. (2013). Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy. (1).
- Jacobsson, B., Ladfors, L., & Milsom, I. (2004). Advanced maternal age and adverse perinatal outcome. *Obstetrics and Gynecology*, *104*(4), 727-733. <https://doi.org/10.1097/01.AOG.0000140682.63746.be>
- Jaubert, J., Cheng, J., & Segre, J. A. (2003). Ectopic expression of kruppel like factor 4 (Klf4) accelerates formation of the epidermal permeability barrier. *Development*, *130*(12), 2767-2777. <https://doi.org/10.1242/dev.00477>
- Jobe, A. H. (2012). What is BPD in 2012 and what will BPD become? *Early Human Development*, *88 Suppl 2*, S27-28. [https://doi.org/10.1016/s0378-3782\(12\)70009-9](https://doi.org/10.1016/s0378-3782(12)70009-9)
- Jobe, A. H. (2016). Mechanisms of Lung Injury and Bronchopulmonary Dysplasia. *American Journal of Perinatology*, *33*(11), 1076-1078. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1586107>
- Jobe, A. H., & Bancalari, E. (2001). Bronchopulmonary dysplasia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *163*(7), 1723-1729. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.163.7.2011060>
- Jobe, A. H., & Eduardo, B. (2000). *Workshop on Bronchopulmonary Dysplasia* Bethesda, MA.
- Jobe, A. H., & Steinhorn, R. (2017). Can We Define Bronchopulmonary Dysplasia? *Journal of Pediatrics*, *188*, 19-23. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2017.06.064>
- Jobe, A. H. J. C. o. i. p. (2011). The new bronchopulmonary dysplasia. *23*(2), 167.
- Junqueira, L. C. U., Bignolas, G., & Brentani, R. R. J. T. H. j. (1979). Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *11*(4), 447-455.
- Kalikkot Thekkevedu, R., Guaman, M. C., & Shivanna, B. (2017). Bronchopulmonary dysplasia: A review of pathogenesis and pathophysiology. *Respiratory Medicine*, *132*, 170-177. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2017.10.014>
- Katsumiti, A., Ruenraroengsak, P., Cajaraville, M. P., Thorley, A. J., & Tetley, T. D. (2020). Immortalisation of primary human alveolar epithelial lung cells using a non-viral vector to study respiratory bioreactivity in vitro. *Scientific Reports*, *10*(1), 20486. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77191-y>
- Katz, J. P., Perreault, N., Goldstein, B. G., Lee, C. S., Labosky, P. A., Yang, V. W., & Kaestner, K. H. (2002). The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon. *Development*, *129*(11), 2619-2628.
- Kauffman, S. L., Burri, P. H., & Weibel, E. R. (1974). The postnatal growth of the rat lung. II. Autoradiography. *Anatomical Record*, *180*(1), 63-76. <https://doi.org/10.1002/ar.1091800108>
- Kawai-Kowase, K., Ohshima, T., Matsui, H., Tanaka, T., Shimizu, T., Iso, T., Arai, M., Owens, G. K., & Kurabayashi, M. (2009). PIAS1 mediates TGFbeta-induced SM alpha-actin gene expression through inhibition of KLF4 function-expression by protein sumoylation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *29*(1), 99-106. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.108.172700>
- Khan, P., Fytianos, K., Tamo, L., Roth, M., Tamm, M., Geiser, T., Gazdhar, A., & Hostettler, K. E. (2018). Culture of human alveolar epithelial type II cells by sprouting. *Respiratory Research*, *19*(1), 204. <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0906-9>
- Kim, J. H., Kim, K., Youn, B. U., Lee, J., Kim, I., Shin, H. I., Akiyama, H., Choi, Y., & Kim, N. (2014). Kruppel-like factor 4 attenuates osteoblast formation, function, and cross talk with osteoclasts. *Journal of Cell Biology*, *204*(6), 1063-1074. <https://doi.org/10.1083/jcb.201308102>
- King, K. E., Iyemere, V. P., Weissberg, P. L., & Shanahan, C. M. (2003). Kruppel-like factor 4 (KLF4/GKLF) is a target of bone morphogenetic proteins and transforming growth factor beta 1 in the regulation of vascular smooth muscle cell phenotype. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(13), 11661-11669. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211337200>

- Klaewsongkram, J., Yang, Y., Golech, S., Katz, J., Kaestner, K. H., & Weng, N. P. (2007). Kruppel-like factor 4 regulates B cell number and activation-induced B cell proliferation. *Journal of Immunology*, 179(7), 4679-4684. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.7.4679>
- Klier, J., Fuchs, S., Winter, G., & Gehlen, H. (2022). Inhalative Nanoparticulate CpG Immunotherapy in Severe Equine Asthma: An Innovative Therapeutic Concept and Potential Animal Model for Human Asthma Treatment. *Animals (Basel)*, 12(16). <https://doi.org/10.3390/ani12162087>
- Knippers, R. (2006). *Molekulare Genetik* (9th ed.). Thieme.
- Kolesnichenko, O. A., Whitsett, J. A., Kalin, T. V., & Kalinichenko, V. V. (2021). Therapeutic Potential of Endothelial Progenitor Cells in Pulmonary Diseases. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 65(5), 473-488. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2021-0152TR>
- Kos, C. H. (2004). Cre/loxP system for generating tissue-specific knockout mouse models. *Nutrition Reviews*, 62(6 Pt 1), 243-246. <https://doi.org/10.1301/nr2004.jun243-246>
- Krisanaprakornkit, S., & Iamaroon, A. (2012). Epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. *ISRN Oncology*, 2012.
- Kumar, M., Allison, D. F., Baranova, N. N., Wamsley, J. J., Katz, A. J., Bekiranov, S., Jones, D. R., & Mayo, M. W. (2013). NF-kappaB regulates mesenchymal transition for the induction of non-small cell lung cancer initiating cells. *PLoS One*, 8(7), e68597. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068597>
- Kumar, V. H., Lakshminrusimha, S., Kishkurno, S., Paturi, B. S., Gugino, S. F., Nielsen, L., Wang, H., & Ryan, R. M. (2016). Neonatal hyperoxia increases airway reactivity and inflammation in adult mice. *Pediatric Pulmonology*, 51(11), 1131-1141. <https://doi.org/10.1002/ppul.23430>
- Kunig, A. M., Balasubramaniam, V., Markham, N. E., Morgan, D., Montgomery, G., Grover, T. R., & Abman, S. H. (2005). Recombinant human VEGF treatment enhances alveolarization after hyperoxic lung injury in neonatal rats. *American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology*, 289(4), L529-535. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00336.2004>
- Kuruvilla, J. G., Kim, C. K., Ghaleb, A. M., Bialkowska, A. B., Kuo, C. J., & Yang, V. W. (2016). Kruppel-like Factor 4 Modulates Development of BMI1(+) Intestinal Stem Cell-Derived Lineage Following gamma-Radiation-Induced Gut Injury in Mice. *Stem Cell Reports*, 6(6), 815-824. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.04.014>
- Laboratory, T. J. (2021a). Retrieved 15.09.2021 from <https://www.jax.org/strain/000664?featured>
- Laboratory, T. J. (2021b). *Cre Repository*. Retrieved 17.09.2021 from <https://www.jax.org/research-and-faculty/resources/cre-repository>
- Lahra, M. M., Beeby, P. J., & Jeffery, H. E. (2009). Intrauterine inflammation, neonatal sepsis, and chronic lung disease: a 13-year hospital cohort study. *Pediatrics*, 123(5), 1314-1319. <https://doi.org/10.1542/peds.2008-0656>
- Latchman, D. S. (1993). Transcription factors: an overview. *International Journal of Experimental Pathology*, 74(5), 417-422.
- Laughon, M. M., Langer, J. C., Bose, C. L., Smith, P. B., Ambalavanan, N., Kennedy, K. A., Stoll, B. J., Buchter, S., Lupton, A. R., & Ehrenkranz, R. A. (2011). Prediction of bronchopulmonary dysplasia by postnatal age in extremely premature infants. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 183(12), 1715-1722.
- Le Cras, T. D., Markham, N. E., Tudor, R. M., Voelkel, N. F., & Abman, S. H. (2002). Treatment of newborn rats with a VEGF receptor inhibitor causes pulmonary hypertension and abnormal lung structure. *American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology*, 283(3), L555-562. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00408.2001>
- Lee, J. M., Dedhar, S., Kalluri, R., & Thompson, E. W. (2006). The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *The Journal of Cell Biology*, 172(7), 973-981.
- Lehtonen, L., Gimeno, A., Parra-Llorca, A., & Vento, M. (2017). Early neonatal death: A challenge worldwide. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 22(3), 153-160. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2017.02.006>

