

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

**Funktionelle Rolle von CXCL10
in der Hyperoxie-induzierten Lungenerkrankung
der neugeborenen Maus**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Florian Thielen
aus Trier

promoviert am 21. Oktober 2022

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2022

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

1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. nat. med. M. A. A. Alcázar

2. Gutachterin: Universitätsprofessorin Dr. med. S. Eming

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:

Universitätsprofessor Dr. med. Dr. nat. med. M. A. A. Alcázar

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 Tierversuche sowie die Tötung der Tiere und die nachfolgenden Organentnahmen wurden von Universitätsprofessor Dr. med. Dr. nat. med. M. A. A. Alcázar ^a, Frau Dr. med. vet. V. Jentgen ^a und Frau Dr. nat. med. J. Mohr ^a ausgeführt.

Die Gewebeschnitte wurden von mir selbst nach entsprechender Einweisung durch Frau Dr. nat. med. J. Mohr ^a angefertigt. Ebenso wurden mit Ausnahme der Immunhistochemie alle Gewebefärbungen nach Anleitung durch die Biologielaborantin Frau C. Vohlen ^a selbstständig von mir durchgeführt.

Die immunhistochemischen Färbungen von CD68 und vWF wurden in Absprache mit Frau Prof. Dr. rer. nat. Margarethe Odenthal ^b im Labor des pathologischen Instituts der Uniklinik Köln (Kerpener Str. 62, 50937 Köln) ohne meine Mitarbeit durch Frau M. Müller ^b angefertigt. Anschließend wurden mir die gefärbten Gewebeschnitte zur eigenständigen histologischen Auswertung übergeben.

Die Immunfluoreszenz-Experimente habe ich selbstständig nach entsprechender Anleitung durch Herrn Dr. nat. med. D. Hirani ^a durchgeführt. Herr Dr. nat. med. D. Hirani ^a hat mich

ebenso in die Auswertung der histologischen Experimente eingewiesen. Die Messungen und statistischen Auswertungen habe ich daraufhin selbstständig vorgenommen.

Die molekularbiologischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit (RT-PCR, Immunoblot, Zymographie) wurden von mir selbst ausgeführt und ausgewertet. Auch die jeweils notwendigen Vorbereitungen (RNA-Isolation, Synthese von cDNA, Proteinisolation, Herstellen der Puffer etc.) habe ich eigenständig durchgeführt. In die molekularbiologischen Methoden eingearbeitet und bei der Ausführung unterstützt wurde ich durch Frau C. Vohlen ^a.

Alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Materialien inklusive der für die Auswertung genutzten Software sind unten aufgeführt (vgl. 3.1).

^a Universität zu Köln und Uniklinik Köln, Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Translationale Experimentelle Pädiatrie, Experimentelle Pneumologie

^b Universität zu Köln und Uniklinik Köln, Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie, Translationale Molekularpathologie

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.

Köln, den 30. März 2022

Unterschrift: 

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den vielen Menschen bedanken, ohne die die erfolgreiche Fertigstellung dieser Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein erstes Dankeschön gilt Universitätsprofessor Dr. med. J. Dötsch, der mir die Durchführung dieser Promotion am Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin der Uniklinik Köln unter Bereitstellung aller dafür notwendigen Ressourcen ermöglicht hat.

Herzlichen Dank auch an die medizinische Fakultät der Universität zu Köln für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die großzügige finanzielle Unterstützung im Rahmen des Forschungsförderungsprogramms Köln Fortune.

Außerdem danke ich Frau Prof. Dr. M. Odenthal und Frau M. Müller aus dem Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Uniklinik Köln, die die vorliegende Studie durch ihren Beitrag eindeutig bereichert haben.

Großer Dank gebührt auch den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe, die mich auf vielfältige Art und Weise unterstützt haben. Danke an Frau Dr. nat. med. J. Mohr und Frau Dr. med. vet. V. Jentgen für die Beaufsichtigung der Tierversuche. Danke an Herrn Dr. nat. med. D. Hirani für seine Hilfe bei methodischen und inhaltlichen Fragen aller Art. Vielen Dank auch an Frau R. Wilke, die mir im Labor mehrfach mit hilfreichem Rat zur Seite gestanden hat. Ein besonderes Dankeschön richte ich an Frau C. Vohlen, die mich mit Geduld und immenser Expertise in die verschiedenen Labormethoden eingewiesen hat und die für fast jedes Problem eine Lösung zu kennen scheint.

Besonderer Dank gilt darüber hinaus Universitätsprofessor Dr. med. Dr. nat. med. M. A. A. Alcázar für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung. Er hat mich stets unterstützt und gefördert, ohne mich unter Druck zu setzen und hatte jederzeit ein offenes Ohr für meine Fragen und Anliegen. Mit seiner offenen und fröhlichen Art und dem ihm eigenen wissenschaftlichen Enthusiasmus hat er mich ermutigt, selbstständig Ideen und Konzepte zu entwickeln, während er mir gleichzeitig mit enormem Fachwissen ausgeholfen hat, wenn ich mal nicht weiterwusste.

Abschließend möchte ich von ganzem Herzen meinen Eltern Doris und Thomas Thielen danken, die mir immer bedingungslosen Rückhalt geboten haben. Sie haben mich durch die Höhen und Tiefen meines bisherigen Lebens begleitet und mir dabei die Kraft gegeben, ohne die ich auch diese Arbeit nicht hätte bewältigen können.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	9
1 Zusammenfassung	12
2 Einleitung	13
2.1 Frühgeburt	13
2.1.1 Definition und Epidemiologie von Frühgeburt	13
2.1.2 Komplikationen und Mortalität bei Frühgeburt.....	14
2.1.3 Frühgeburt – Die Lunge bestimmt die Langzeitprognose	14
2.2 Lungenentwicklung – Meilensteine und zeitliche Dimensionen	15
2.3 Bronchopulmonale Dysplasie	17
2.3.1 Erstbeschreibung der bronchopulmonalen Dysplasie und der Wandel des Krankheitsbegriffs	17
2.3.2 Definition der bronchopulmonalen Dysplasie	18
2.3.3 Ätiologie der bronchopulmonalen Dysplasie	19
2.3.4 Pathophysiologie und Histopathologie der bronchopulmonalen Dysplasie....	23
2.3.5 Klinisches Bild der bronchopulmonalen Dysplasie.....	27
2.3.6 Präventive und therapeutische Optionen bei bronchopulmonaler Dysplasie.	28
2.4 Entzündung – Ein Schlüsselmechanismus in der Pathogenese der bronchopulmonalen Dysplasie	30
2.4.1 Die Rolle der Makrophagen in der pulmonalen Inflammation bei der bronchopulmonalen Dysplasie	31
2.4.2 <i>C-X-C motif chemokine ligand 10</i>	33
2.5 Fragestellung der Arbeit	35
3 Material und Methoden	37
3.1 Materialien	37
3.1.1 Chemikalien und Reagenzien	37
3.1.2 Puffer und Stammlösungen.....	38
3.1.3 Versuchskits	40
3.1.4 Antikörper	40

3.1.5	Verbrauchsmaterial	41
3.1.6	Geräte und Ausrüstung	42
3.1.7	Software	43
3.2	Tierstudie	44
3.2.1	Versuchstiere und Rahmenbedingungen	44
3.2.2	Modell der Hyperoxie-induzierten Lungenschädigung bei der Maus	44
3.2.3	Präparation und Organentnahmen.....	45
3.3	Histologische Analysen.....	46
3.3.1	Aufbereitung der Lungen für die Histologie	46
3.3.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	47
3.3.3	Picro Sirius-Red-Färbung.....	48
3.3.4	Elastika-Färbung nach Hart.....	48
3.3.5	Quantitative Histomorphometrie.....	48
3.3.6	Immunhistochemie	51
3.3.7	Ki67-Immunfluoreszenz.....	52
3.3.8	TUNEL-Assay.....	53
3.4	Methoden zur Untersuchung der Expressionsmuster auf mRNA-Ebene	54
3.4.1	RNA-Isolation und Bestimmung der RNA-Konzentration	54
3.4.2	Synthese von cDNA	54
3.4.3	Quantitative RT-PCR.....	55
3.4.4	Statistische Auswertung der RT-PCR-Ergebnisse	57
3.5	Methoden zur Untersuchung von Proteinexpression und Signalwegen	58
3.5.1	Proteinisolation und Bestimmung der Proteinkonzentration.....	58
3.5.2	Immunoblot-Analyse.....	59
3.5.3	Zymographie	60
3.6	Statistische Analyse und graphische Darstellung der Ergebnisse.....	61
4	Ergebnisse.....	62
4.1	P14 – Einfluss der CXCL10-Defizienz auf die akute Lungenschädigung durch die Hyperoxie	62

4.1.1	Einfluss der CXCL10-Defizienz auf das Lungenwachstum unter Hyperoxie..	62
4.1.2	Einfluss der CXCL10-Defizienz auf die extrazelluläre Matrix und deren Umbau unter Hyperoxie.....	70
4.1.3	Einfluss der CXCL10-Defizienz auf Makrophageninflux und -polarisierung unter Hyperoxie.....	77
4.2	P28 – Auswirkungen der CXCL10-Defizienz auf die Regenerationsphase nach beendeter Hyperoxie-Exposition.....	80
4.2.1	Einfluss der CXCL10-Defizienz auf das Lungenwachstum in der Regenerationsphase.....	80
5	Diskussion.....	83
5.1	Schlussfolgerung aus den Ergebnissen: CXCL10 – Ein biphasischer Mechanismus	83
5.2	Das Modell der Hyperoxie-induzierten Lungenerkrankung der neugeborenen Maus als translationales Modell der bronchopulmonalen Dysplasie	85
5.3	Die ambivalente Rolle der Inflammation bei bronchopulmonaler Dysplasie und Hyperoxie-induzierter chronischer Lungenerkrankung der Maus	87
5.4	Makrophagen am Beispiel anderer Lungenerkrankungen	89
5.5	Wie CXCL10 den pulmonalen Phänotyp beeinflusst.....	90
5.6	CXCL10 als Angriffspunkt zielgerichteter Therapien	92
5.7	Was wir Neues über die bronchopulmonale Dysplasie gelernt haben	93
5.8	Limitationen der Arbeit.....	94
5.9	Ausblick	96
6	Literaturverzeichnis.....	98
7	Anhang.....	112
7.1	Abbildungsverzeichnis.....	116
7.2	Tabellenverzeichnis	116
7.3	Formeln	117

Abkürzungsverzeichnis

<i>Acta</i>	<i>Actin alpha 1 (Gen)</i>
<i>Actb</i>	<i>Actin beta (Gen)</i>
AEC	<i>alveolar epithelial cells</i>
AM	Alveolarmakrophagen
AQP5	Aquaporin 5
ARG1	Arginase 1
ATI	<i>alveolar epithelial type I</i>
ATII	<i>alveolar epithelial type II</i>
BPD	bronchopulmonale Dysplasie
BSA	bovines Serumalbumin
<i>Ccn2</i>	<i>cellular communication network factor 2</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
COVID-19	<i>coronavirus disease 2019</i>
Ct(-Wert)	<i>cycle threshold(-Wert)</i>
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
CXCL	<i>C-X-C motif chemokine ligand</i>
<i>Cxcl10^{-/-}</i>	<i>Cxcl10-Knockout</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethyldicarbonat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELBW	<i>extremely low birth weight</i>
EOS	<i>early onset sepsis</i>
EtOH	Ethanol
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FiO ₂	inspiratorische Sauerstofffraktion
GA	Gestationsalter
GAPDH	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GK	Glukokortikoide
GNPI	Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin

HE	Hämatoxylin-Eosin
HKG	<i>house keeping</i> Gen
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HYX	Hyperoxie
IFN- γ	Interferon- γ
IHC	Immunhistochemie
IP-10	<i>interferon-γ inducible protein 10</i>
IRDS	<i>infant respiratory distress syndrome</i>
IUGR	<i>intrauterine growth restriction</i>
IUR	<i>isotropic uniform random</i>
kDa	Kilodalton
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
Ki67	Kiel-Antigen Nr. 67
LBW	<i>low birth weight</i>
LISA	<i>less invasive surfactant administration</i>
LOS	<i>late onset sepsis</i>
MLI	<i>mean linear intercept</i>
MMLV	Moloney murines Leukämievirus
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa B</i>
NGZ	neutrophile Granulozyten
NICHD	<i>National Institute of Child Health and Human Development</i>
NOX	Normoxie
OD ₂₆₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm
OD ₂₈₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 280 nm
P14	postnataler Tag 14
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PDA	persistierender Ductus arteriosus
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PEEP	<i>positive end-expiratory pressure</i>
PFA	Paraformaldehyd
PMA	postmenstruelles Alter
RAC	<i>radial alveolar count</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
<i>Rna18sn5</i>	<i>RNA, 18S ribosomal N5</i>

ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RSV	Respiratorisches Synzytial-Virus
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>real time polymerase chain reaction</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> /Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SFTP	Surfactant-Protein
SSW	Schwangerschaftswoche
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TBST	<i>Tris buffered saline with Tween-20</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i>
TNF- α	Tumor-Nekrosefaktor α
TUNEL	<i>terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling</i>
UpM	Umdrehungen pro Minute
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VILI	<i>ventilation induced lung injury</i>
VLBW	<i>very low birth weight</i>
vWF	von-Willebrand-Faktor
WHO	<i>World Health Organization</i>
WT	Wildtyp
α -SMA	<i>α smooth muscle actin</i>
β -ME	β -Mercaptoethanol

1 Zusammenfassung

Die bronchopulmonale Dysplasie (BPD) ist die häufigste chronische Lungenerkrankung beim Frühgeborenen. Pathophysiologisch kommt es zu einer Unterbrechung von Alveolo- und Angiogenese und einem fibrotischen Umbau der extrazellulären Matrix (EZM). Eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der BPD spielt die Inflammation mit einer gesteigerten Migration und Aktivierung von Makrophagen sowie einer Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren. Sowohl im murinen Modell als auch in humanen Studien wurden pulmonal erhöhte Konzentrationen des Chemokins CXCL10 nachgewiesen. Da die genaue funktionelle Rolle von CXCL10 in der Pathogenese der BPD noch ungeklärt ist, haben wir die Hypothese erforscht, dass eine CXCL10-Defizienz neugeborene Mäuse vor der Hyperoxie-induzierten Lungenerkrankung (als Modell der BPD) schützt.

Um diese Hypothese zu adressieren, wurden homozygote CXCL10-Knockout- (*Cxcl10^{-/-}*) sowie Wildtyp-Mäuse (WT) vom postnatalen Tag 1 bis 14 (P1 bis 14) normobarer Hyperoxie (85% O₂) ausgesetzt. Ein Teil der Tiere wurde am P14 getötet (akute Schädigung); die restlichen wurden nach zwei Wochen Regeneration in Normoxie am P28 untersucht. Die Kontrollgruppen verblieben stets in Normoxie. Die Lungen wurden für histomorphometrische Analysen mit Paraformaldehyd druckfixiert und in Paraffin eingebettet bzw. für molekularbiologische Untersuchungen schockgefroren.

Während der *akuten Lungenschädigung* durch die Hyperoxie waren die CXCL10-defizienten Mäuse teilweise vor Apoptose und einem fibrotischem Umbau der EZM geschützt. Zudem war die Alveolarisierung gegenüber den Wildtypen verbessert. Dieser strukturelle Schutz durch CXCL10-Defizienz war mit einer reduzierten pulmonalen Makrophageninvasion im Sinne einer gehemmten Inflammation assoziiert. In der *Regenerationsphase* zeigten die *Cxcl10^{-/-}* im Vergleich zu den WT nicht nur eine Störung der Surfactant-Expression und der Homöostase der Alveolarepithelzellen, sondern auch einen Verlust der verbesserten Alveolenbildung.

Unsere Studie unterstreicht die bedeutsame Rolle von CXCL10 in der akuten Pathogenese der experimentellen BPD und bietet somit einen vielversprechenden antiinflammatorischen Therapieansatz. Während der Verlust von CXCL10 während der Schädigungsphase den pulmonalen Phänotyp vorwiegend positiv beeinflusst, ist das Fehlen der physiologischen CXCL10-Expression in der Regeneration interessanterweise nachteilig für das Alveolenwachstum. Wir nehmen daher einen dualen Mechanismus für die funktionelle Rolle von CXCL10 an, der eine ausbalancierte Regulation der Expression erforderlich macht.

2 Einleitung

2.1 Frühgeburt

2.1.1 Definition und Epidemiologie von Frühgeburt

Frühgeburt ist mit ihren unmittelbaren Komplikationen trotz der stetigen Weiterentwicklung der neonatologischen Intensivmedizin die global führende Todesursache bei Kindern unter fünf Jahren und einer der wichtigsten Gründe kindlicher Morbidität¹⁻³. Weltweit waren im Jahr 2015 ca. eine Millionen Todesfälle auf die Folgen von Frühgeburt zurückzuführen². Definiert wird sie als Geburt vor Vollendung der 37. Schwangerschaftswoche (SSW), wobei anhand des genauen Gestationsalters (GA; berechnet ab dem 1. Tag der letzten Menstruation der Mutter) weiter zwischen *moderate to late preterm*, *very preterm* und *extremely preterm birth* unterschieden wird (vgl. Tabelle 1)². Neben dem GA kann auch das Geburtsgewicht herangezogen werden, um den Grad der Frühgeburtlichkeit einzuschätzen (vgl. Tabelle 1)⁴.

Tabelle 1: Gradierung von Frühgeburtlichkeit anhand des Gestationsalters und des Geburtsgewichts. Abkürzungen: GA = Gestationsalter, SSW = Schwangerschaftswochen.

GA in vollendeten SSW	
<i>moderate to late preterm birth</i>	32 bis <37
<i>very preterm birth</i>	28 bis <32
<i>extremely preterm birth</i>	<28

Geburtsgewicht in g	
<i>low birth weight (LBW)</i>	<2500
<i>very low birth weight (VLBW)</i>	<1500
<i>extremely low birth weight (ELBW)</i>	<1000

Im Jahr 2014 schätzte die *World Health Organization* (WHO) den weltweiten Anteil an Frühgeburten auf 10,6% aller Lebendgeburten^{1,5}. In absoluten Zahlen entspricht dies etwa 15 Millionen Frühgeburten innerhalb eines Jahres⁵. Deutschlands Frühgeburtenrate lag im Jahr 2011 bei 9%³. Während dieser Wert relativ stabil ist, stieg der Anteil der besonders risikobehafteten Geburten vor Ende der 28. SSW (entsprechend *extremely preterm birth*) zuletzt deutlich an³.

2.1.2 Komplikationen und Mortalität bei Frühgeburt

Je unreifer ein Neugeborenes ist, desto höher ist das Risiko für mitunter schwerwiegende Komplikationen und Folgeerkrankungen⁶. So ist bei Frühchen im Vergleich zu Reifgeborenen sehr viel häufiger ein Atemnotsyndrom des Neugeborenen (engl. *infant respiratory distress syndrome/IRDS*) zu beobachten⁷. Auch das Risiko für intraventrikuläre Hämorrhagien, Retinopathien, nekrotisierende Enterokolitiden und schwere Neugeboreneninfektionen ist signifikant erhöht⁸. Ein bedeutendes kardiovaskuläres Problem Frühgeborener stellt der gegenüber Reifgeborenen gehäuft auftretende persistierende Ductus arteriosus (PDA) dar⁸. Zudem besteht eine Prädisposition für gravierende Störungen der Homöostase in Form von Temperaturinstabilitäten, Hypoglykämien und Dehydratation sowie für schwere Hyperbilirubinämien⁷.

Angesichts der erheblichen Morbidität ist die Mortalität Frühgeborener sehr hoch. Insbesondere Frühgeborene <28 SSW haben mit 33,43% eine sehr hohe Sterblichkeit, was aufgrund des steigenden Anteils dieser Subgruppe umso stärker ins Gewicht fällt^{3,9}. Aber auch die Mortalität von *very* und *moderate to late preterm infants* liegt mit 8,01% bzw. 1,62% deutlich über der Reifgeborener (0,13%)⁹.

2.1.3 Frühgeburt – Die Lunge bestimmt die Langzeitprognose

Die nach wie vor hohe Mortalität darf nicht darüber hinwegtäuschen, dass zuletzt enorme Fortschritte im Bereich der Prävention und der neonatologischen Intensivmedizin gemacht wurden, durch die das Ein-Jahres-Überleben Frühgeborener in den vergangenen Jahrzehnten deutlich gesteigert werden konnte¹⁰. Insbesondere für extrem frühgeborene Kinder ist eine beachtliche Prognoseverbesserung erreicht worden¹⁰. Das *limit of viability* – der kindliche Reifegrad, ab dem ein extrauterines Überleben ermöglicht werden kann – ist in Ländern mit hohem mittlerem Einkommen teilweise auf ein Gestationsalter <25 SSW und ein Geburtsgewicht <600 g gesunken¹⁰⁻¹³. Eine Maßnahme, die zum verbesserten Überleben beigetragen hat, ist die Etablierung der pränatalen Lungenreifeinduktion mittels Glukokortikoiden (GK) zur Prävention des IRDS^{14,15}. Aber auch postnatale Therapien befinden sich in ständiger Weiterentwicklung. Beispielhaft seien hierfür die Indometacin-Therapie bei PDA und die Verbreitung der *less invasive surfactant administration* (LISA) genannt^{10,16}.

Durch die Steigerung der Überlebensrate Frühgeborener gewinnen unweigerlich die Langzeitfolgen der Frühgeburtlichkeit an Bedeutung und stellen somit das Gesundheitswesen vor eine wachsende Herausforderung¹⁷. Eine Erkrankung, die Morbidität und Mortalität Frühgeborener maßgeblich bestimmt und darüber hinaus die Langzeitprognose entscheidend

prägt, ist die bronchopulmonale Dysplasie (BPD), auch bekannt als *neonatal chronic lung disease* ¹⁸. Sie betrifft typischerweise Frühgeborene, die einer prolongierten Sauerstofftherapie bedürfen und ist insbesondere durch eine Unterbrechung der alveolo-kapillären Entwicklung und eine konsekutive alveoläre Hypoplasie charakterisiert ¹⁸⁻²⁰. Chronisch-respiratorische Beeinträchtigungen aufgrund einer BPD gelten neben neurologischen Störungen als prognostisch wichtigste Langzeitkomplikation bei Frühgeborenen ^{21,22}. Die Inzidenz der Erkrankung bleibt hierbei unverändert hoch ²³. Betroffene leiden unter erheblichen strukturellen Alterationen und funktionellen Einschränkungen der Lunge, die häufig bis ins Erwachsenenalter persistieren ^{21,24,25}. Weiterhin besteht ein hohes Risiko für schwere Sekundärerkrankungen wie z.B. die pulmonale Hypertonie ^{21,24,25}.

2.2 Lungenentwicklung – Meilensteine und zeitliche Dimensionen

An diesem Punkt ist die Sonderstellung der Lunge in der embryofetalen Entwicklung zu betonen. Im Gegensatz zu den meisten anderen Organen ist die Lunge erst sehr spät vollständig ausgereift. Die Lungenentwicklung nimmt die gesamte Embryonal- und Fetalperiode ein, wobei die vollständige Organdifferenzierung sogar erst lange nach der Geburt mit dem Abschluss der alveolären Phase erreicht wird (vgl. Abbildung 1) ^{26,27}. Bis dahin ist die Lunge als unreif zu betrachten, sowohl im anatomisch-strukturellen als auch im biochemisch-funktionellen Sinne ²⁸.

Besonders ausgeprägt ist die pulmonale Unreife bei Frühgeborenen. So befinden sich *extremely preterm infants* erst in der späten kanalikulären (17. bis 26. SSW, vgl. Abbildung 1) oder frühen sakkulären Phase (24. bis 38. SSW, vgl. Abbildung 1). Für das extrauterine Überleben wichtige Entwicklungsschritte und Anpassungen müssen also erst noch erfolgen. Hierzu zählen eine Reduktion des Bindegewebsanteils zugunsten eines Zuwachses an Lungenparenchym, Wachstum und Ausreifung der Blutgefäße und die Ausdifferenzierung der Alveolarepithelzellen (engl. *alveolar epithelial cells/AEC*) ^{26,27}. Später können zwei Typen von AEC unterschieden werden: Alveolarepithel-Typ-I-Zellen (ATI-Zellen) kleiden die alveoläre Oberfläche aus und sind somit postnatal Bestandteil der Blut-Luft-Schranke und des alveolo-kapillären Gasaustauschs ^{29,30}. Alveolarepithel-Typ-II-Zellen (ATII-Zellen) fungieren als Stammzellen der Lunge und Progenitorzellen der ATI-Zellen ^{29,30}. Durch Proliferation und Differenzierung tragen sie zu Wachstum und Selbsterneuerung der Lunge bei ²⁹. Darüber hinaus sezernieren sie ungefähr ab der 30. SSW den essenziellen Surfactant in die Alveolen ^{26,27,29,30}.

Die letzte Entwicklungsphase, die alveoläre Phase, beginnt selbst bei Reifgeborenen erst kurz vor der Geburt und kann sich bis jenseits des dritten Lebensjahres erstrecken (vgl. Abbildung 1) ^{26,27}. Noch postpartal entstehen durch die Ausbildung sekundärer Septen neue Alveolen aus den zuvor angelegten glattwandigen Sacculi, was zu einer immensen Vergrößerung der Gasaustauschfläche führt ^{26,31}.

Da die Organentwicklung erst in einem hohen PMA abgeschlossen ist, bleibt die Lunge lange vulnerabel für Entwicklungsstörungen, die durch Schädigungen verschiedener Art sowie die Beeinträchtigung der steuernden Signalwege hervorgerufen werden ^{32,33}. Dieses Wissen ist notwendig, um das Krankheitsbild der BPD sowie insbesondere die Ätiopathogenese verstehen zu können.

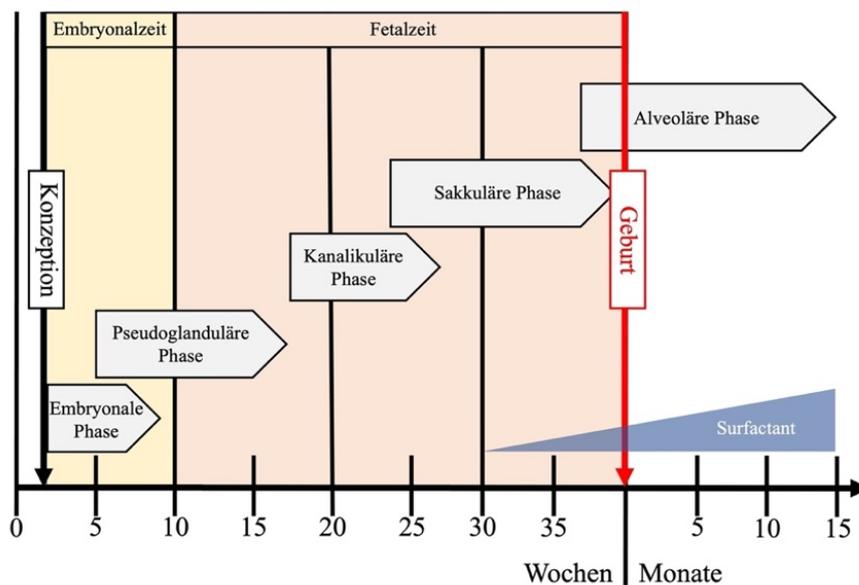


Abbildung 1: Phasen der Lungenentwicklung. Überblick über die zeitlichen Dimensionen und Phasen der menschlichen Lungenentwicklung. Embryonale Phase (erste 5 bis 7 Wochen *post conceptionem*): Ausknospung der Lungenanlage aus dem endodermalen Vorderdarm im Bereich des zukünftigen Ösophagus; beginnendes Wachstum in das umgebende Mesenchym und erste Teilungen bis auf Subsegmentebene. Pseudoglanduläre Phase (Woche 5 bis 17): Ausbildung der luftleitenden Atemwege und beginnende azinäre Abgrenzung. Kanalikuläre Phase (Woche 17 bis 26): Erweiterung der distalen Atemwege, Differenzierung des kuboiden Epithels in Alveolarepithelzellen (AEC) Typ I und II, Beginn der Surfactant-Produktion. Sakkuläre Phase (24. Woche bis Geburt): Zunahme des Lungenparenchyms, Reduktion des interstitiellen Gewebes, Ausreifung des Surfactant-Systems und beginnende Surfactant-Sekretion. Alveoläre Phase (36. Woche bis 3. Lebensjahr): Entstehung der Alveolen durch Umbau der primitiven Septen und Ausbildung der Sekundärsepten; enorme Vergrößerung der Gasaustauschfläche. [Nach: Burri PH. Fetal and postnatal development of the lung. *Annu Rev Physiol* 1984; 46: 617-28].