- Leroy, S., Caumette, E., Waddington, C., Hébert, A., Brant, R., & Lavoie, P. M. (2018). A Time-Based Analysis of Inflammation in Infants at Risk of Bronchopulmonary Dysplasia. *Journal of Pediatrics*, 192, 60-65.e61. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2017.09.011>
- Li, J., Zheng, H., Yu, F., Yu, T., Liu, C., Huang, S., Wang, T. C., & Ai, W. (2012). Deficiency of the Kruppel-like factor KLF4 correlates with increased cell proliferation and enhanced skin tumorigenesis. *Carcinogenesis*, 33(6), 1239-1246. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs143>
- Li, Q., An, J., Liu, X., Zhang, M., Ling, Y., Wang, C., Zhao, J., & Yu, L. (2012). SNIP1: a new activator of HSE signaling pathway. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 362(1-2), 1-6.
- Li, Q., Song, W., Wang, W., Yao, S., Tian, C., Cai, X., & Wang, L. (2016). Suppression of epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells by Kruppel-like factor 4. *Oncotarget*, 7(20), 29749-29760. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8831>
- Liao, X., Sharma, N., Kapadia, F., Zhou, G., Lu, Y., Hong, H., Paruchuri, K., Mahabeleshwar, G. H., Dalmas, E., Venteclef, N., Flask, C. A., Kim, J., Doreian, B. W., Lu, K. Q., Kaestner, K. H., Hamik, A., Clement, K., & Jain, M. K. (2011). Kruppel-like factor 4 regulates macrophage polarization. *Journal of Clinical Investigation*, 121(7), 2736-2749. <https://doi.org/10.1172/jci45444>
- Liebler, J. M., Marconett, C. N., Juul, N., Wang, H., Liu, Y., Flodby, P., Laird-Offringa, I. A., Minoo, P., & Zhou, B. (2016). Combinations of differentiation markers distinguish subpopulations of alveolar epithelial cells in adult lung. *American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology*, 310(2), L114-120. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00337.2015>
- Lignelli, E., Palumbo, F., Myti, D., & Morty, R. E. (2019). Recent advances in our understanding of the mechanisms of lung alveolarization and bronchopulmonary dysplasia. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 317(6), L832-L887.
- Lignelli, E., Palumbo, F., Myti, D., & Morty, R. E. (2019). Recent advances in our understanding of the mechanisms of lung alveolarization and bronchopulmonary dysplasia. *American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology*, 317(6), L832-L887. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00369.2019>
- Littlewood, T. D., Hancock, D. C., Danielian, P. S., Parker, M. G., & Evan, G. I. (1995). A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic Acids Research*, 23(10), 1686-1690. <https://doi.org/10.1093/nar/23.10.1686>
- Liu, H., Lin, H., Zhang, L., Sun, Q., Yuan, G., Zhang, L., Chen, S., & Chen, Z. (2013). miR-145 and miR-143 regulate odontoblast differentiation through targeting Klf4 and Osx genes in a feedback loop. *Journal of Biological Chemistry*, 288(13), 9261-9271. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.433730>
- Liu, L., Oza, S., Hogan, D., Chu, Y., Perin, J., Zhu, J., Lawn, J. E., Cousens, S., Mathers, C., & Black, R. E. (2016). Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000-15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. *Lancet*, 388(10063), 3027-3035. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31593-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31593-8)
- Liu, Y. N., Abou-Kheir, W., Yin, J. J., Fang, L., Hynes, P., Casey, O., Hu, D., Wan, Y., Seng, V., Sheppard-Tillman, H., Martin, P., & Kelly, K. (2012). Critical and reciprocal regulation of KLF4 and SLUG in transforming growth factor beta-initiated prostate cancer epithelial-mesenchymal transition. *Molecular and Cellular Biology*, 32(5), 941-953. <https://doi.org/10.1128/mcb.06306-11>
- Lizen, B., Claus, M., Jeannotte, L., Rijli, F. M., & Gofflot, F. (2015). Perinatal induction of Cre recombination with tamoxifen. *Transgenic Res*, 24(6), 1065-1077. <https://doi.org/10.1007/s11248-015-9905-5>
- Logue, J. S., & Scott, J. D. (2010). Organizing signal transduction through A-kinase anchoring proteins (AKAPs). *The FEBS journal*, 277(21), 4370-4375.
- Lüllmann-Rauch, R. (2006a). *Taschenlehrbuch Histologie* (2nd ed.). Thieme
- Lüllmann-Rauch, R. (2006b). *Taschenlehrbuch Histologie* (2nd ed.). Thieme.
- M. Mulisch, & Welsch, U. (2010). *Romeis-Mikroskopische Technik* (18th ed.). Springer.