2.3 Bronchopulmonale Dysplasie

2.3.1 Erstbeschreibung der bronchopulmonalen Dysplasie und der Wandel des Krankheitsbegriffs

Eingeführt wurde der Begriff der BPD im Jahr 1967 zur Bezeichnung der chronischen Lungenschädigung, die bei frühgeborenen Kindern <34 SSW beobachtet werden konnte, welche aufgrund eines Surfactant-Mangels bzw. IRDS in Ermangelung schonenderer therapeutischer Optionen aggressiv mechanisch beatmet und mit hochkonzentriertem Sauerstoff behandelt werden mussten^{20,34}. Sauerstofftoxizität sowie Baro- und Volutrauma im Zuge der mechanischen Ventilation wurden hier als entscheidende ätiologische Faktoren identifiziert³⁵. Diese sog. „klassische“ BPD war gekennzeichnet durch ein heterogenes Schädigungsmuster der Lunge mit teils überblähten, teils atelektatischen Arealen, epithelialen Läsionen, ausgeprägter Fibrose und einer Hyperplasie der glatten Atemwegsmuskulatur^{20,34}.

Im Laufe der Zeit kam es zu einem Wandel von Ätiologie, Pathologie und Epidemiologie des Krankheitsbilds, weshalb der Begriff der „neuen“ BPD (auch „Post-Surfactant-BPD“) geprägt wurde²⁰. Durch die pränatale Lungenreifeinduktion mittels mütterlicher Steroidgabe und die intratracheale Surfactant-Administration haben sich Prävention und Therapie des IRDS sowie das Überleben Frühgeborener maßgeblich verbessert. Mechanische Ventilation und Sauerstoffgabe werden heutzutage nach Möglichkeit vermieden. Ist eine atmungsunterstützende Therapie unumgänglich, kann auf zunehmend schonendere Verfahren zurückgegriffen werden. Folglich ist die „klassische“ BPD bei reiferen Frühgeborenen heute deutlich seltener zu beobachten, was sich auch in einer geringeren respiratorischen Morbidität und Mortalität innerhalb dieser Altersgruppe niederschlägt^{15,20,36}. Stattdessen sind in den letzten Jahrzehnten verstärkt die *extremely preterm infants* bzw. Frühgeborene mit einem *extremely low birth weight* (ELBW) in den Fokus geraten, bei denen sich auch dann häufig eine BPD ausbildet, wenn nach der Geburt kein oder nur ein sehr mildes IRDS vorliegt^{35,37}. Bei Unreife des Atemzentrums, *wet lung disease*, Atelektasen, pulmonalen Infektionen oder anderen kompromittierenden Zuständen liegt postnatal i.d.R. weiterhin eine respiratorische Instabilität mit Bedarf einer Atmungsunterstützung vor, die obligate Knüpfung an ein IRDS wie bei der „klassischen“ BPD entfällt jedoch^{20,38}. Für die Ätiologie der „neuen“ BPD sind neben Sauerstofftoxizität und Beatmungstrauma weitere Faktoren von großer Bedeutung, nämlich vor allem die bei den *extremely preterm infants* nochmals aggravierte pulmonale Unreife (vgl. 2.2)³⁵. Der wesentliche pathophysiologische Mechanismus der „neuen“ BPD liegt weniger in der direkt lungenschädigenden Potenz aggressiver atmungsunterstützender Maßnahmen als vielmehr in einem multifaktoriell bedingten Arrest der physiologischen Lungenentwicklung³⁵. Morphologisch manifestiert sich die unterbrochene

Alveolo- und Angiogenese in einer extremen alveolären und vaskulären Hypoplasie und einem konsekutiv verminderten Gasaustausch, während die fibroproliferativen Veränderungen im Vergleich zur „klassischen“ BPD deutlich milder ausgeprägt sind ^{39,40}.

2.3.2 Definition der bronchopulmonalen Dysplasie

Klinische Definition und Diagnosekriterien der BPD unterliegen einem ständigen Wandel ^{18,28,41,42}. Die bis 2014 gültige Leitlinie der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin (GNPI) mit dem Titel „Prävention und Therapie der bronchopulmonalen Dysplasie Frühgeborener“ orientiert sich an der Definition einer Konsensuskonferenz des US-amerikanischen *National Institute of Child Health and Human Development* (NICHD) aus dem Jahr 2001 ^{28,41,42}.

Hiernach wird die BPD als Bedarf einer Sauerstoffsupplementation, also einer erhöhten inspiratorischen Sauerstofffraktion (FiO_2), über mindestens 28 Lebenstage definiert ^{28,41,42}. Anhand einer Reevaluation des Therapiebedarfs zu einem festgelegten Zeitpunkt erfolgt eine Schweregradeinteilung ^{28,41,42}. Der Referenzzeitpunkt dafür ist das Erreichen eines postmenstruellen Alters (PMA; Summe aus GA und postnatalem Alter) von 36 Wochen bzw. die Entlassung aus der stationären Behandlung, wobei der früher erreichte Zeitpunkt ausschlaggebend ist ^{18,28,41}. Ist nach vorheriger, mindestens 28-tägiger Beatmung an diesem Zeitpunkt keine Sauerstofftherapie mehr erforderlich, spricht man von milder BPD ^{28,41}. Beträgt die benötigte FiO_2 22-29%, ist die Diagnose einer moderaten BPD zu stellen ^{28,41}. Das Vorliegen einer $FiO_2 \geq 30\%$ und/oder einer CPAP- bzw. Beatmungstherapie definiert die schwere BPD ^{28,41}. Bei Frühgeborenen >32 SSW ist der Referenzzeitpunkt für die Schweregradeinteilung auf den 56. Lebenstag bzw. die Krankenhausentlassung verschoben (vgl. Abbildung 2) ⁴³.

Die Definition der NICHD-Konsensuskonferenz ist unter anderem im Hinblick auf Objektivität, klinische Tauglichkeit und Prädiktion der Morbidität umstritten ^{42,44,45}. Da nicht festgelegt wird, wie der Sauerstoffbedarf zu ermitteln ist bzw. welcher Zielwert für die Sauerstoffsättigung gelten soll, sind bei Diagnosestellung und Schweregradeinteilung erhebliche Abweichungen zwischen verschiedenen Neonatalzentren möglich ⁴⁴. Ein standardisierter Raumlufftest mit einem definierten Sättigungszielwert von $\geq 90\%$, wie ihn auch die Leitlinie der GNPI vorschlägt, soll diese Variabilität reduzieren ^{28,46}. Darüber hinaus erschweren neue atmungsunterstützende Verfahren, wie z.B. nasale *high-flow*-Kanülen, die eindeutige Diagnosefindung und Klassifizierung gemäß NICHD-Konsens ⁴⁷. Neuere Klassifikationen legen den Fokus verstärkt auf den Modus der Atmungsunterstützung ⁴⁷. Auch in Deutschland werden in Zukunft sicherlich weitere Anpassungen der BPD-Definition erfolgen.

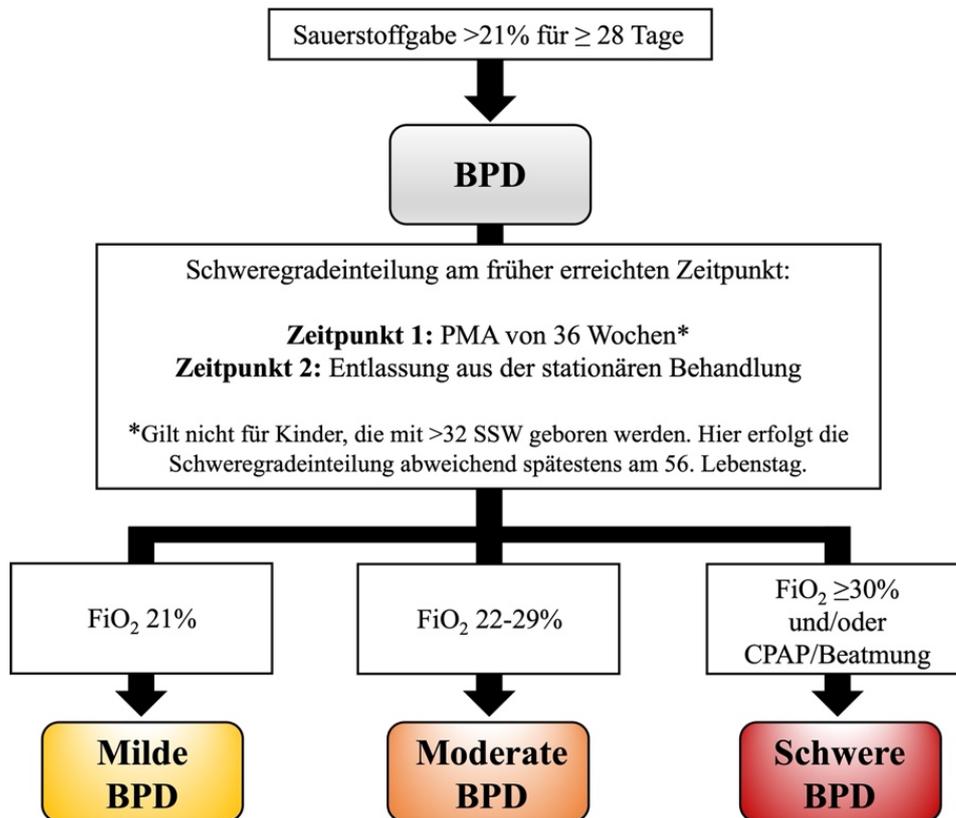


Abbildung 2: Definition und Schweregrade der bronchopulmonalen Dysplasie. Unterscheidung milder, moderater und schwerer bronchopulmonaler Dysplasie (BPD) entsprechend der in Deutschland zuletzt gültigen Leitlinie. [Modifiziert nach: Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin, Deutsche Gesellschaft für Kinder und Jugendmedizin. Prävention und Therapie der bronchopulmonalen Dysplasie Frühgeborener. 2009. <https://gnpi.de/leitlinien/> (zuletzt abgerufen am 20.01.2022). Abbildungsgenehmigung erteilt durch: GNPI.]

2.3.3 Ätiologie der bronchopulmonalen Dysplasie

2.3.3.1 Krankheitsmodell

Die Ätiopathogenese der BPD ist multifaktoriell und noch nicht lückenlos verstanden. Dem aktuellen Krankheitsverständnis zufolge ist die pulmonale Unreife Voraussetzung und Ausgangspunkt der Erkrankung (vgl. 2.2)³². Durch eine entzündliche Lungenschädigung und andere schädigende Einflüsse, die sowohl prä- als auch postnatal auf die unreife Lunge einwirken (vgl. 0), kommt es zu einer Überforderung ihrer Reparatur- und Kompensationsmechanismen³². Eine Unterbrechung der physiologischen Lungenentwicklung ist die Folge³². Es resultieren die unten aufgeführten phänotypischen Merkmale.

Risikofaktoren der bronchopulmonalen Dysplasie

Der wichtigste gesicherte Risikofaktor für die Entwicklung einer BPD ist dem oben skizzierten Krankheitsmodell entsprechend die Unreife des Frühgeborenen. Die entscheidenden Parameter zur Einschätzung und Objektivierung dieser Unreife sind GA und Geburtsgewicht (vgl. Tabelle 1) ³². Sie gelten als die stärksten Prädiktoren für eine BPD, was sich auch in der Epidemiologie der Erkrankung widerspiegelt ³². So besteht eine inverse Korrelation zwischen der Inzidenz und dem GA ⁸. Eine große prospektive Kohortenstudie im europäischen Raum aus dem Jahr 2003 ermittelte bei Frühgeborenen <32 SSW eine BPD-Inzidenz von 10,5 bis 21,5% ⁴⁸. Bei Geburt nach der 32. SSW hingegen wird die BPD kaum noch beobachtet ²⁸. Die inverse Beziehung ist auch innerhalb der Subgruppe der Frühgeborenen ≤ 28 SSW zu erkennen. Während bei einem GA von 28 SSW die Inzidenz der BPD ca. 23% beträgt, liegt sie bei einem GA von ≤ 23 SSW bei über 78% ^{8,32}. Auch steigt der Anteil der schweren Krankheitsverläufe mit abnehmendem GA deutlich an (vgl. Abbildung 3) ^{8,32}. Invers korreliert ist die Inzidenz der BPD zudem mit dem Geburtsgewicht; je geringer dieses ist, desto höher ist das Erkrankungsrisiko ⁸. Folglich gilt insbesondere ELBW als wichtiger Prädiktor für die Entwicklung einer BPD ³².