- Mamonkin, M., Shen, Y., Lee, P. H., Puppi, M., Park, C. S., & Lacorazza, H. D. (2013). Differential roles of KLF4 in the development and differentiation of CD8+ T cells. *Immunology Letters*, 156(1-2), 94-101. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2013.09.008>
- Mangal, S., Gao, W., Li, T., & Zhou, Q. T. (2017). Pulmonary delivery of nanoparticle chemotherapy for the treatment of lung cancers: challenges and opportunities. *Acta Pharmacologica Sinica*, 38(6), 782-797.
- Manley, B. J., Roberts, C. T., Froisland, D. H., Doyle, L. W., Davis, P. G., & Owen, L. S. (2018). Refining the Use of Nasal High-Flow Therapy as Primary Respiratory Support for Preterm Infants. *Journal of Pediatrics*, 196, 65-70 e61. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2018.01.031>
- Martin, J. A., Hamilton, B. E., Osterman, M. J. K., Driscoll, A. K., & Drake, P. (2018). Births: Final Data for 2017. *National Vital Statistics Reports*, 67(8), 1-50.
- Martinez-Calle, M., Olmeda, B., Dietl, P., Frick, M., & Perez-Gil, J. (2018). Pulmonary surfactant protein SP-B promotes exocytosis of lamellar bodies in alveolar type II cells. *FASEB Journal*, 32(8), 4600-4611. <https://doi.org/10.1096/fj.201701462RR>
- Massaro, D., & Massaro, G. D. (1986). Dexamethasone accelerates postnatal alveolar wall thinning and alters wall composition. *American Journal of Physiology*, 251(2 Pt 2), R218-224. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1986.251.2.R218>
- Massaro, G. D., & Massaro, D. (1996). Postnatal treatment with retinoic acid increases the number of pulmonary alveoli in rats. *American Journal of Physiology*, 270(2 Pt 1), L305-310. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1996.270.2.L305>
- Mayer, C. A., Martin, R. J., & MacFarlane, P. M. (2015). Increased airway reactivity in a neonatal mouse model of continuous positive airway pressure. *Pediatr Res*, 78(2), 145-151. <https://doi.org/10.1038/pr.2015.90>
- McConnell, B. B., Ghaleb, A. M., Nandan, M. O., & Yang, V. W. (2007). The diverse functions of Krüppel-like factors 4 and 5 in epithelial biology and pathobiology. *Bioessays*, 29(6), 549-557.
- McConnell, B. B., & Yang, V. W. (2010). Mammalian Kruppel-like factors in health and diseases. *Physiological Reviews*, 90(4), 1337-1381. <https://doi.org/10.1152/physrev.00058.2009>
- McGrath-Morrow, S. A., Cho, C., Cho, C., Zhen, L., Hicklin, D. J., & Tuder, R. M. (2005). Vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade disrupts postnatal lung development. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 32(5), 420-427. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2004-0287OC>
- McKenna, S., Butler, B., Jatana, L., Ghosh, S., & Wright, C. J. (2017). Inhibition of IκBβ/NFκB signaling prevents LPS-induced IL1β expression without increasing apoptosis in the developing mouse lung. *Pediatric Research*, 82(6), 1064-1072. <https://doi.org/10.1038/pr.2017.182>
- McKenzie, R., Burton, M. D., Royce, S. G., & Tang, M. L. (2010). Age and sex influences on airway hyperresponsiveness. *Journal of Asthma*, 47(6), 651-654. <https://doi.org/10.3109/02770901003692801>
- McLellan, M. A., Rosenthal, N. A., & Pinto, A. R. (2017). Cre-loxP-Mediated Recombination: General Principles and Experimental Considerations. *Current Protocols in Mouse Biology*, 7(1), 1-12. <https://doi.org/10.1002/cpmo.22>
- Merkus, P. J., ten Have-Opbroek, A. A., & Quanjer, P. H. (1996). Human lung growth: a review. *Pediatric Pulmonology*, 21(6), 383-397. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0496\(199606\)21:6<383::AID-PPUL6>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0496(199606)21:6<383::AID-PPUL6>3.0.CO;2-M)
- Metzger, D., Clifford, J., Chiba, H., & Chambon, P. (1995). Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(15), 6991-6995. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.15.6991>
- Miller, I., & Bieker, J. J. (1993). A novel, erythroid cell-specific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Krüppel family of nuclear proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 13(5), 2776-2786.
- Mokres, L. M., Parai, K., Hilgendorff, A., Ertsey, R., Alvira, C. M., Rabinovitch, M., & Bland, R. D. (2010). Prolonged mechanical ventilation with air induces apoptosis and causes failure of alveolar septation and angiogenesis in lungs of newborn mice. *American Journal of*

- Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology*, 298(1), L23-35.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00251.2009>
- Monvoisin, A., Alva, J. A., Hofmann, J. J., Zovein, A. C., Lane, T. F., & Iruela-Arispe, M. L. (2006). VE-cadherin-CreERT2 transgenic mouse: a model for inducible recombination in the endothelium. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 235(12), 3413-3422.
- Moser, K. J. H. S. Q. (2009). Gestation-specific infant mortality by social and biological factors among babies born in England and Wales in 2006. *42*, 78-87.
- Mreich, E., Chen, X. M., Zaky, A., Pollock, C. A., & Saad, S. (2015). The role of Kruppel-like factor 4 in transforming growth factor-beta-induced inflammatory and fibrotic responses in human proximal tubule cells. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 42(6), 680-686. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12405>
- Mulisch, M., & Welsch, U. (2010). *Romeis-Mikroskopische Technik* (18th ed.). Springer.
- Mullassery, D., & Smith, N. P. (2015). Lung development. *Seminars in Pediatric Surgery*, 24(4), 152-155. <https://doi.org/10.1053/j.sempedsurg.2015.01.011>
- Mulugeta, S., & Beers, M. F. (2006). Surfactant protein C: its unique properties and emerging immunomodulatory role in the lung. *Microbes Infect*, 8(8), 2317-2323.
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.04.009>
- Mun, G. I., & Boo, Y. C. (2012). A regulatory role of Kruppel-like factor 4 in endothelial argininosuccinate synthetase 1 expression in response to laminar shear stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 420(2), 450-455.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.03.016>
- Muratore, C. S., Nguyen, H. T., Ziegler, M. M., & Wilson, J. M. J. J. o. p. s. (2000). Stretch-induced upregulation of VEGF gene expression in murine pulmonary culture: a role for angiogenesis in lung development. *35*(6), 906-913.
- Mwaniki, M. K., Atieno, M., Lawn, J. E., & Newton, C. R. J. T. L. (2012). Long-term neurodevelopmental outcomes after intrauterine and neonatal insults: a systematic review. *379*(9814), 445-452.
- Mwatha, A. B., Mahande, M., Olomi, R., John, B., & Philemon, R. (2020). Treatment outcomes of Pumani bubble-CPAP versus oxygen therapy among preterm babies presenting with respiratory distress at a tertiary hospital in Tanzania-Randomised trial. *PLoS One*, 15(6), e0235031. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235031>
- Nayerossadat, N., Maedeh, T., & Ali, P. A. (2012). Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Adv Biomed Res*, 1, 27. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.98152>
- Neriishi, K., & Frank, L. (1984). Castration prolongs tolerance of young male rats to pulmonary O₂ toxicity. *American Journal of Physiology*, 247(3 Pt 2), R475-481.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.1984.247.3.R475>
- Nielsen, H. C., Kirk, W. O., Sweezey, N., & Torday, J. S. (1990). Coordination of growth and differentiation in the fetal lung. *Experimental Cell Research*, 188(1), 89-96.
[https://doi.org/10.1016/0014-4827\(90\)90281-e](https://doi.org/10.1016/0014-4827(90)90281-e)
- Nieto, M. A. (2002). The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nature reviews Molecular cell biology*, 3(3), 155-166.
- Nimpong, J. A., Gebregziabher, W., Singh, U. P., Nagarkatti, P., Nagarkatti, M., Hodge, J., Liu, C., Fan, D., & Ai, W. (2017). Deficiency of KLF4 compromises the lung function in an acute mouse model of allergic asthma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 493(1), 598-603. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.08.146>
- Northway Jr, W., Rosan, R., & Porter, D. J. H. P. (1976). Pulmonary disease following respiratory therapy of hyaline-membrane disease: Bronchopulmonary dysplasia *N Engl J Med* 1967; 276(7): 357-368. 7, 643-666.
- Northway, W. H., Jr., Rosan, R. C., & Porter, D. Y. (1967). Pulmonary disease following respirator therapy of hyaline-membrane disease. Bronchopulmonary dysplasia. *New England Journal of Medicine*, 276(7), 357-368. <https://doi.org/10.1056/nejm196702162760701>
- O., G.-B., & C., N. (2021). *Checkliste Neonatologie* (7th ed.). Thieme.