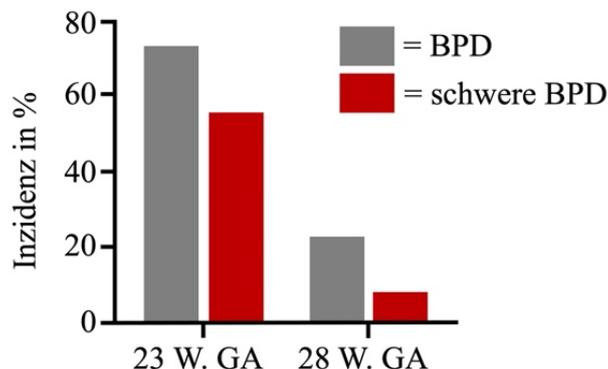


Abbildung 3: Zusammenhang zwischen Gestationsalter und Inzidenz der bronchopulmonalen Dysplasie. Inzidenz der bronchopulmonalen Dysplasie (BPD) bzw. der schweren BPD in % bei einem Gestationsalter (GA) von 23 und 28 Wochen (W.). [Modifiziert nach: Kalikkot Thekkeveedu R, Guaman MC, Shivanna B. Bronchopulmonary dysplasia: A review of pathogenesis and pathophysiology. Respir Med. 2017;132:170-7. Abbildungsgenehmigung erteilt durch: Elsevier].

Neben dem Faktor der Frühgeburtlichkeit bzw. der kindlichen Unreife prädisponieren auch genetische Faktoren für die Erkrankung an einer BPD ^{49,50}. Die genetische Veranlagung ist multifaktoriell und polygen definiert ^{49,50}. Die weiteren relevanten Risikofaktoren können in prä- und postnatale unterteilt werden.

Pränatale Risikofaktoren:

Ein pränataler Risikofaktor für die BPD ist die intrauterine Wachstumsverzögerung (engl. *intrauterine growth restriction/IUGR*)^{32,51,52}. IUGR ist ein pathologischer Zustand, der definiert wird als verminderte Wachstumsrate in Bezug auf das ethnien- und geschlechtsabhängige Wachstumspotential des Fötus⁵³. Die Ursachen sind vielfältig und umfassen u. a. Zustände wie Präeklampsie, Plazentainsuffizienz und maternale Mangelernährung⁵³. IUGR geht mit einem beeinträchtigten Lungenwachstum einher und erhöht so die Suszeptibilität für eine BPD³².

Verschiedenen Studien zufolge erhöhen auch pränatale Infektionen im Sinne einer Chorioamnionitis das Risiko für eine BPD, wobei andere Untersuchungen die Bedeutung dieses Risikofaktors in Frage stellen^{32,54-56}.

Ein unumstrittener Risikofaktor hingegen ist der mütterliche Nikotinabusus. Kinder, deren Mütter in der Schwangerschaft rauchen, erkranken signifikant häufiger an BPD⁵⁷⁻⁵⁹. Mechanistisch werden hier unter anderem eine Verminderung des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und damit eine supprimierte Angiogenese (vgl. 2.3.4) sowie eine Plazentadysfunktion diskutiert^{60,61}. Zudem erhöht mütterliches Rauchen das Risiko für Frühgeburt, LBW und IUGR, jeweils starke eigenständige Prädiktoren für die BPD (s.o.)^{32,62}.

Postnatale Risikofaktoren:

Als bedeutender postnataler Risikofaktor trägt eine intensive und/oder prolongierte Sauerstofftherapie zur Entstehung der BPD bei^{34,41}. Vor allem die kumulative Sauerstoffdosis in den ersten Lebenswochen ist dabei ausschlaggebend⁶³. Der Zusammenhang zwischen Sauerstofftoxizität und BPD ist bereits seit der Erstbeschreibung der Krankheit bekannt^{34,41}. Zwar ist eine Sauerstoffsupplementation meist eine unabdingbare therapeutische Maßnahme, um Frühchen mit respiratorischer Insuffizienz zu therapieren, jedoch resultiert die Exposition gegenüber Hyperoxie auch in verstärktem oxidativem Stress^{32,64}. Über die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species/ROS*) werden Zellen und extrazelluläre Matrix (EZM) direkt geschädigt und darüber hinaus verschiedene Signalwege gestört, die unter anderem die alveolo-kapilläre Lungenentwicklung steuern^{32,33,56}. Erschwerend kommt hinzu, dass bei Frühgeborenen die Aktivität antioxidativer Enzyme wie zum Beispiel der Katalase oder Glutathionoxidase reduziert ist^{65,66}. Neben ihrer direkt schädigenden Auswirkung geht die Hyperoxie auch mit der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und dem Influx von Entzündungszellen einher^{56,67}. Entzündung ist von essenzieller Bedeutung für die

Krankheitsentstehung und stellt die Endstrecke verschiedener Pathomechanismen dar³². Auf die Inflammation als Schlüsselmechanismus wird noch gesondert eingegangen (vgl. 2.4).

Auch eine mechanische Beatmung, wie sie zum Beispiel im Falle eines IRDS oder einer Pneumonie notwendig werden kann, erhöht das Erkrankungsrisiko^{32,41,68,69}. Insbesondere ein Volutrauma durch hohe forcierte Tidalvolumina begünstigt eine beatmungsinduzierte Lungenschädigung (engl. *ventilation induced lung injury/VILI*), aber auch hohe Beatmungsdrücke im Sinne eines Barotraumas können hierzu beitragen^{32,68}. Surfactant-Mangel und andere patientenindividuelle Faktoren prädisponieren zusätzlich für beatmungsinduzierte Schäden^{32,68}. Neben dem mechanisch bedingten Schaden kommt es auch bei der VILI zu einer Entzündungsreaktion mit Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren^{70,71}. Durch die Etablierung lungenprotektiver Beatmungsverfahren hat die VILI als Pathomechanismus heutzutage etwas an Bedeutung verloren, wohingegen sie bei der „klassischen“ BPD neben der Sauerstofftoxizität noch den entscheidenden Risikofaktor darstellte (vgl. 2.3.1)^{41,68}.

Während der Stellenwert pränataler Infektionen für die Ätiologie der BPD kontrovers diskutiert wird (s.o.), zeigen klinische Studien eine eindeutige Assoziation zwischen postnataler Sepsis und BPD^{69,72,73}. Bei Neugeborenen wird zwischen *early onset sepsis* (EOS; <72 h postpartal) und *late onset sepsis* (LOS; >72 h postpartal) unterschieden⁷⁴. Zum Erregerspektrum der EOS zählen Streptokokken der Gruppe B und *Escherichia coli*, bei der LOS dominieren neben *Escherichia coli* und anderen Enterobakterien Koagulase-negative Staphylokokken, *Staphylococcus aureus* und *Listeria monocytogenes*⁷⁴. Mechanistisch kommt es auch bei der Sepsis, die *per definitionem* eine systemische Entzündungsreaktion mit sich bringt, zu einer inflammatorisch vermittelten Lungenschädigung und einer Störung der physiologischen postnatalen Organentwicklung³². Oxidativer Stress sowie eine endotheliale und alveoläre Schädigung spielen hier eine Rolle^{22,32}.

Neben den aufgeführten, besonders relevanten Risikofaktoren werden noch zahlreiche weitere diskutiert. Es konnte beispielsweise eine Assoziation der BPD mit Flüssigkeits-Überladung, aber auch mit starkem postpartalem Gewichtsverlust nachgewiesen werden^{72,75}. Auch ein hämodynamisch-relevanter PDA wird teilweise als Risikofaktor genannt, wobei seine Rolle in der Pathogenese der BPD noch nicht sicher geklärt ist^{32,76}.

2.3.4 Pathophysiologie und Histopathologie der bronchopulmonalen Dysplasie

Das Krankheitsbild der BPD hat seit der Erstbeschreibung im Jahr 1967 einen deutlichen Wandel durchlaufen, von dem auch Pathophysiologie und histomorphologisches Bild betroffen sind. Auf die Unterschiede zwischen „klassischer“ und „neuer“ BPD wurde bereits an anderer Stelle eingegangen (vgl. 2.3.1). Hier sollen grundlegende pathophysiologische Aspekte und die resultierenden histopathologischen Veränderungen bei der „neuen“ BPD dargestellt werden. Auf die „klassische“ BPD wird nicht gesondert eingegangen, da diese im Zuge des medizinischen Fortschritts in der industrialisierten Welt stark an Bedeutung verloren hat.

Weil die Grenzen zwischen Ätiologie und Pathophysiologie fließend sind, wurden einige Pathomechanismen schon im Kontext der zugehörigen Risikofaktoren besprochen (vgl. 0). In Bezug auf die Histopathologie ist zu beachten, dass diese nicht einheitlich ist, sondern interindividuell verschieden³². Zwar lassen sich gemeinsame Hauptmerkmale identifizieren, diese können aber jeweils mehr oder weniger stark ausgeprägt vorliegen³².

Unterbrechung der Alveologenese:

Besonders gekennzeichnet ist die „neue“ BPD durch eine homogene, stark ausgeprägte alveoläre Rarefizierung infolge einer partiellen bis totalen Unterbrechung der azinären Entwicklung^{40,41,77}. Die Septierung bleibt unvollständig, weshalb die Alveolenanzahl stark reduziert ist und wenige große, emphysemartige Alveolen das Bild bestimmen^{40,41,77}. Die folglich verminderte gesamtalveoläre Oberfläche (*alveolar surface area*) manifestiert sich in einem beeinträchtigten alveolo-kapillären Gasaustausch^{78,79}.

Gestörte Vaskularisation:

Die Alveologenese ist eng mit der mikrovaskulären Entwicklung gekoppelt^{80,81}. Als wichtiger Prozess der sekundären Septierung übernimmt die Angiogenese gewissermaßen eine Treiberfunktion für Lungenwachstum und Alveolenbildung^{80,82}. Bei der BPD ist die vaskuläre Entwicklung hochgradig gestört^{41,81,83}. Es finden sich Beeinträchtigungen in Signalwegen wichtiger Angiogenesefaktoren, insbesondere des essenziellen VEGF^{81,83}. VEGF wirkt als Mitogen und Überlebensfaktor für Endothelzellen und damit proangiogenetisch⁸⁴. Neben der Neubildung steuert VEGF zudem den Umbau von Blutgefäßen⁸⁴.

Histologisches Korrelat der gestörten vaskulären Entwicklung bei der BPD ist eine Reduktion der pulmonalen Kapillaren und interazinären Arterien⁸². Zusätzlich zu diesem quantitativen Aspekt liegen strukturelle Veränderungen der Gefäße vor. Neben einer insgesamt abnormen

Gefäßmorphologie ist hier insbesondere eine Proliferation glatter Muskelzellen sowie die Zunahme von Fibroblasten bzw. Myofibroblasten in der Media kleiner pulmonaler Arterien und Arteriolen auffällig ⁸². Funktionell hat dies einen erhöhten Gefäßwiderstand und eine herabgesetzte vaskuläre Compliance zur Folge, was die Entstehung einer pulmonalen Hypertonie im Laufe des Lebens begünstigen kann ⁸².

Umbau der extrazellulären Matrix (EZM):

Obwohl bei der „neuen“ im Vergleich zur „klassischen“ BPD alveoläre und vaskuläre Simplifizierung gegenüber der Fibroproliferation in den Vordergrund rücken (vgl. 2.3.1), bleiben Veränderungen der EZM ein Kernaspekt der Erkrankung ^{41,75}. In der Lunge setzt sich das dreidimensionale Faserwerk der EZM hauptsächlich aus verschiedenen Kollagenen und Elastin zusammen ^{85,86}. Die EZM ist aber nicht allein als mechanisches Gerüst zu verstehen, sondern als dynamisches Element mit vielfältigen biologischen Funktionen. So sind Zell-Matrix-Interaktionen unerlässlich für die Steuerung des normalen Lungenwachstums ⁸⁶⁻⁸⁸. Wie schon bei der Vaskularisation ist daher auch bei Pathologien der EZM der negative Effekt auf die fortlaufende Alveolarisierung zu berücksichtigen.

Die „neue“ BPD ist geprägt durch dysregulierte Kollagenablagerungen mit der Folge einer diffusen interstitiellen Fibrose und einer Verdickung der alveolären Septen ^{40,77,86}. Hinzu kommt eine abnorme Organisation der elastischen Fasern mit einer Vermehrung des subepithelialen elastischen Gewebes ^{77,86,87}. Die gestörte Architektur wirkt sich in Kombination mit dem insgesamt erhöhten Kollagen/Elastin-Quotienten negativ auf die Compliance der Lunge aus ^{86,89}.

Für die Alterationen der EZM ist unter anderem ein Ungleichgewicht von Proteasen (z.B. der Matrix-Metalloproteinasen/MMPs) und Protease-Inhibitoren verantwortlich ⁸⁶. Zudem sind verschiedene profibrotische Signalwege aktiviert ^{19,90,91}. Weiterhin finden sich bei der BPD Veränderungen der pulmonalen Fibroblastenpopulation ⁹². Fibroblasten sind eine heterogene Gruppe interstitiell bzw. perivaskulär lokalisierter mesenchymaler Zellen, die je nach Differenzierung unterschiedlichste Funktionen übernehmen können ⁹³. Lipofibroblasten z.B. erhalten die Homöostase der ATII-Zellen und tragen zur Surfactant-Synthese bei ⁹³⁻⁹⁵. Myofibroblasten hingegen synthetisieren Kollagen und werden mit Fibrose in Verbindung gebracht ^{96,97}. Bei der BPD ist eine Akkumulation ebendieser profibrotischen Myofibroblasten zu beobachten ^{92,98}.