- O. Solarin, W.-J. W., Michael F. Beers, Kolawole. (2001). Synthesis and post-translational processing of surfactant protein C. *Pediatric Pathology & Molecular Medicine*, 20(6), 471-500.
- Oak, P., Pritzke, T., Thiel, I., Koschlig, M., Mous, D. S., Windhorst, A., Jain, N., Eickelberg, O., Foerster, K., Schulze, A., Goepel, W., Reicherzer, T., Ehrhardt, H., Rottier, R. J., Ahnert, P., Gortner, L., Desai, T. J., & Hilgendorff, A. (2017). Attenuated PDGF signaling drives alveolar and microvascular defects in neonatal chronic lung disease. *EMBO Molecular Medicine*, 9(11), 1504-1520. <https://doi.org/10.15252/emmm.201607308>
- Onugha, H., MacFarlane, P. M., Mayer, C. A., Abrah, A., Jafri, A., & Martin, R. J. (2015). Airway hyperreactivity is delayed after mild neonatal hyperoxic exposure. *Neonatology*, 108(1), 65-72.
- Organization, W. H. (2012). Born too soon: the global action report on preterm birth.
- Ou, L., Shi, Y., Dong, W., Liu, C., Schmidt, T. J., Nagarkatti, P., Nagarkatti, M., Fan, D., & Ai, W. (2015). Kruppel-like factor KLF4 facilitates cutaneous wound healing by promoting fibrocyte generation from myeloid-derived suppressor cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 135(5), 1425-1434. <https://doi.org/10.1038/jid.2015.3>
- Ouyang, H., Gore, J., Deitz, S., & Korc, M. (2014). microRNA-10b enhances pancreatic cancer cell invasion by suppressing TIP30 expression and promoting EGF and TGF-beta actions. *Oncogene*, 33(38), 4664-4674. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.405>
- Park, E. J., Sun, X., Nichol, P., Saijoh, Y., Martin, J. F., & Moon, A. M. (2008). System for tamoxifen-inducible expression of cre-recombinase from the Foxa2 locus in mice. *Developmental Dynamics*, 237(2), 447-453. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21415>
- Patel, N. V., Ghaleb, A. M., Nandan, M. O., & Yang, V. W. (2010). Expression of the tumor suppressor Kruppel-like factor 4 as a prognostic predictor for colon cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 19(10), 2631-2638. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.Epi-10-0677>
- Philipsen, S., & Suske, G. (1999). A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. *Nucleic Acids Research*, 27(15), 2991-3000.
- Pinho, A. V., Rooman, I., & Real, F. X. (2011). p53-dependent regulation of growth, epithelial-mesenchymal transition and stemness in normal pancreatic epithelial cells. *Cell Cycle*, 10(8), 1312-1321. <https://doi.org/10.4161/cc.10.8.15363>
- Pinto, V. L., & Sharma, S. (2022). Continuous Positive Airway Pressure. In *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29489216>
- Platt, M. J. (2014). Outcomes in preterm infants. *Public Health*, 128(5), 399-403. <https://doi.org/10.1016/j.puhe.2014.03.010>
- Polack, F. P., Thomas, S. J., Kitchin, N., Absalon, J., Gurtman, A., Lockhart, S., Perez, J. L., Perez Marc, G., Moreira, E. D., Zerbini, C., Bailey, R., Swanson, K. A., Roychoudhury, S., Koury, K., Li, P., Kalina, W. V., Cooper, D., Frenck, R. W., Jr., Hammitt, L. L., . . . Group, C. C. T. (2020). Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *New England Journal of Medicine*, 383(27), 2603-2615. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2034577>
- Pradhan, D., Nishizawa, Y., & Chhetri, H. P. (2019). Prevalence and Outcome of Preterm Births in the National Referral Hospital in Bhutan: An Observational Study. *Journal of Tropical Pediatrics*. <https://doi.org/10.1093/tropej/fmz046>
- Preterm birth. (2018). WHO. Retrieved 17.08.2019 from <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/preterm-birth>
- Purisch, S. E., & Gyamfi-Bannerman, C. (2017). Epidemiology of preterm birth. *Seminars in Perinatology*, 41(7), 387-391. <https://doi.org/10.1053/j.semperi.2017.07.009>
- Quinn, T. P., Schlueter, M., Soifer, S. J., Gutierrez, J. A. J. A. J. o. P.-L. C., & Physiology, M. (2002). Cyclic mechanical stretch induces VEGF and FGF-2 expression in pulmonary vascular smooth muscle cells. 282(5), L897-L903.
- Raguram, A., Banskota, S., & Liu, D. R. (2022). Therapeutic in vivo delivery of gene editing agents. *Cell*, 185(15), 2806-2827. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.03.045>

- Ranieri, V. M., Rubenfeld, G. D., Thompson, B. T., Ferguson, N. D., Caldwell, E., Fan, E., Camporota, L., & Slutsky, A. S. (2012). Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA*, *307*(23), 2526-2533. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.5669>
- Ratner, V., Starkov, A., Matsiukevich, D., Polin, R. A., Ten, V. S. J. A. j. o. r. c., & biology, m. (2009). Mitochondrial dysfunction contributes to alveolar developmental arrest in hyperoxia-exposed mice. *40*(5), 511-518.
- Regal, J. F., Lawrence, B. P., Johnson, A. C., Lojovich, S. J., & O'Reilly, M. A. (2014). Neonatal oxygen exposure alters airway hyper-responsiveness but not the response to allergen challenge in adult mice. *Pediatric Allergy and Immunology*, *25*(2), 180-186. <https://doi.org/10.1111/pai.12206>
- Ren, D., Wang, M., Guo, W., Zhao, X., Tu, X., Huang, S., Zou, X., & Peng, X. (2013). Wild-type p53 suppresses the epithelial-mesenchymal transition and stemness in PC-3 prostate cancer cells by modulating miR145. *International Journal of Oncology*, *42*(4), 1473-1481. <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.1825>
- Reyburn, B., Di Fiore, J. M., Raffay, T., Martin, R. J., Prakash, Y. S., Jafri, A., & MacFarlane, P. M. (2016). The Effect of Continuous Positive Airway Pressure in a Mouse Model of Hyperoxic Neonatal Lung Injury. *Neonatology*, *109*(1), 6-13. <https://doi.org/10.1159/000438818>
- Roberts, C. T., Owen, L. S., Manley, B. J., Donath, S. M., & Davis, P. G. (2015). A multicentre, randomised controlled, non-inferiority trial, comparing high flow therapy with nasal continuous positive airway pressure as primary support for preterm infants with respiratory distress (the HIPSTER trial): study protocol. *BMJ Open*, *5*(6), e008483. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2015-008483>
- Rogers, L. K., Tipple, T. E., Nelin, L. D., & Welty, S. E. (2009). Differential responses in the lungs of newborn mouse pups exposed to 85% or >95% oxygen. *Pediatric Research*, *65*(1), 33-38. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e31818a1d0a>
- Rovina, K., Siddiquee, S., & Shaarani, S. M. (2017). A Review of Extraction and Analytical Methods for the Determination of Tartrazine (E 102) in Foodstuffs. *Crit Rev Anal Chem*, *47*(4), 309-324. <https://doi.org/10.1080/10408347.2017.1287558>
- Rowland, B. D., Bernards, R., & Peeper, D. S. (2005). The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene. *Nature Cell Biology*, *7*(11), 1074-1082. <https://doi.org/10.1038/ncb1314>
- Royer, D. J., & Cook, D. N. (2021). Regulation of Immune Responses by Nonhematopoietic Cells in Asthma. *J Immunol*, *206*(2), 292-301. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000885>
- Ruiz-Camp, J., Rodriguez-Castillo, J. A., Herold, S., Mayer, K., Vadasz, I., Tallquist, M. D., Seeger, W., Ahlbrecht, K., & Morty, R. E. (2017). Tamoxifen dosing for Cre-mediated recombination in experimental bronchopulmonary dysplasia. *Transgenic Research*, *26*(1), 165-170. <https://doi.org/10.1007/s11248-016-9987-8>
- Saigal, S., & Doyle, L. W. (2008). An overview of mortality and sequelae of preterm birth from infancy to adulthood. *Lancet*, *371*(9608), 261-269. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60136-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60136-1)
- Saigal, S., & Doyle, L. W. J. T. L. (2008). An overview of mortality and sequelae of preterm birth from infancy to adulthood. *371*(9608), 261-269.
- Sanchez-Esteban, J., Cicchiello, L. A., Wang, Y., Tsai, S.-W., Williams, L. K., Torday, J. S., & Rubin, L. P. J. J. o. A. P. (2001). Mechanical stretch promotes alveolar epithelial type II cell differentiation. *91*(2), 589-595.
- Santagati, F., Minoux, M., Ren, S. Y., & Rijli, F. M. (2005). Temporal requirement of Hoxa2 in cranial neural crest skeletal morphogenesis. *Development*, *132*(22), 4927-4936. <https://doi.org/10.1242/dev.02078>
- Schittny, J. C. (2017). Development of the lung. *Cell and Tissue Research*, *367*(3), 427-444. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2545-0>
- Schmölzer, G. M., Kumar, M., Pichler, G., Aziz, K., O'Reilly, M., & Cheung, P. Y. (2013). Non-invasive versus invasive respiratory support in preterm infants at birth: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, *347*, f5980. <https://doi.org/10.1136/bmj.f5980>