Dysregulierte Wachstumsfaktorsignalwege:

Wachstumsfaktoren steuern als endogene Signalmoleküle Organentwicklung, Gewebeneubildung, Regeneration und Wundheilung^{99,100}. Bei der BPD, die durch eine Unterbrechung des physiologischen Lungenwachstums charakterisiert ist, sind Signalwege wichtiger Wachstumsfaktoren verändert^{32,75,100}.

Neben VEGF (s.o.) betrifft das gestörte Wachstumsfaktor-*signaling* insbesondere den *transforming growth factor β* (TGF-β)^{19,90,91,101}. Die verschiedenen TGF-β-Subtypen sind essenziell für die physiologische Lungenentwicklung und können konzentrationsabhängig profibrotisch, proinflammatorisch und proapoptotisch wirken^{91,102,103}. Sowohl im Tiermodell der Hyperoxie-induzierten Lungenschädigung als auch im Trachealspirat von BPD-Patienten ist die TGF-β-Expression erhöht^{19,90,91}.

Weiterhin ist bei der BPD der Signalweg des *platelet derived growth factor* (PDGF) runterreguliert^{104,105}. PDGF steuert die Migration von Myofibroblasten und die gezielte Ablagerung von Elastin im Bereich der designierten Sekundärsepten^{104,106}. Somit ist ein ungestörter PDGF-Signalweg Voraussetzung für eine regelrechte Alveologenese und Lungenentwicklung^{104,106}.

Nicht weniger bedeutsam für die pulmonale Entwicklung ist der *fibroblast growth factor* (FGF), der Proliferation, Differenzierung und Migration von Fibroblasten reguliert und zudem die Angiogenese in der Lunge fördert¹⁰⁷. Auch der FGF-Signalweg ist bei der BPD dysreguliert¹⁰⁷.

Gesteigerte Apoptose:

Das gestörte Lungenwachstum bei der BPD geht auch auf eine verstärkte Apoptose zurück^{32,108}. Diese ist multifaktoriell bedingt. Sauerstofftoxizität, mechanische Beatmung, Entzündung, Strukturstörungen der EZM und dysregulierte Wachstumsfaktorsignalwege (u.a. TGF-β) wurden als proapoptotische Reize bei der BPD identifiziert^{19,108-111}. Insbesondere ATII-Zellen sind von der gesteigerten Apoptose betroffen und in ihrer Homöostase gestört^{56,109,110,112,113}.

Pulmonale Inflammation:

Neben den genannten Aspekten nimmt eine pulmonale Entzündungsreaktion eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie der BPD ein^{34,37,112}. In den Lungen erkrankter Kinder manifestiert sie sich durch die Einwanderung und Aktivierung von Entzündungszellen sowie

die resultierende Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren ¹¹². Es folgen schädigende Effekte, die die physiologische Lungenentwicklung beeinträchtigen. Bisher ist die pulmonale Inflammation bei der BPD in ihren genauen biologischen Mechanismen noch unzureichend verstanden. Sie soll im Fokus dieser Arbeit stehen und wird daher in einem eigenen Abschnitt ausführlich charakterisiert und im Hinblick auf die Forschungsfrage eingeordnet (vgl. 2.4).

Wichtige Aspekte der Pathophysiologie sowie der Ätiologie der BPD werden in Abbildung 4 zusammengefasst.

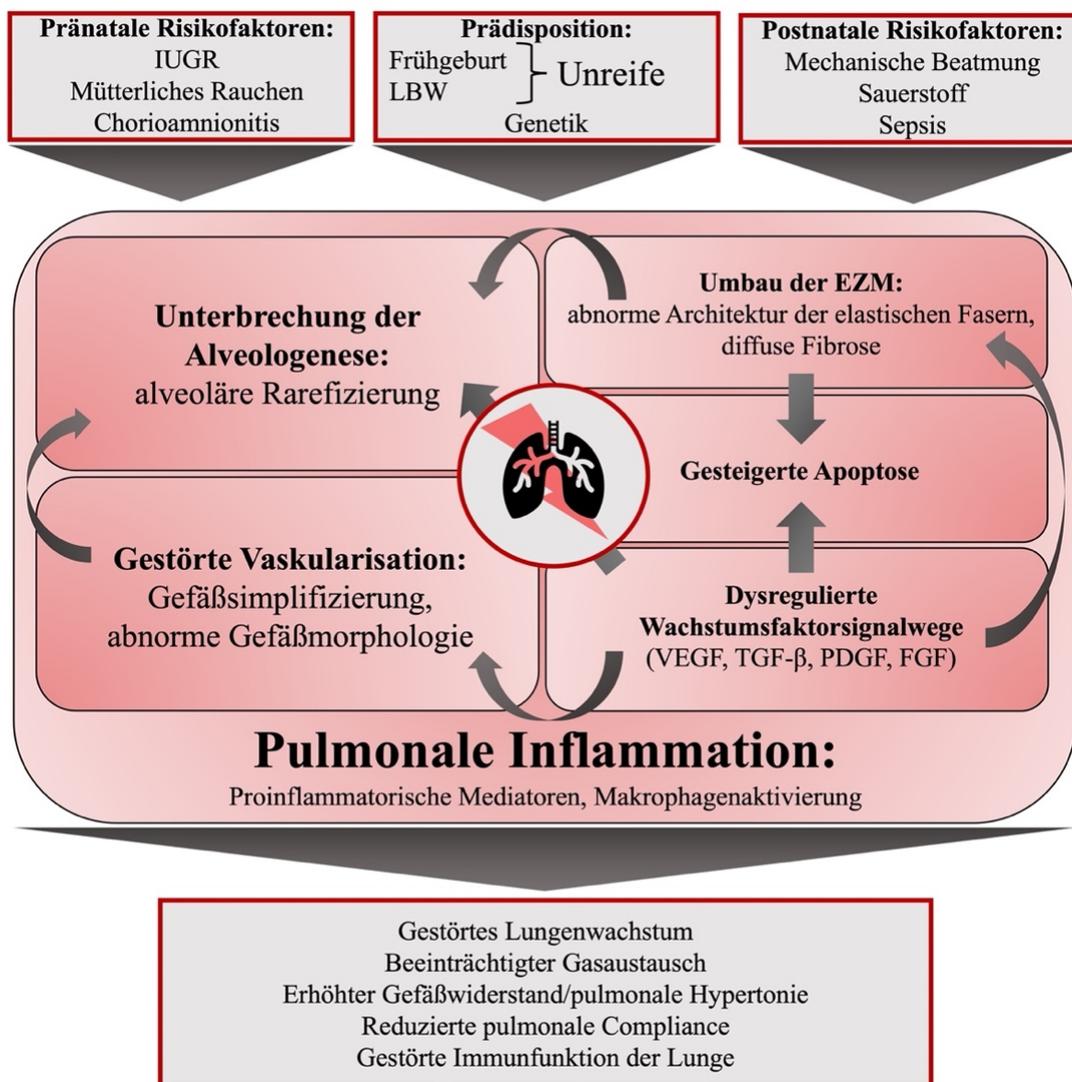


Abbildung 4: Zusammenfassung von Ätiologie und Pathophysiologie der bronchopulmonalen Dysplasie. Abkürzungen: IUGR = *intrauterine growth restriction*, LBW = *low birth weight*, EZM = *extrazelluläre Matrix*, VEGF = *vascular endothelial growth factor*, TGF- β = *transforming growth factor β* , PDGF = *platelet derived growth factor*, FGF = *fibroblast growth factor*. [Modifiziert nach: Hilgendorff A, O'Reilly MA. Bronchopulmonary dysplasia early changes leading to long-term consequences. *Front Med (Lausanne)* 2015; 2: 2.]

2.3.5 Klinisches Bild der bronchopulmonalen Dysplasie

Die BPD manifestiert sich klinisch durch Einschränkungen der pulmonalen und kardiovaskulären Funktion, die häufig bis ins Erwachsenenalter nachweisbar sind^{21,114,115}. Da der Fokus der Arbeit auf der Pathophysiologie liegt, wird die klinische Präsentation der BPD nur kurz dargestellt.

Bei der BPD kommt es zu einem beeinträchtigten Gasaustausch⁷⁸. Ursachen hierfür sind die oben beschriebene alveolo-kapilläre Hypoplasie, die Verdickung der interalveolären Septen und ein ungünstiges Ventilations-Perfusions-Verhältnis (vgl. 2.3.4)¹¹⁶. Der gestörte Gasaustausch hat eine Hypoxämie und Hyperkapnie zur Folge und äußert sich bei betroffenen Neugeborenen in Form klinischer Dyspnoezeichen^{75,116}. Atemfrequenz und -minutenvolumen sind erhöht, sodass in Kombination mit der reduzierten Compliance der Lunge eine erheblich gesteigerte Atemarbeit geleistet werden muss^{75,116}. Schwer betroffene Kinder sind häufig lange auf eine Sauerstofftherapie angewiesen, teilweise sogar über das zweite Lebensjahr hinaus¹¹⁷. Weiterhin prägt eine variabel ausgeprägte Atemwegsobstruktion das klinische Bild der BPD¹¹⁸. Gründe für die Obstruktion können ein interstitielles Lungenödem aufgrund einer erhöhten vaskulären Permeabilität und eine bronchiale Hyperreagibilität sein¹¹⁸. Teilweise werden bei BPD-Patienten anfallsartige obstruktive Episoden mit Zyanose beobachtet⁷⁵. Klinisch relevant ist auch der erhöhte pulmonale Gefäßwiderstand bei der BPD (vgl. 2.3.4). Es kann zu pulmonaler Hypertonie und in schweren Fällen zur Ausbildung eines Cor pulmonale kommen, was mit einer erheblichen Mortalität verbunden ist^{75,119}.

Glücklicherweise kommt es nach der Neonatalperiode in den meisten Fällen zu einer langsamen Besserung der Lungenfunktion^{28,119}. Nur sehr selten ist eine Sauerstoffsupplementation nach dem zweiten Lebensjahr notwendig¹¹⁷. Die Patienten, die die kritische Frühphase der Erkrankung überleben, sind im Schul- und Erwachsenenalter meist leistungsfähig und in ihren Aktivitäten nur wenig eingeschränkt^{28,119}. Nachweisbar bleiben die Auswirkungen der BPD i.d.R. aber noch lange^{119,120}. Z.B. können in der Lungenfunktionsuntersuchung häufig bis zur Adoleszenz und darüber hinaus *air trapping* und eine Limitation des Atemflusses nachgewiesen werden¹¹⁵. Auch klinisch apparente, Asthma-ähnliche Phänotypen und eine anhaltend reduzierte Leistungsfähigkeit kommen vor¹¹⁵. Zudem ist vor allem in den ersten Lebensjahren die (Re-)Hospitalisierungsrate bei BPD-Patienten erhöht¹²¹. Die pulmonale Reserve ist gering, sodass Atemwegsinfektionen, insbesondere mit RSV, oft schwer verlaufen¹²¹. Neben den genannten respiratorischen Aspekten ist die BPD auch mit einer beeinträchtigten neurokognitiven Entwicklung assoziiert, die sich in Einschränkungen des Spracherwerbs, der Motorik oder des Intelligenzquotienten äußern kann^{122,123}.

Es gilt zu berücksichtigen, dass die Erkenntnisse über die Langzeitfolgen der BPD sich zu großen Teilen auf die „alte“ BPD beziehen, während für die „neue“ Form verlässliche Langzeitdaten bisher fehlen ¹¹⁹.

2.3.6 Präventive und therapeutische Optionen bei bronchopulmonaler Dysplasie

Da die Therapieoptionen bei der BPD sehr limitiert sind, liegt ein besonderes Augenmerk auf der Prävention der Erkrankung. Viele der hierfür relevanten Maßnahmen ergeben sich aus den Risikofaktoren und wurden zum Teil bereits angesprochen (vgl. 0).

Da eine Beatmungstherapie das Risiko für eine BPD erhöht (vgl. 0), kommt der Vorbeugung eines IRDS und der Vermeidung einer mechanischen Ventilation ein großer Stellenwert in der Prävention der Erkrankung zu. Bei drohender Frühgeburt kann eine frühzeitige GK-Gabe an die Schwangere (Betamethason oder Dexamethason min. 24 h vor der Geburt) das Risiko für ein IRDS und eine Beatmungstherapie senken und auch die neonatale Gesamtmortalität reduzieren ¹⁵. Ob durch die Lungenreifeinduktion mit GK auch die BPD-Rate gesenkt wird, ist allerdings noch nicht eindeutig geklärt ^{15,28}.

Teilweise lässt sich ein IRDS nicht verhindern. Eine frühestmögliche Surfactant-Gabe ist dann entscheidend, um das BPD-Risiko zu minimieren ¹²⁴. Standard war hierbei lange Zeit die Surfactant-Applikation via Endotrachealtubus bei gleichzeitiger mechanischer Beatmung ¹²⁵. Mit der LISA wurde in Köln in den 2000er-Jahren ein schonenderes Verfahren entwickelt, bei dem Surfactant über eine dünne Kanüle dem spontan atmenden, lediglich mittels nasalem CPAP unterstützten Kind verabreicht wird ¹²⁶. Die Methode erfordert weder maschinelle Beatmung noch Analgesie oder Sedation und kann die kindliche Mortalität senken ¹²⁶.

In Bezug auf die mechanische Ventilation empfiehlt die BPD-Leitlinie eine insgesamt restriktive Indikationsstellung und die Bevorzugung einer frühzeitigen nasalen CPAP-Therapie ²⁸. Ist eine invasive Beatmung nicht zu vermeiden, können lungenprotektive Einstellungen das Risiko für eine BPD senken ¹²⁷. Eine volumenkontrollierte Beatmung unter Verwendung niedriger Hubvolumina und eines PEEP (*positive end-expiratory pressure*) hat sich als besonders schonend erwiesen ¹²⁷.