- Schneider, J. P., Arkenau, M., Knudsen, L., Wedekind, D., & Ochs, M. (2017). Lung remodeling in aging surfactant protein D deficient mice. *Ann Anat*, 211, 158-175. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2017.01.013>
- Schultz, E. D., Potts, E. N., Mason, S. N., Foster, W. M., & Auten, R. L. J. P. r. (2010). Mast cells mediate hyperoxia-induced airway hyper-reactivity in newborn rats. *68*(1), 70.
- Schupp, J. C., Adams, T. S., Cosme, C., Jr., Raredon, M. S. B., Yuan, Y., Omote, N., Poli, S., Chioccioli, M., Rose, K. A., Manning, E. P., Sauler, M., Deluliis, G., Ahangari, F., Neumark, N., Habermann, A. C., Gutierrez, A. J., Bui, L. T., Lafyatis, R., Pierce, R. W., . . . Kaminski, N. (2021). Integrated Single-Cell Atlas of Endothelial Cells of the Human Lung. *Circulation*, 144(4), 286-302. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.052318>
- Segnani, C., Ippolito, C., Antonioli, L., Pellegrini, C., Blandizzi, C., Dolfi, A., & Bernardini, N. (2015). Histochemical Detection of Collagen Fibers by Sirius Red/Fast Green Is More Sensitive than van Gieson or Sirius Red Alone in Normal and Inflamed Rat Colon. *PLoS One*, 10(12), e0144630. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144630>
- Segre, J. A., Bauer, C., & Fuchs, E. (1999). Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin. *Nature Genetics*, 22(4), 356-360. <https://doi.org/10.1038/11926>
- Sharma, N., Lu, Y., Zhou, G., Liao, X., Kapil, P., Anand, P., Mahabeleshwar, G. H., Stamler, J. S., & Jain, M. K. (2012). Myeloid Kruppel-like factor 4 deficiency augments atherogenesis in ApoE^{-/-} mice--brief report. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(12), 2836-2838. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.112.300471>
- Shatat, M. A., Tian, H., Zhang, R., Tandon, G., Hale, A., Fritz, J. S., Zhou, G., Martinez-Gonzalez, J., Rodriguez, C., Champion, H. C., Jain, M. K., & Hamik, A. (2014). Endothelial Kruppel-like factor 4 modulates pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 50(3), 647-653. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0135OC>
- Shennan, A. T., Dunn, M. S., Ohlsson, A., Lennox, K., & Hoskins, E. M. J. P. (1988). Abnormal pulmonary outcomes in premature infants: prediction from oxygen requirement in the neonatal period. *82*(4), 527-532.
- Shields, J. M., Christy, R. J., & Yang, V. W. (1996). Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Kruppel-like factor expressed during growth arrest. *Journal of Biological Chemistry*, 271(33), 20009-20017. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.33.20009>
- Shields, J. M., & Yang, V. W. (1997). Two potent nuclear localization signals in the gut-enriched Kruppel-like factor define a subfamily of closely related Kruppel proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 272(29), 18504-18507.
- Shrestha, A. K., Bettini, M. L., Menon, R. T., Gopal, V. Y. N., Huang, S., Edwards, D. P., Pammi, M., Barrios, R., & Shivanna, B. (2019). Consequences of early postnatal lipopolysaccharide exposure on developing lungs in mice. *American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology*, 316(1), L229-L244. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00560.2017>
- Slovin, S., Carissimo, A., Panariello, F., Grimaldi, A., Bouche, V., Gambardella, G., & Cacchiarelli, D. (2021). Single-Cell RNA Sequencing Analysis: A Step-by-Step Overview. *Methods in Molecular Biology*, 2284, 343-365. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1307-8_19
- Smith, J. L. (1899). The pathological effects due to increase of oxygen tension in the air breathed. *Journal of Physiology*, 24(1), 19-35. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1899.sp000746>
- Smith, L. J., McKay, K. O., van Asperen, P. P., Selvadurai, H., & Fitzgerald, D. A. (2010). Normal development of the lung and premature birth. *Paediatric Respiratory Reviews*, 11(3), 135-142. <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2009.12.006>
- Song, Y., Li, X., Liu, F., Zhu, H., & Shen, Y. (2021). Isoalantolactone alleviates ovalbumin-induced asthmatic inflammation by reducing alternatively activated macrophage and STAT6/PPAR-gamma/KLF4 signals. *Mol Med Rep*, 24(4). <https://doi.org/10.3892/mmr.2021.12340>
- Song, Y., Wu, Y., Li, X., Shen, Y., Ding, Y., Zhu, H., Liu, F., Yu, K., Sun, L., & Qian, F. (2018). Protostemonine attenuates alternatively activated macrophage and DRA-induced asthmatic inflammation. *Biochemical Pharmacology*, 155, 198-206. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.07.003>

- Speyer, C. L., Rancilio, N. J., McClintock, S. D., Crawford, J. D., Gao, H., Sarma, J. V., & Ward, P. A. (2005). Regulatory effects of estrogen on acute lung inflammation in mice. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, 288(4), C881-890. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00467.2004>
- Stavri, S., Simionescu, M., Kardassis, D., & Gafencu, A. V. (2015). Kruppel-like factor 4 synergizes with CREB to increase the activity of apolipoprotein E gene promoter in macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 468(1-2), 66-72. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.10.163>
- Sternberg, N., & Hamilton, D. (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination: I. Recombination between loxP sites. *Journal of Molecular Biology*, 150(4), 467-486.
- Sternberg, N., & Hamilton, D. (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *Journal of Molecular Biology*, 150(4), 467-486. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(81\)90375-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90375-2)
- Stoll, B. J., Hansen, N. I., Bell, E. F., Walsh, M. C., Carlo, W. A., Shankaran, S., Laptook, A. R., Sánchez, P. J., Van Meurs, K. P., & Wyckoff, M. J. J. (2015). Trends in care practices, morbidity, and mortality of extremely preterm neonates, 1993-2012. *314*(10), 1039-1051.
- Subramaniam, P., Ho, J. J., & Davis, P. G. (2021). Prophylactic or very early initiation of continuous positive airway pressure (CPAP) for preterm infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews*(10).
- Sureban, S. M., May, R., Qu, D., Weygant, N., Chandrakesan, P., Ali, N., Lightfoot, S. A., Pantazis, P., Rao, C. V., Postier, R. G., & Houchen, C. W. (2013). DCLK1 regulates pluripotency and angiogenic factors via microRNA-dependent mechanisms in pancreatic cancer. *PloS One*, 8(9), e73940. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073940>
- Swamynathan, S. K., Katz, J. P., Kaestner, K. H., Ashery-Padan, R., Crawford, M. A., & Piatigorsky, J. (2007). Conditional deletion of the mouse Klf4 gene results in corneal epithelial fragility, stromal edema, and loss of conjunctival goblet cells. *Molecular and Cellular Biology*, 27(1), 182-194. <https://doi.org/10.1128/mcb.00846-06>
- Sweet, D. G., Carnielli, V., Greisen, G., Hallman, M., Ozek, E., Te Pas, A., Plavka, R., Roehr, C. C., Saugstad, O. D., Simeoni, U., Speer, C. P., Vento, M., Visser, G. H. A., & Halliday, H. L. (2019). European Consensus Guidelines on the Management of Respiratory Distress Syndrome - 2019 Update. *Neonatology*, 115(4), 432-450. <https://doi.org/10.1159/000499361>
- Tai, S. K., Yang, M. H., Chang, S. Y., Chang, Y. C., Li, W. Y., Tsai, T. L., Wang, Y. F., Chu, P. Y., & Hsieh, S. L. (2011). Persistent Kruppel-like factor 4 expression predicts progression and poor prognosis of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Science*, 102(4), 895-902. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.01859.x>
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5), 861-872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663-676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Talmasov, D., Xinjun, Z., Yu, B., Nandan, M. O., Bialkowska, A. B., Elkarim, E., Kuruvilla, J., Yang, V. W., & Ghaleb, A. M. (2015). Kruppel-like factor 4 is a radioprotective factor for the intestine following gamma-radiation-induced gut injury in mice. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 308(2), G121-138. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00080.2014>
- Tarnowski, B. I., Spinale, F. G., & Nicholson, J. H. (1991). DAPI as a useful stain for nuclear quantitation. *Biotechnic and Histochemistry*, 66(6), 297-302.
- Tetreault, M. P., Wang, M. L., Yang, Y., Travis, J., Yu, Q. C., Klein-Szanto, A. J., & Katz, J. P. (2010). Klf4 overexpression activates epithelial cytokines and inflammation-mediated esophageal squamous cell cancer in mice. *Gastroenterology*, 139(6), 2124-2134.e2129. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.08.048>