GK kommen in der Prophylaxe der BPD nicht nur pränatal zur Lungenreifeinduktion, sondern auch postnatal zum Einsatz. Es wird angenommen, dass postnatale GK die Lungenfunktion durch eine Hemmung der pulmonalen Inflammation und eine Reduktion der Gefäßpermeabilität günstig beeinflussen ²⁸. Durch die systemische Gabe von Dexamethason innerhalb der ersten beiden Lebenswochen kann die BPD-Rate gesenkt und die Rate erfolgreicher Extubationen erhöht werden ^{128,129}. Schwerwiegende Nebenwirkungen wie

Hyperglykämie, Hypertonie oder gastrointestinale Perforationen limitieren den systemischen Einsatz von GK^{28,128,129}. Der Nutzen inhalativer GK als nebenwirkungsarme Alternative ist noch umstritten^{28,130,131}.

Bei ELBW-Kindern kann die BPD-Inzidenz darüber hinaus durch eine Verabreichung von Koffein innerhalb der ersten Lebenstage sowie durch intramuskuläre Vitamin-A-Injektionen gesenkt werden^{132,133}.

Eine generelle Empfehlung zum medikamentösen oder interventionellen PDA-Verschluss spricht die Leitlinie nicht aus, da der positive Einfluss auf die Inzidenz der BPD als nicht hinreichend gesichert gilt^{28,134}.

Hat sich die BPD einmal manifestiert, sind die Behandlungsoptionen auf symptomatische Therapien und Maßnahmen zur Vermeidung von Komplikationen beschränkt. Eine wichtige Therapiesäule ist die Sauerstofftherapie²⁸. Zwar ist Sauerstoff selbst ein wichtiger Faktor in der Krankheitsentstehung (vgl. 0), jedoch macht eine Hypoxämie aufgrund des beeinträchtigten Gasaustauschs die Sauerstoffgabe häufig erforderlich²⁸. Teilweise muss auch eine längerfristige Heim-Sauerstofftherapie erfolgen¹³⁵. Die Sauerstoffsupplementation hat die Vermeidung einer pulmonalen Hypertension aufgrund einer hypoxischen Vasokonstriktion und die Sicherstellung eines normalen somatischen Wachstums zum Ziel²⁸. Zur Gewährleistung einer adäquaten postnatalen Gewichtszunahme ist auch eine hochkalorische Diät empfohlen, durch die der erhöhte Kalorienbedarf der BPD-Patienten angesichts der gesteigerten Atemarbeit kompensiert werden soll²⁸.

Als symptomatische Maßnahmen können leitliniengerecht weiterhin Diuretika bei Vorliegen eines Lungenödems sowie Bronchodilatoren bei obstruktiver Symptomatik eingesetzt werden²⁸. Nebenwirkungen der medikamentösen Therapie müssen natürlich berücksichtigt werden^{28,136}. Tritt eine pulmonale Hypertonie als Komplikation der BPD auf, muss diese fachgerecht behandelt werden²⁸.

Eine Heilung der BPD ist mit den aufgezählten Therapieoptionen nicht möglich. Zwar gibt es vielversprechende neue therapeutische Ansätze wie z.B. die Anwendung von Elastase-Inhibitoren zur Verbesserung der Alveolenbildung oder eine Therapie mit mesenchymalen Stammzellen, diese befinden sich allerdings noch im experimentellen Stadium^{90,136,137}. Neue zielgerichtete Behandlungen müssen entwickelt werden, um in Zukunft der hohen Morbidität, die durch die BPD verursacht wird, zu begegnen. Um gezielt auf die pathophysiologischen Prozesse Einfluss nehmen zu können, ist ein besseres Verständnis der Pathogenese vonnöten.

2.4 Entzündung – Ein Schlüsselmechanismus in der Pathogenese der bronchopulmonalen Dysplasie

Entzündung kann vereinfacht als Reaktion des Organismus auf eine Infektion oder Gewebeschädigung definiert werden ¹³⁸. Maßgeblich beteiligt an dieser Reaktion sind Entzündungszellen, bei denen es sich hauptsächlich um rekrutierte Blutzellen und gewebsständige Immunzellen handelt ¹³⁸. Darüber hinaus sind bei Entzündungen verschiedene lösliche Faktoren wie das Komplementsystem, Zytokine oder Immunglobuline involviert ¹³⁸.

Inflammation ist ein immens wichtiger Faktor in der Entstehung diverser Krankheiten ¹³⁸. Was häufig vernachlässigt wird, ist die Bedeutung von Entzündungsprozessen für physiologische Vorgänge wie Wundheilung und Organentwicklung ^{138,139}. Untersuchungen der murinen Lunge zeigen, dass in den unterschiedlichen Phasen der Lungenentwicklung jeweils andere Immunzellpopulationen dominieren ¹³⁹. Dies deutet darauf hin, dass Entzündungszellen und ihr genau abgestimmtes Zusammenspiel Grundlage für eine normale pulmonale Entwicklung sind ¹³⁹. Während die späte embryonale Phase durch spezialisierte Makrophagen gekennzeichnet ist, sind postnatal dendritische Zellen, Granulozyten, Lymphozyten und neue, heterogene Makrophagensubtypen in der Lunge vorzufinden ¹³⁹. Letztere steuern Gewebeumbau und Angiogenese und gelten daher als besonders wichtig für die reguläre Lungenentwicklung ¹³⁹.

Die potenziell schädigenden Auswirkungen von Inflammation werden am Beispiel der BPD ersichtlich. Es ist unumstritten, dass Entzündungsprozesse von übergeordneter Bedeutung für die Pathogenese der BPD sind ^{23,75,100,112,140}. Der schützende Effekt inflammationshemmender Interventionen im Tiermodell unterstreicht die pathophysiologische Schlüsselrolle ¹⁴¹⁻¹⁴³. Die bei der BPD beobachtete pulmonale Inflammation wird durch verschiedene infektiöse und nichtinfektiöse Noxen bzw. Risikofaktoren hervorgerufen ¹⁴⁴. Teilweise wird die lungenschädigende Wirkung dieser Noxen auch erst durch die induzierte Entzündung vermittelt. Wichtige nichtinfektiöse Treiber der Inflammation sind Hyperoxie und mechanische Beatmung ^{56,67,70,71}. Infektiös verursachte Zustände, die mit einer pulmonalen Entzündung einhergehen, sind Pneumonie und Neugeborenenensepsis (vgl. 0) ^{32,56,74,145}.

Die Einwirkung der Noxen hat eine pulmonale Freisetzung entzündungsfördernder Zytokine und anderer Signalmoleküle aus Alveolarmakrophagen (AM), AEC, Fibroblasten und Endothelzellen zur Folge ¹¹². Hierzu passt, dass erhöhte Konzentrationen verschiedener proinflammatorischer Mediatoren im respiratorischen Sekret Neugeborener mit der Erkrankung an BPD assoziiert sind ¹⁴⁶⁻¹⁴⁹. Gezeigt wurde dieser Zusammenhang unter anderem für Interleukin (IL)-1, IL-6, IL-8 sowie für *C-X-C motif chemokine ligand* (CXCL) 10

(vgl. 2.4.2) ¹⁴⁶⁻¹⁴⁹. Entzündungshemmende Zytokine zeigen sich bei der BPD hingegen vermindert ⁴¹. Das entstehende Ungleichgewicht pro- und antiinflammatorischer Stimuli mündet in einer dysregulierten und anhaltenden Entzündungsreaktion, welche die Lunge schädigt und ihr Wachstum hemmt ⁴¹.

Teilweise können die proinflammatorischen Zytokine die Lunge durch Apoptoseinduktion direkt schädigen, so z.B. der Tumor-Nekrosefaktor α (TNF- α) ¹¹². Einen Großteil ihrer entzündungsfördernden Wirkung entfalten sie jedoch über Chemotaxis, d.h. indem sie die Einwanderung von Entzündungszellen fördern ^{112,145}. Für die BPD wurden bereits zahlreiche relevante chemotaktische Faktoren identifiziert, z.B. IL-8 ^{147,150}. Aufgrund seiner chemotaktischen Potenz und hohen Expression in der BPD gerät neuerdings CXCL10 vermehrt in den Fokus (vgl. 2.4.2) ¹⁵⁰.

Die prädominanten Entzündungszellen bei der BPD-assoziierten Inflammation sind neutrophile Granulozyten (NGZ) und Makrophagen ^{112,151}. Der Influx von NGZ in die Atemwege kennzeichnet vor allem die Frühphase des Entzündungsgeschehens und beginnt beinahe unmittelbar nach dem Einsetzen der Noxe (z.B. der mechanischen Beatmung) ^{145,152}. Durch die Bildung von ROS und die Freisetzung von Proteasen, z.B. Elastase und Kollagenase, greifen NGZ das Gewebe an und tragen so zur inflammatorischen Lungenschädigung bei ^{144,153}.

Für die Pathophysiologie der BPD noch bedeutender als die NGZ scheinen die Makrophagen zu sein ^{145,151}. Ihre stark gesteigerte Aktivierung und Migration in die Lunge folgt mit kurzer Verzögerung auf die Einwanderung der NGZ ¹⁴⁵. Während die NGZ-Zahl wieder abnimmt, bleibt eine massive Vermehrung intrapulmonaler Makrophagen während der gesamten BPD-assoziierten Inflammation nachweisbar ¹⁴⁵. Dies deutet darauf hin, dass die Makrophagen die pulmonale Entzündung bei der BPD maßgeblich aufrechterhalten und antreiben ^{145,151}.

2.4.1 Die Rolle der Makrophagen in der pulmonalen Inflammation bei der bronchopulmonalen Dysplasie

Makrophagen gehören dem mononukleären-phagozytären System an ^{154,155}. Sie sind ein wichtiger Bestandteil des Immunsystems und vielseitige Akteure in den verschiedensten Entzündungsprozessen. Ihre Aufgaben umfassen die Abwehr und Phagozytose von pathogenen Mikroorganismen sowie die Degradation von Zelltrümmern und Tumorzellen ^{154,156}. Darüber hinaus üben sie eine essenzielle koordinierende Funktion aus, indem sie sowohl mit Zellen des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems interagieren ^{154,156}. Auch bei wichtigen Entwicklungsprozessen spielen Makrophagen eine Rolle; z.B. sind sie an

der Blutgefäß-, Knochen und Lungenentwicklung beteiligt (s.o.)^{139,156,157}. In der Lunge können aus dem Dottersack abstammende, ortsständige Makrophagen von solchen aus der myeloischen Zelllinie abgegrenzt werden, die im Rahmen von pathologischen Prozessen verstärkt aus der Blutbahn rekrutiert werden¹⁵⁷.

Angeregt durch verschiedene Zytokine und das sie umgebende Milieu durchlaufen Makrophagen eine Polarisierung und können dann spezifische Effektorfunktionen übernehmen^{154,156,158}. Lange wurde hierbei in Analogie zum T-Helfer-Zell-System ein streng dichotomes Modell vertreten, das in Abhängigkeit vom Aktivierungsweg M1- und M2-Makrophagen unterschied^{158,159}. Diesem Konzept zufolge sind M1-Makrophagen auf Pathogen- und Tumorabwehr spezialisiert und setzen proinflammatorische Zytokine frei, während M2-Zellen unter anderem zur Regeneration und zum Umbau des Gewebes beitragen und modulierend auf die Entzündung einwirken¹⁵⁸. Die strikte Dichotomie dieser Theorie gilt inzwischen als überholt; d.h. Phänotypen und Aktivierungswege der Makrophagen sind in der Realität deutlich heterogener¹⁵⁹. Aus Gründen der Einfachheit und Verständlichkeit sollen die Bezeichnungen M1 und M2 für die folgenden Ausführungen nicht komplett verworfen werden. Stattdessen soll von M1- und M2-ähnlichen Makrophagen gesprochen werden, wohlwissend, dass hierunter jeweils verschiedene vielfältige Subtypen subsummiert werden.

Wie oben dargestellt ist die BPD-assoziierte Entzündung durch eine starke Akkumulation von Makrophagen gekennzeichnet^{145,151}. Teilweise sind die Mechanismen, durch die die Makrophagen das Entzündungsgeschehen bei der BPD beeinflussen, schon bekannt. Durch die Sekretion von Zytokinen wie IL-1, IL-6 und TNF- α erzeugen sie ein proinflammatorisches Milieu¹⁴⁵. Ihr Sekretom lockt weitere Entzündungszellen an und stört die Homöostase der AEC¹⁴³. Zudem sind sie wie NGZ in der Lage, das Gewebe durch Proteasen und ROS anzugreifen¹⁴⁵. Die genaue pathophysiologische Rolle der Makrophagen in der BPD ist mutmaßlich aber deutlich komplexer und noch zu großen Teilen unklar.

Eine Vorarbeit unserer Arbeitsgruppe (Hirani et al.) hat daher die Bedeutung der Entzündung und die Rolle der Makrophagen in der BPD untersucht¹⁴³. Hierbei konnte in der experimentellen BPD durch Transkriptomanalyse mithilfe eines *in-silico*-Verfahrens eine M1-ähnliche Makrophagensignatur nachgewiesen werden, die auch *in vivo* bestätigt wurde¹⁴³. Durch eine auf der *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) basierende Signalweganalyse wurden zudem die zehn meistregulierten Signalwege in der BPD identifiziert¹⁴³. Das Interaktom der differentiell regulierten Gene, die in diesen Signalwegen repräsentiert sind, zeigt, dass bei der BPD vor allem inflammatorische Signalwege reguliert sind und unterstreicht somit erneut den Stellenwert der Entzündung für die Pathogenese der Erkrankung¹⁴³. Mithilfe funktioneller Netzwerke wurden weiterhin die wichtigsten

Knotenpunkte in diesen Signalwegen ermittelt¹⁴³. Fast alle der zentralen differentiell regulierten Gene sind Chemokine, die mit der Makrophagenfunktion in Verbindung stehen¹⁴³. Eines dieser Gene ist *Cxcl10*¹⁴³.