- Thebaud, B. (2017). Impaired Lung Development and Neonatal Lung Diseases: A Never-Ending (Vascular) Story. *Journal of Pediatrics*, 180, 11-13. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2016.10.030>
- Thebaud, B., Ladha, F., Michelakis, E. D., Sawicka, M., Thurston, G., Eaton, F., Hashimoto, K., Harry, G., Haromy, A., Korbitt, G., & Archer, S. L. (2005). Vascular endothelial growth factor gene therapy increases survival, promotes lung angiogenesis, and prevents alveolar damage in hyperoxia-induced lung injury: evidence that angiogenesis participates in alveolarization. *Circulation*, 112(16), 2477-2486. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.105.541524>
- Thompson, B. T., Chambers, R. C., & Liu, K. D. (2017). Acute Respiratory Distress Syndrome. *New England Journal of Medicine*, 377(19), 1904-1905. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1711824>
- Tibboel, J., Joza, S., Reiss, I., de Jongste, J. C., & Post, M. (2013). Amelioration of hyperoxia-induced lung injury using a sphingolipid-based intervention. *European Respiratory Journal*, 42(3), 776-784. <https://doi.org/10.1183/09031936.00092212>
- Tielsch, J. M. (2015). Global Incidence of Preterm Birth. *Nestle Nutrition Institute Workshop Series*, 81, 9-15. <https://doi.org/10.1159/000365798>
- Torloni, M. R., Betran, A. P., Daher, S., Widmer, M., Dolan, S. M., Menon, R., Bergel, E., Allen, T., Meriardi, M. J. T. J. o. M.-F., & Medicine, N. (2009). Maternal BMI and preterm birth: a systematic review of the literature with meta-analysis. 22(11), 957-970.
- Tracy, M. K., & Berkelhamer, S. K. (2019). Bronchopulmonary Dysplasia and Pulmonary Outcomes of Prematurity. *Pediatric Annals*, 48(4), e148-e153. <https://doi.org/10.3928/19382359-20190325-03>
- Turner, J., & Crossley, M. (1999). Mammalian Krüppel-like transcription factors: more than just a pretty finger. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(6), 236-240.
- Vaghari-Tabari, M., Hassanpour, P., Sadeghsoltani, F., Malakoti, F., Alemi, F., Qujeq, D., Asemi, Z., & Yousefi, B. (2022). CRISPR/Cas9 gene editing: a new approach for overcoming drug resistance in cancer. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 27(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s11658-022-00348-2>
- Verrou, C., Zhang, Y., Zurn, C., Schamel, W. W., & Reth, M. (1999). Comparison of the tamoxifen regulated chimeric Cre recombinases MerCreMer and CreMer. *Biological Chemistry*, 380(12), 1435-1438. <https://doi.org/10.1515/BC.1999.184>
- Vonk Noordegraaf, A., Chin, K. M., Haddad, F., Hassoun, P. M., Hemnes, A. R., Hopkins, S. R., Kawut, S. M., Langleben, D., Lumens, J., & Naeije, R. (2019). Pathophysiology of the right ventricle and of the pulmonary circulation in pulmonary hypertension: an update. *European Respiratory Journal*, 53(1). <https://doi.org/10.1183/13993003.01900-2018>
- Voynow, J. A. (2017). "New" bronchopulmonary dysplasia and chronic lung disease. *Paediatric Respiratory Reviews*, 24, 17-18. <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2017.06.006>
- Vrijlandt, E. J., Gerritsen, J., Boezen, H. M., Duiverman, E. J., & Dutch, P.-C. S. G. (2005). Gender differences in respiratory symptoms in 19-year-old adults born preterm. *Respiratory Research*, 6(1), 117. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-6-117>
- Wallace, B., Peisl, A., Seedorf, G., Nowlin, T., Kim, C., Bosco, J., Kenniston, J., Keefe, D., & Abman, S. H. (2018). Anti-sFlt-1 Therapy Preserves Lung Alveolar and Vascular Growth in Antenatal Models of Bronchopulmonary Dysplasia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 197(6), 776-787. <https://doi.org/10.1164/rccm.201707-1371OC>
- Walsh, M. C., Yao, Q., Gettner, P., Hale, E., Collins, M., Hensman, A., Everette, R., Peters, N., Miller, N., Muran, G., Auten, K., Newman, N., Rowan, G., Grisby, C., Arnell, K., Miller, L., Ball, B., McDavid, G., National Institute of Child, H., & Human Development Neonatal Research, N. (2004). Impact of a physiologic definition on bronchopulmonary dysplasia rates. *Pediatrics*, 114(5), 1305-1311. <https://doi.org/10.1542/peds.2004-0204>
- Wang, C., Han, M., Zhao, X. M., & Wen, J. K. (2008). Kruppel-like factor 4 is required for the expression of vascular smooth muscle cell differentiation marker genes induced by all-trans retinoic acid. *Journal of Biochemistry*, 144(3), 313-321. <https://doi.org/10.1093/jb/mvn068>
- Wang, H., Jafri, A., Martin, R. J., Nnanabu, J., Farver, C., Prakash, Y. S., & MacFarlane, P. M. (2014). Severity of neonatal hyperoxia determines structural and functional changes in developing