2.4.2 C-X-C motif chemokine ligand 10

CXCL10, auch bekannt als *interferon- γ inducible protein 10* (IP-10), zählt zu den Chemokinen¹⁶⁰. Die Chemokine sind eine Gruppe strukturell verwandter Signalmoleküle mit niedrigem Molekulargewicht (ca. 8-14 kDa), die ihre Effekte über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermitteln¹⁶¹. Chemokine wirken auf viele verschiedene Körperzellen ein und sind an diversen biologischen Prozessen beteiligt¹⁶¹⁻¹⁶⁴. Die Hauptwirkung der Chemokine liegt in der Induktion der Immunzellmigration¹⁶¹. Damit haben sie eine wichtige Funktion in der Steuerung von Immunsystem und Entzündungsprozessen inne¹⁶¹. Wie oben dargestellt sind Chemokin-Signalkaskaden die am stärksten regulierten Signalwege in der experimentellen BPD¹⁴³.

CXCL10 wird durch das gleichnamige Gen kodiert¹⁶⁰. Seine Expression ist stark induzierbar¹⁶⁵. Der wichtigste Induktor von CXCL10 ist Interferon- γ (IFN- γ)^{160,165}. Zusätzlich zu dieser induzierbaren Expression wird CXCL10 in verschiedenen Geweben auch konstitutiv exprimiert¹⁶⁵. Gebildet und sezerniert wird CXCL10 durch Makrophagen und viele andere Zelltypen¹⁶⁶. Als Ligand des membranständigen CXCR3-Rezeptors vermittelt es eine Vielzahl unterschiedlicher Effekte, von denen viele noch unbekannt sind^{160,165}. Zwei erforschte Effekte sind besonders hervorzuheben:

- **Proinflammatorisch:** CXCL10 wirkt chemotaktisch auf verschiedene Entzündungszellen¹⁶⁵. Neben T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen werden insbesondere Makrophagen bzw. Monozyten via CXCL10 rekrutiert¹⁶⁵. Hierbei wird speziell die Chemotaxis der proinflammatorischen, M1-ähnlichen Makrophagen gefördert, die sich auch vermehrt bei der BPD-assoziierten Entzündung finden^{143,165,167}.
- **Angiostatisch:** Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* konnte gezeigt werden, dass CXCL10 die Angiogenese hemmt^{168,169}. Mechanistisch wird eine gestörte Chemotaxis von Endothelzellen als Ursache für die gehemmte Neovaskularisation vermutet¹⁷⁰.

Für CXCL10 wird entsprechend seines bekannten biologischen Wirkprofils eine Schlüsselrolle in verschiedenen Erkrankungen angenommen, die durch eine starke Entzündungszellmigration und/oder eine gehemmte Angiogenese charakterisiert sind. COPD und Präeklampsie sowie Autoimmunkrankheiten wie Diabetes mellitus Typ 1 oder die Hashimoto-Thyreoiditis sind nur einige von vielen Beispielen^{163,164,171}. Auch für die BPD, bei

der Inflammation und gestörte Angiogenese zu den wichtigsten Pathomechanismen zählen (vgl. 2.3.4), kann eine Mitwirkung von CXCL10 an der Krankheitsentstehung vermutet werden. Stark untermauert wird diese Annahme durch Messungen der CXCL10-Level im Trachealspirat und Serum Frühgeborener. Bei Kindern mit BPD ist die Expression von CXCL10 deutlich erhöht ^{149,172}. Die erhöhte Expression ist auch im Tiermodell der Hyperoxie-induzierten Lungenschädigung nachweisbar ¹⁷³. Die oben aufgeführte Signalweganalyse von Hirani et al. hebt die Schlüsselrolle von CXCL10 weiter hervor ¹⁴³. Während CXCL10 schon jetzt als Biomarker für die BPD genutzt werden kann, ist das Verständnis seiner genauen funktionellen Rolle in der Erkrankung aber noch unzureichend ^{149,172}. Auch die physiologischen Wirkungen von CXCL10 müssen noch weiter erforscht werden, um seine biologische Bedeutung ganzheitlich und auch abseits von Krankheitsprozessen zu verstehen. Ein besseres, umfassenderes Verständnis der funktionellen Rolle von CXCL10 soll helfen, zielgerichtete Therapien für die BPD zu entwickeln.

2.5 Fragestellung der Arbeit

Eine gestörte alveolo-kapilläre Entwicklung, ein Remodeling der EZM und eine gesteigerte Apoptose kennzeichnen die BPD (vgl. 2.3.4) ^{32,75}. Maßgeblicher Pathomechanismus der Erkrankung ist eine pulmonale Entzündungsreaktion, die vor allem durch die Einwanderung und Aktivierung von Makrophagen gekennzeichnet ist (vgl. 2.4) ^{112,145,151}. In Trachealaspiraten von BPD-Patienten sowie im Tiermodell der Hyperoxie-induzierten Lungenerkrankung zeigt sich eine verstärkte Expression des proinflammatorischen CXCL10 ^{149,172,173}. Dieses hat einen ausgeprägten chemotaktischen Effekt auf Makrophagen und wirkt außerdem angiostatisch (vgl. 2.4.2) ^{165,168,169}.

Hieraus ergibt sich für die vorliegende Arbeit folgende Hypothese:

CXCL10 trägt durch eine Förderung der Inflammation und eine Hemmung der Angiogenese zur Hyperoxie-induzierten Lungenerkrankung der neugeborenen Maus als Modell der BPD bei. Eine Defizienz von CXCL10 wirkt sich positiv auf den Phänotyp aus.

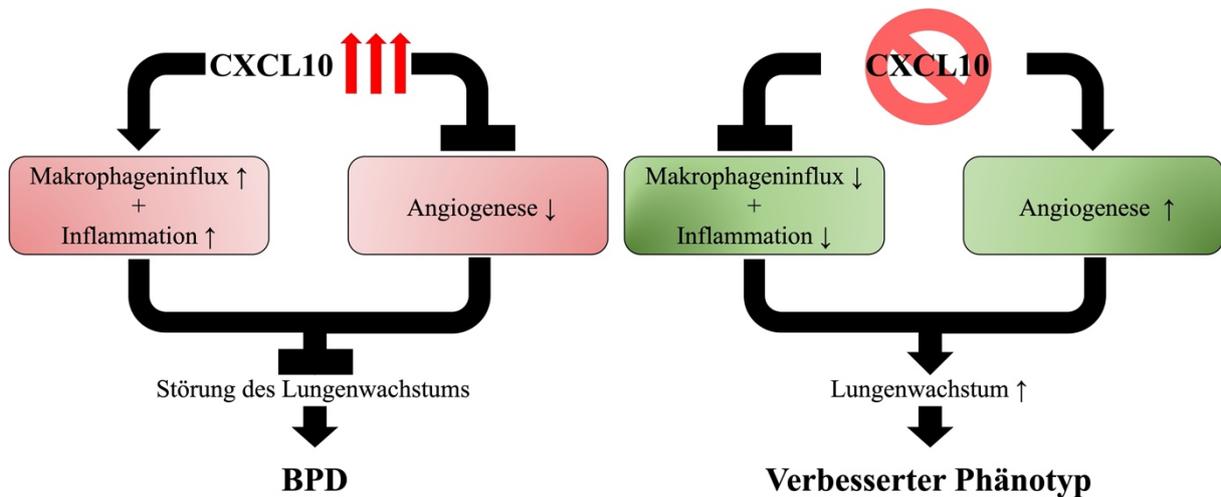


Abbildung 5: Hypothese zur funktionellen Rolle von CXCL10. Links: vermutete Effekte von CXCL10 in der Pathogenese der bronchopulmonalen Dysplasie (BPD) bzw. der Hyperoxie-induzierten Lungenerkrankung der neugeborenen Maus. Rechts: hypothetischer protektiver Effekt einer CXCL10-Defizienz.

Zur Überprüfung der Hypothese wird das murine BPD-Modell der Hyperoxie-induzierten Lungenerkrankung herangezogen ¹⁷⁴. Um gezielt die Auswirkungen einer CXCL10-Defizienz zu untersuchen, werden im Tiermodell Wildtyp-Mäuse und *Cxcl10*-Knockout-Mäuse gegenübergestellt (vgl. 3.2.2).

Zuerst soll die Phase der akuten Lungenschädigung durch die Hyperoxie betrachtet werden (entspricht P14, vgl. Abbildung 6), um in Hinblick auf die Hypothese folgende Forschungsfragen zu beantworten:

- 1) Schützt die CXCL10-Defizienz während der Schädigung durch die Hyperoxie vor einer Störung des alveolären Wachstums, des Zellüberlebens und der Angiogenese?
- 2) Wirkt sich das Fehlen von CXCL10 positiv auf die EZM bzw. deren Umbau unter Hyperoxie aus?
- 3) Werden Makrophageninflux und -polarisierung bei Hyperoxie-Exposition durch den Verlust von CXCL10 modifiziert?

Obwohl der Schwerpunkt der Arbeit auf der funktionellen Rolle von CXCL10 während der Phase der akuten Lungenschädigung durch die Hyperoxie liegt, sollen sich auch Untersuchungen anschließen, die die Regenerationsphase nach beendeter Hyperoxie-Exposition betrachten (entspricht P28, vgl. Abbildung 6). Diese zweite Phase des Experiments hat zum Ziel, die Funktionen von CXCL10 ganzheitlicher zu erfassen, als es bei einer reinen Beschränkung auf die Rolle in der Pathogenese möglich wäre. Dabei soll die folgende Forschungsfrage adressiert werden:

- 4) Welchen Einfluss hat das Fehlen von CXCL10 auf das alveoläre Wachstum während der Regenerationsphase?

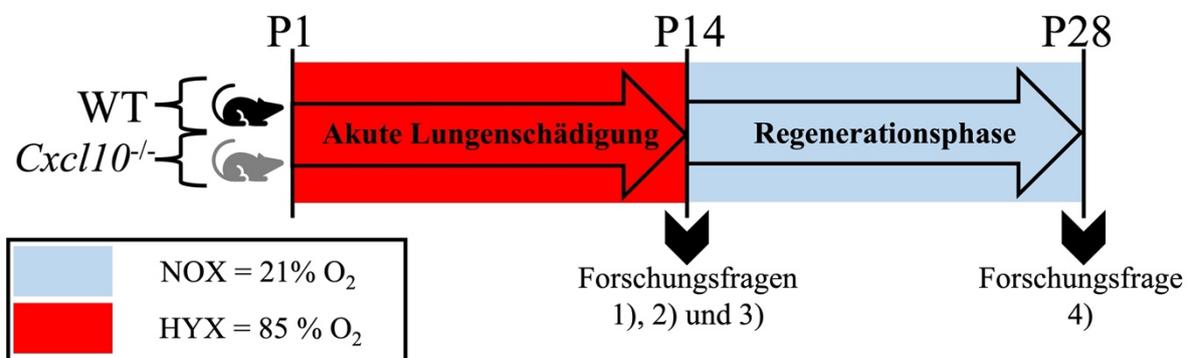


Abbildung 6: Schematische Darstellung des interventionellen Tiermodells zur Überprüfung der Forschungsfragen. P1 bis P14: Phase der akuten Lungenschädigung durch die Hyperoxie; P14 bis P28: Regenerationsphase in Normoxie nach beendeter Hyperoxie-Exposition; Kontrollgruppen nicht abgebildet, vgl. 3.2.2 für detaillierte Darstellung der Tierstudie. Abkürzungen: P1/14/28 = postnataler Tag 1/14/28; WT = Wildtyp; *Cxcl10*^{-/-} = *Cxcl10*-Knockout; NOX = Normoxie; HYX = Hyperoxie.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller
30% Acrylamid/Bisacrylamid-Mix (#3029.1)	Roth
4% Paraformaldehyd (PFA) (#P0873)	Roth
Agarose (#A9539-500G)	Sigma
APS (#A1142)	Appllichem
BRIJ® 35 Detergenz, 30% wässrige Lösung (#203724)	Calbiochem
Bromphenolblau (#A512.1)	Roth
BSA (#8076.3)	Roth
CaCl ₂ (#HN04.2)	Roth
CHAPS (#220201)	Calbiochem
Chloroform >99% (#3313.2)	Roth
Coomassie Brilliant Blue G (#B0770)	Sigma-Aldrich
Dako Antikörper-Verdünnungspuffer	Dako
Dako Target Retrieval Solution Citrate pH 6 (10X) (#S2369)	Dako
DAPI (#10236276001)	Roche
dNTP-Mix (10 mM each) (#R0193)	Thermo Fisher Scientific
EDTA Stop-Lösung 25 mM (#A263A)	Promega
Entellan® Neu (#1.07961)	Merck
Eosin G-Lösung 0,5% wässrig (#X883.2)	Roth
Essigsäure 100% (#3738)	Roth
EtOH) 70% (#2202.5000)	Chemsolute
EtOH vergällt >99.8% (#K928.4)	Roth
Fluoromount™ wässriges Mountin-Medium (#F4860)	Sigma-Aldrich
Gelatine aus Schweinehaut (#G2500)	Sigma-Aldrich
Glycerol (#G5516)	Sigma-Aldrich
Glycin (#3908.3)	Roth
GoTaq qPCR Master Mix 2X (#A6002)	Promega
Halt™ Protease-Inhibitor Cocktail (100X) (#78430)	Thermo Fisher Scientific
Hämalaunlösung sauer nach Mayer (#T865.2)	Roth
Harnstoff-Wasserstoffperoxid in Tablettenform (#7641.1)	Roth
Isopropanol >99,8% (#6752.4)	Roth
Methanol (#CP43.3)	Roth
Milchpulver, Blockierungsreagenz (#T145.3)	Roth
MMLV Reverse Transkriptase (#M170A)	Promega
MMLV-Puffer 5X (#M531A)	Promega