- mouse airway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 307(4), L295-301.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00208.2013>
- Wang, Y., Tang, Z., Huang, H., Li, J., Wang, Z., Yu, Y., Zhang, C., Li, J., Dai, H., Wang, F., Cai, T., & Tang, N. (2018). Pulmonary alveolar type I cell population consists of two distinct subtypes that differ in cell fate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(10), 2407-2412. <https://doi.org/10.1073/pnas.1719474115>
- Wang, Y., Yang, C., Gu, Q., Sims, M., Gu, W., Pfeffer, L. M., & Yue, J. (2015). KLF4 Promotes Angiogenesis by Activating VEGF Signaling in Human Retinal Microvascular Endothelial Cells. *PLoS One*, 10(6), e0130341. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130341>
- Wani, M. A., Means, R. T., Jr., & Lingrel, J. B. (1998). Loss of LKLF function results in embryonic lethality in mice. *Transgenic Research*, 7(4), 229-238.
<https://doi.org/10.1023/a:1008809809843>
- Wani, M. A., Wert, S. E., & Lingrel, J. B. (1999). Lung Kruppel-like factor, a zinc finger transcription factor, is essential for normal lung development. *Journal of Biological Chemistry*, 274(30), 21180-21185. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.30.21180>
- Warburton, D., El-Hashash, A., Carraro, G., Tiozzo, C., Sala, F., Rogers, O., De Langhe, S., Kemp, P. J., Riccardi, D., & Torday, J. (2010). Lung organogenesis. *Current Topics in Developmental Biology*, 90, 73-158.
- Warner, B. B., Stuart, L. A., Papes, R. A., & Wispe, J. R. (1998). Functional and pathological effects of prolonged hyperoxia in neonatal mice. *American Journal of Physiology*, 275(1), L110-117.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.1998.275.1.L110>
- Warner, B. B., Stuart, L. A., Papes, R. A., Wispé, J. R. J. A. J. o. P.-L. C., & Physiology, M. (1998). Functional and pathological effects of prolonged hyperoxia in neonatal mice. 275(1), L110-L117.
- Watchko, J. F., & Claassen, D. J. P. (1994). Kernicterus in premature infants: current prevalence and relationship to NICHD Phototherapy Study exchange criteria. 93(6), 996-999.
- Weaver, T. E., Na, C.-L., & Stahlman, M. (2002). Biogenesis of lamellar bodies, lysosome-related organelles involved in storage and secretion of pulmonary surfactant. *Seminars in Cell and Developmental Biology*,
- Wei, D., Gong, W., Kanai, M., Schlunk, C., Wang, L., Yao, J. C., Wu, T. T., Huang, S., & Xie, K. (2005). Drastic down-regulation of Kruppel-like factor 4 expression is critical in human gastric cancer development and progression. *Cancer Research*, 65(7), 2746-2754.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-04-3619>
- Wert, S. E., Glasser, S. W., Korfhagen, T. R., & Whitsett, J. A. (1993). Transcriptional elements from the human SP-C gene direct expression in the primordial respiratory epithelium of transgenic mice. *Developmental Biology*, 156(2), 426-443. <https://doi.org/10.1006/dbio.1993.1090>
- Wheelock, M. J., Shintani, Y., Maeda, M., Fukumoto, Y., & Johnson, K. R. (2008). Cadherin switching. *Journal of Cell Science*, 121(Pt 6), 727-735. <https://doi.org/10.1242/jcs.000455>
- White, J., McAlpine, P., Antonarakis, S., Cann, H., Eppig, J., Frazer, K., Frezal, J., Lancet, D., Nahmias, J., & Pearson, P. (1997). Guidelines for human gene nomenclature (1997). HUGO Nomenclature Committee. *Genomics*, 45(2), 468.
- Wilson, C., Mertens, T. C., Shivshankar, P., Bi, W., Collum, S. D., Wareing, N., Ko, J., Weng, T., Naikawadi, R. P., Wolters, P. J., Maire, P., Jyothula, S. S., Thandavarayan, R. A., Ren, D., Elrod, N. D., Wagner, E. J., Huang, H. J., Dickey, B. F., Ford, H. L., & Karmouty-Quintana, H. (2022). Sine oculis homeobox homolog 1 plays a critical role in pulmonary fibrosis. *JCI Insight*, 7(10).
<https://doi.org/10.1172/jci.insight.142984>
- Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Moss, A. A., & Rasmussen, R. P. (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*, 22(1), 130-131, 134-138.
<https://doi.org/10.2144/97221bi01>
- Woods, J., & Schittny, J. (2016). Fetal lung development—clinical correlates & future technologies.
- Wu, P., Chen, H., Jin, R., Weng, T., Ho, J. K., You, C., Zhang, L., Wang, X., & Han, C. (2018). Non-viral gene delivery systems for tissue repair and regeneration. *Journal of Translational Medicine*, 16(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1402-1>

- Xia, W., Xie, L., Cao, B., Cheng, S., Wan, H., & Liu, H. (2017). Genes involved in leukotriene synthesis pathway are dynamically regulated during lung development in Rhesus monkeys. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, 122, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2017.06.008>
- Yamane, M., Ohtsuka, S., Matsuura, K., Nakamura, A., & Niwa, H. (2018). Overlapping functions of Kruppel-like factor family members: targeting multiple transcription factors to maintain the naive pluripotency of mouse embryonic stem cells. *Development*, 145(10). <https://doi.org/10.1242/dev.162404>
- Yang, T., Chen, C., Zhang, B., Huang, H., Wu, G., Wen, J., & Liu, J. (2010). Induction of Kruppel-like factor 4 by high-density lipoproteins promotes the expression of scavenger receptor class B type I. *Febs j*, 277(18), 3780-3788. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07779.x>
- Yang, Y., Goldstein, B. G., Chao, H. H., & Katz, J. P. (2005). KLF4 and KLF5 regulate proliferation, apoptosis and invasion in esophageal cancer cells. *Cancer Biology & Therapy*, 4(11), 1216-1221. <https://doi.org/10.4161/cbt.4.11.2090>
- Yee, M., Vitiello, P. F., Roper, J. M., Staversky, R. J., Wright, T. W., McGrath-Morrow, S. A., Maniscalco, W. M., Finkelstein, J. N., & O'Reilly, M. A. (2006). Type II epithelial cells are critical target for hyperoxia-mediated impairment of postnatal lung development. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 291(5), L1101-L1111.
- Yi, M., Masood, A., Ziino, A., Johnson, B. H., Belcastro, R., Li, J., Shek, S., Kantores, C., Jankov, R. P., & Tanswell, A. K. (2011). Inhibition of apoptosis by 60% oxygen: a novel pathway contributing to lung injury in neonatal rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 300(3), L319-329. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00126.2010>
- Yoon, H. S., Chen, X., & Yang, V. W. (2003). Kruppel-like factor 4 mediates p53-dependent G1/S cell cycle arrest in response to DNA damage. *Journal of Biological Chemistry*, 278(4), 2101-2105. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211027200>
- Yoon, H. S., Ghaleb, A. M., Nandan, M. O., Hisamuddin, I. M., Dalton, W. B., & Yang, V. W. (2005). Kruppel-like factor 4 prevents centrosome amplification following gamma-irradiation-induced DNA damage. *Oncogene*, 24(25), 4017-4025. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208576>
- Yoon, H. S., & Yang, V. W. (2004). Requirement of Kruppel-like factor 4 in preventing entry into mitosis following DNA damage. *Journal of Biological Chemistry*, 279(6), 5035-5041. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307631200>
- Zeitlin, J., & al., e. (2018). *Euro-Peristat project. European Perinatal Health Report. Core indicators of the health and care of pregnant women and babies in Europe in 2015*. Retrieved 16.06.2021 from <https://www.europeristat.com>
- Zhang, J., Cui, F., Li, L., Yang, J., Zhang, L., Chen, Q., & Tian, Y. (2014). Contrasting effects of Kruppel-like factor 4 on X-ray-induced double-strand and single-strand DNA breaks in mouse astrocytes. *Cell Biochemistry and Function*, 32(3), 241-248. <https://doi.org/10.1002/cbf.3007>
- Zhang, P., Basu, P., Redmond, L. C., Morris, P. E., Rupon, J. W., Ginder, G. D., & Lloyd, J. A. (2005). A functional screen for Kruppel-like factors that regulate the human gamma-globin gene through the CACCC promoter element. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 35(2), 227-235. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2005.04.009>
- Zhang, W., Geiman, D. E., Shields, J. M., Dang, D. T., Mahatan, C. S., Kaestner, K. H., Biggs, J. R., Kraft, A. S., & Yang, V. W. (2000). The gut-enriched Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 4) mediates the transactivating effect of p53 on the p21WAF1/Cip1 promoter. *Journal of Biological Chemistry*, 275(24), 18391-18398. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000062200>
- Zhang, X., Peng, W., Zhang, S., Wang, C., He, X., Zhang, Z., Zhu, L., Wang, Y., & Feng, Z. (2011). MicroRNA expression profile in hyperoxia-exposed newborn mice during the development of bronchopulmonary dysplasia. *Respiratory Care*, 56(7), 1009-1015. <https://doi.org/10.4187/respcare.01032>
- Zhang, Y., & Wang, J. (2023). Cellular and Molecular Mechanisms in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Adv Respir Med*, 91(1), 26-48. <https://doi.org/10.3390/arm91010005>

- Zhang, Y., Wang, Y., Liu, Y., Wang, N., Qi, Y., & Du, J. (2013). Kruppel-like factor 4 transcriptionally regulates TGF-beta1 and contributes to cardiac myofibroblast differentiation. *PLoS One*, 8(4), e63424. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063424>
- Zhou, Y., Hofstetter, W. L., He, Y., Hu, W., Pataer, A., Wang, L., Wang, J., Zhou, Y., Yu, L., Fang, B., & Swisher, S. G. (2010). KLF4 inhibition of lung cancer cell invasion by suppression of SPARC expression. *Cancer Biology & Therapy*, 9(7), 507-513. <https://doi.org/10.4161/cbt.9.7.11106>
- Ziegenhain, C., Vieth, B., Parekh, S., Reinius, B., Guillaumet-Adkins, A., Smets, M., Leonhardt, H., Heyn, H., Hellmann, I., & Enard, W. (2017). Comparative Analysis of Single-Cell RNA Sequencing Methods. *Molecular Cell*, 65(4), 631-643 e634. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.01.023>

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: TODESURSACHEN KINDER 0-5 JAHRE (2001-2015).....	12
ABBILDUNG 2: SEPTENENTWICKLUNG UND ALVEOLARISIERUNG.....	14
ABBILDUNG 3: MODELL DER LUNGENENTWICKLUNG.....	15
ABBILDUNG 4: PATHOMECHANISMUS DER BPD.....	19
ABBILDUNG 5: HISTOLOGISCHE BILDER DER LUNGEN VON KLEINKINDERN.....	19
ABBILDUNG 6: DIE KONTEXTABHÄNGIGEN FUNKTIONEN VON KLF4.....	24
ABBILDUNG 7: BILDICHE DARSTELLUNG DER HYPOTHESE UND DER ZIELE.....	25
ABBILDUNG 8: TIERMODELL.....	31
ABBILDUNG 9: ÜBERSICHT CRELOXP.....	32
ABBILDUNG 10: ISOTROP UNIFORM RANDOMISIERT (IUR).....	34
ABBILDUNG 11: SCHEMATISCHER ABLAUF DER IMMUNFLUORESCENZ-FÄRBUNG (IF).....	37
ABBILDUNG 12: QUANTITATIVE HISTOMORPHOMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN (H&E).....	41
ABBILDUNG 13: SCHEMA SYBR-GREEN (L) & TAQMAN (R) QRT-PCR.....	46
ABBILDUNG 14: EXEMPLARISCHE BILDER DER QUANTITATIVEN HISTOMORPHOMETRIE H&E (20x) & ERGEBNISSE.....	52
ABBILDUNG 15: EXEMPLARISCHE BILDER VWF + A-SMA FÄRBUNG (20x) & ERGEBNISSE.....	53
ABBILDUNG 16: MESSUNG DER GENEXPRESSION VON GEFÄßMARKERN MITTELS QRT-PCR.....	54
ABBILDUNG 17: EXEMPLARISCHE BILDER SIRIUS-ROT FÄRBUNG (20x) & ERGEBNISSE.....	55
ABBILDUNG 18: GENEXPRESSIONSMESSUNGEN VON KOLLAGENEN MITTELS QRT-PCR.....	56
ABBILDUNG 19: EXEMPLARISCHE BILDER HART'S STAIN (40x) & ERGEBNISSE.....	57
ABBILDUNG 20: SEPTENDICKE IN µM (H&E, 20x).....	58
ABBILDUNG 21: FUNKTIONELLE UND ZELLULÄRE PLASTIZITÄT DER AT2.....	58
ABBILDUNG 22: ERGEBNISSE DER IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG VON KLF4 + SFTPC.....	59
ABBILDUNG 23: EXEMPLARISCHE BILDER DER IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG KLF4 + SFTPC.....	60
ABBILDUNG 24: EXEMPLARISCHE BILDER DER IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG TUNEL (40x) & ERGEBNISSE.....	61
ABBILDUNG 25: QRT-PCR VON CDKN1A (P21).....	62
ABBILDUNG 26: BILDER DER IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG A-SMA+ SFTPC & ERGEBNISSE.....	63
ABBILDUNG 27: QRT-PCR VON MESENCHYMALEN ZELLMARKERN (CDH2, PDGFR, SNAI2).....	64
ABBILDUNG 28: QRT-PCR VON SURFACTANTPROTEINEN (SFTPA-D).....	64
ABBILDUNG 29: QRT-PCR VON SECHS UNTERSCHIEDLICHEN AT1 MARKERN.....	65
ABBILDUNG 30: QRT-PCR VON STAMMZELLMARKERN (AXIN2, SNIP1).....	65

7.2 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: EINTEILUNG DER BPD.....	16
TABELLE 2: SETUP DES GEWEBEPROZESSORS ZUR PARAFFINEINBETTUNG.....	33
TABELLE 3: ÜBERSICHT ÜBER DIE VERWENDETEN ANTIKÖRPER BEI DEN IF-FÄRBUNGEN.....	39
TABELLE 4: PROTOKOLL DER RNA-ISOLATION.....	44
TABELLE 5: PROTOKOLL DER CDNA-SYNTHESE.....	45
TABELLE 6: ZUSAMMENSETZUNG EINES WELLS (QRT-PCR) & CYCLER EINSTELLUNGEN.....	47
TABELLE 7: ÜBERSICHT ÜBER DIE VERSCHIEDENEN GENMARKER NACH GRUPPE.....	50

7.3 Genetischer Hintergrund der Tiere

Wurf ID	Tier ID	Genotyp
NOX 1	SPC Nox 1-1	Klf4 HOM x SPC HET x YFP HOM
	SPC Nox 1-2	Klf4 HOM x SPC WT x YFP HOM
NOX 2	SPC Nox 2-1	Klf4 HOM x SPC HET x YFP HET
	SPC Nox 2-2	Klf4 HOM x SPC HET x YFP HET
	SPC Nox 2-6	Klf4 HOM x SPC WT x YFP HET
NOX 5	SPC Nox 5-6	Klf4 HOM x SPC WT x YFP HET
NOX 6	SPC Nox 6-1	Klf4 HOM x SPC HET x YFP HOM
NOX 7	SPC Nox 7-1	Klf4 HOM x SPC HET x YFP HET
	SPC Nox 7-2	Klf4 HOM x SPC HET x YFP HET
	SPC Nox 7-4	Klf4 HOM x SPC WT x YFP HET
	SPC Nox 7-7	Klf4 HOM x SPC WT x YFP HET
HYP 1	SPC Hyx 1-1	Klf4 HOM x SPC HET x YFP HOM
	SPC Hyx 1-4	Klf4 HOM x SPC WT x YFP WT
	SPC Hyx 1-5	Klf4 HOM x SPC WT x YFP HOM
	SPC Hyx 1-7	Klf4 HOM x SPC HET x YFP HOM
HYP 2	SPC Hyx 2-3	Klf4 HOM x SPC WT x YFP HET
HYP 5	SPC Hyx 5-5	Klf4 HOM x SPC WT x YFP HOM
HYP 6	SPC Hyx 6-4	Klf4 HOM x SPC HET x YFP HOM
	SPC Hyx 6-5	Klf4 HOM x SPC HET x YFP HOM
	SPC Hyx 6-7	Klf4 HOM x SPC HET x YFP HET
HYP 7	SPC Hyx 7-1	Klf4 HOM x SPC WT x YFP HOM
	SPC Hyx 7-3	Klf4 HOM x SPC HET x YFP HET