NaCl (#0962.1)	Roth
Neo-Clear® (#1.09843)	Merck
Neo-Mount® (#1.09016)	Merck
Oligo(dT)-Primer (16 T)	Eurofins/MWG
PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 bis 180 kDa (#26616)	Thermo Fisher Scientific
PBS (#L182-50)	Biochrom
Phosphormolybdänsäurelösung 0,2% (#PQA250)	ScyTek Laboratories, Inc.
Picro Sirius-Red-Lösung (#SRS500)	ScyTek Laboratories, Inc.
Platinum qPCR Supermix–UDG w/Rox (#11743500)	Invitrogen
Ponceau S (#5938.2)	Roth
Proteinase K >600 U/ml (#EO0491)	Thermo Fisher Scientific
Random-Primer (#11034731001)	Roche
Recombinant RNasin® RNase-Inhibitor (#N2511)	Promega
Resorcin-Fuchsin nach Weigert (#2E-030)	Waldeck
RQ1 DNase 10X Reaktionspuffer (#M198A)	Promega
RQ1 RNase-freie DNase (#M610A)	Promega
Salzsäure (HCl) (#T134.1)	Roth
SDS (#0183.3)	Roth
Sea Block Blockierungspuffer (#37527)	Thermo Fisher Scientific
Tartrazine-Lösung (#TZQ125)	ScyTek Laboratories, Inc.
TEMED (#2367.3)	Roth
TRI Reagenz (#T9424)	Sigma-Aldrich
Trichloressigsäure (#7437.1)	Roth
TRIS (#4855.3)	Roth
Triton® X 100 (#3051.2)	Roth
Tween 20 (#P1379)	Sigma-Aldrich
Wasser für Hochleistungschromatographie (LC-MS Grade)	Merck
LiChrosolv® (#1.15333)	
β-Mercaptoethanol (β-ME) (#4227.3)	Roth

3.1.2 Puffer und Stammlösungen

Lösung	Zusammensetzung
Antikörper-Verdünnungs-Puffer 1 (Immunoblot)	5% Milchpulver in TBST
Antikörper-Verdünnungs-Puffer 2 (Immunoblot)	5% BSA in TBST
Blockierungslösung (Immunoblot)	5% Milchpulver 2% BSA in TBST

CHAPS-Puffer zur Proteinisolation	50 mM Tris 20 mM CHAPS pH 7,5 1% Halt Protease-Inhibitor Cocktail (vor Nutzung)
Coomassie-Färbelösung (Zymographie)	40% Methanol 10% Essigsäure 0,5% Coomassie-Blau
DAPI-Stammlösung	0,1% DAPI in doppelt destilliertem Wasser
Entwicklungspuffer (10X) (Zymographie)	0,5 M Tris 2 M NaCl 50 mM CaCl ₂ 0,2% Brij 35
Ponceau-Färbelösung (Immunoblot)	0.2% Ponceau S 3% Trichloressigsäure
Renaturierungspuffer (10X) (Zymographie)	25% Triton X 100
SDS-PAGE Ladungspuffer (3,5X) (Zymographie)	7% SDS 0,005% Bromphenol-Blau 35% Glycerol 218 mM Tris
SDS-PAGE Ladungspuffer (5X) (Immunoblot)	10% SDS 0,005% Bromphenol-Blau 50% Glycerol 25% β-ME 625 mM Tris
SDS-PAGE Laemmli-Puffer (10X) (Immunoblot und Zymographie)	1,92 M Glycin 0,25 M Tris 10% SDS
SDS-PAGE Sammelgel (Immunoblot und Zymographie)	4% Acrylamid 0,1% APS 0,1% SDS 0,004% TEMED 160 mM Tris
SDS-PAGE Sammelgelpuffer (Immunoblot und Zymographie)	0,5 M Tris pH 6,8
SDS-PAGE Trenngel (Immunoblot)	10-12% Acrylamide 0,1% APS 0,1% SDS 260 mM Tris 0,004% TEMED

SDS-PAGE Trenngel (Zymographie)	8% Acrylamid 0,1% Gelatine 0,1% APS 0,1% SDS 0,06% TEMED 375 mM Tris
SDS-PAGE Trenngelpuffer (Immunoblot und Zymographie)	1,5 M Tris pH 8,8
Stripping-Puffer	62,5 mM Tris 2% SDS pH 6,7 0,7% β -ME (hinzugefügt unmittelbar vor Nutzung)
TBST	100 mM NaCl 10 mM Tris 0,1% Tween-20 pH 7,5
Towbin-Puffer (10X) (Semi-Dry-Blot)	1,92 M Glycin 0,25 M Tris
Transfer-Puffer (Semi-Dry-Blot)	1X Towbin-Puffer 10% Methanol

3.1.3 Versuchskits

Versuchskit	Hersteller
Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (#RPN2232)	GE Healthcare
<i>In Situ</i> Cell Death Detection Kit (#11684795910)	Roche
MaxBlock™ Autofluorescence Reducing Kit (#MB-L)	MaxVision Biosciences Inc.
Pierce™ BCA Protein Assay Kit (#23225)	Thermo Fisher Scientific

3.1.4 Antikörper

Primärer Antikörper Immunoblot	Hersteller
Aquaporin 5 (#A4979-50L)	Sigma-Aldrich
Caspase 3 (#9662)	Cell Signaling
CD31 (#DIA-310)	Dianova
CTGF (#PA5-32193)	Thermo Fisher Scientific
MMP-12 (#ab66157)	Abcam
PAI-1 (#11907)	Cell Signaling

PCNA (#M0879)	Dako
proSFTPC (#AB3789)	Merck Millipore
pSmad1/Smad5/Smad9 (#13820)	Cell Signaling
pSmad2 (#3108)	Cell Signaling
pStat3 (#9145)	Cell Signaling
SMA (#sc-53142)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Smad1 (#9743)	Cell Signaling
Smad2/3 (#3102)	Cell Signaling
Stat3 (#9139)	Cell Signaling
TGF- β (#3709)	Cell Signaling
VE-Cadherin (#ab33168)	Abcam
β -Actin (#3700)	Cell Signaling

Sekundärer Antikörper Immunoblot

Hersteller

Anti-goat IgG, HRP-linked (#sc-2020)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Anti-mouse IgG, HRP-linked (#7076)	Cell Signaling
Anti-rabbit IgG, HRP-linked (#7074)	Cell Signaling
Anti-rat IgG, HRP-linked (#7077)	Cell Signaling

Primärer Antikörper Immunfluoreszenz

Hersteller

proSFTPC (#AB3786)	Merck Millipore
Ki67 (#PA5-19462)	Thermo Fisher Scientific

Sekundärer Antikörper Immunfluoreszenz

Hersteller

Alexa Fluor [®] 488-AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (#111-545-003)	Jackson ImmunoResearch Laboratories
Cy [™] 3-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (#111-165-003)	Jackson ImmunoResearch Laboratories

3.1.5 Verbrauchsmaterial

Objekt

Hersteller

Biosphere [®] Filterspitzen 10 μ l farblos (#70.1130.210)	Sarstedt
Deckgläser, rechteckig (#631-1573)	VWR International
Einschweißfolie Clear Seal (#4ti-0541)	4titude
Einwegskalpell Figuration 11 (#200210011)	FEATHER [®] Safety Razor Co.
FrameStar [®] 96-Well Semi-Skirted PCR Plate, farblos	4titude

(#4ti-0770/C)

Glasobjektträger ThermoScientific SuperFrost® Plus, 76 x 26 mm	Menzel Gläser
Micro tube 0,5 ml, PP (#72.699)	Sarstedt
MidiTips Premium 200 µl Kapillarspitze, Rundkopf (#729011)	Biozym
Mikrotom-Klingen C35 (#207500003)	FEATHER® Safety Razor Co.
Multiply®-Pro cup 0,2 ml, PP (#72.737.002)	Sarstedt
Nitrozellulosemembran Amersham™ Protran® 0.45 µm (#10600003)	GE Healthcare
Nunc™ MicroWell™ 96-Well Mikrotiterplatten (#269620)	Thermo Fisher Scientific
Parafilm® M (#H666.1)	Bemis Company, Inc
Pasteur-Pipette (#LW4694)	alphalaboratories
Pipettenspitze 1000 µl (#70.762)	Sarstedt
Pipettenspitze 20 µl, farblos (#70.1114)	Sarstedt
Pipettenspitze 200 µl, gelb (#70.760.012)	Sarstedt
SafeSeal Micro tube 2 ml, PP (#72.695.500)	Sarstedt
SafeSeal tube 1,5 ml (#72.706)	Sarstedt
Serologische Pipette 10 ml (#86.1254.001)	Sarstedt
Serologische Pipette 25 ml (#86.1685.001)	Sarstedt
Serologische Pipette 5 ml (#86.1253.001)	Sarstedt
tube 15 ml, 120 x 17 mm ² (#62.554.502)	Sarstedt
tube 50 ml, 114 x 28 mm ² , PP (#62.547.254)	Sarstedt
Whatman® Gel-Blotting-Papier GB 005, 1,5mm (#10426994)	GE Healthcare

3.1.6 Geräte und Ausrüstung

Gerät	Hersteller
7500 Real time PCR System	Applied Biosystems
Balance ES320A	Precisa
Bandelin Sonopuls HD 2070 Ultraschall-Homogenisator	Bandelin
ChemiDoc XRS+ Imaging System	Bio-Rad Laboratories GmbH
Eppendorf Research® plus Pipetten (2,5, 10, 20, 100 und 1000 µl)	Eppendorf
Heizblock TK-23	Hettich Benelux B.V.
HTA Folieneinschweißgerät (Modell HT121TS)	4titude
Infinite M 200 Pro Nanoquant	Tecan
Leica ASP300 S Gewebeinfiltrationsautomat	Leica Biosystems
Leica EG1150 C Kühlplatte	Leica Biosystems
Leica EG1150 H Paraffinausgießstation	Leica Biosystems
Leica SCN400 Slide Scanner	Leica Biosystems

Magnetrührer Ika Mag Reo	Ika
Mikroskop BX43	Olympus
Mikrotom RM 2035 BioCut	Leica Biosystems
Miniox II Monitor	Catalyst Research, Owing Mills, M
Netzgerät EV231	VWR International
PerfectBlue™ Doppel-Gelsystem Twin L	VWR International
PerfectBlue™ Doppel-Gelsystem Twin S	VWR International
PerfectBlue™ Semi-Dry-Blotter, Sedec™	VWR International
Schwingmühle MM 400	Retsch
SPROUT Mikro-Zentrifuge	LabScientific
Universalschrank UN30	Memmert GmbH + Co. KG
Vortex-Schüttler VTX-3000 L	LMS Laboratory and Medical supplies
Wasserbad TFB 55	Medite GmbH
Wasserbad WNB 14	Memmert GmbH + Co. KG
Wippe-Schüttler MR-12	Biosan
Zentrifuge 5424 R	Eppendorf
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf
Zentrifuge Rotina 420 R	Hettich Benelux B.V.
Zentrifuge Z216 MK	Hermle

3.1.7 Software

Software	Hersteller
Aperio ImageScope (Version 12.0.1.5030)	Aperio Technologies
Applied Biosystems 7500 Real time PCR Software (Version 2.0.6)	Thermo Fisher Scientific
Cell^D 3.4	Olympus
cellSens Dimension	Olympus
GraphPad Prism 7	GraphPad Software
Image Lab™	Bio-Rad Laboratories
ImageJ2	ImageJ
Primer Express Software V.3.0.1	Thermo Fisher Scientific

3.2 Tierstudie

3.2.1 Versuchstiere und Rahmenbedingungen

Alle Tierversuche wurden durch das Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen genehmigt (AZ.2015.A120; AZ.2020.A095) und in Übereinstimmung mit den geltenden rechtlichen Bestimmungen durchgeführt. Als Versuchstiere wurden homozygote *Cxcl10*-Knockout-Mäuse (*Cxcl10*^{-/-}; B6.129S4-*Cxcl10*^{tm1Adl}/J; The Jackson Laboratory) sowie Wildtyp-Mäuse (WT) vom Stamm C57BL/6J eingesetzt. Die Wildtyp-Kontrolle wurde entsprechend der Empfehlung von The Jackson Laboratory ausgewählt. Die Tiere wurden im Tierstall des Instituts für Pharmakologie der Uniklinik Köln (Gleueler Str. 24, 50931 Köln) in feuchtigkeits- und temperaturkontrollierten (22 ± 2 °C) Räumen gehalten und einem 12/12-Stunden Hell/Dunkel-Rhythmus zur Simulation von Tag und Nacht ausgesetzt. Ihnen wurden Futter und Wasser *ad libitum* gewährt. Die Aufzucht der Tiere sowie die durchgeführten Interventionen wurden durch Tierpfleger*innen, Tiermediziner*innen und Biolog*innen begleitet und beaufsichtigt.

3.2.2 Modell der Hyperoxie-induzierten Lungenschädigung bei der Maus

Die neugeborenen Jungen aus mindestens zwei Würfen wurden gepoolt und randomisiert neuen Muttertieren zugeordnet. Anschließend wurden sie auf eine Kontroll- und eine Interventionsgruppe aufgeteilt. Während die Kontrollgruppe für ihre gesamte Lebensdauer unter Raumluftbedingungen [21% (Vol./Vol.) O₂; Normoxie (NOX)] gehalten wurde, wurden die Tiere der Interventionsgruppe bis zum postnatalen Tag 14 einer 85%igen Sauerstofffraktion [85% (Vol./Vol.) O₂; Hyperoxie (HYX)] ausgesetzt. Der Versuchsaufbau ist durch Alejandro Alcázar et al. vorbeschrieben und in der Arbeitsgruppe etabliert ¹⁷⁵.

Die Jungtiere der Hyperoxie-Gruppe wurden spätestens 12 h *post partum* gemeinsam mit den Muttertieren in eine Hyperoxie-Kammer überführt, in der eine mit 85% O₂ angereicherte, normobare Atmosphäre generiert wurde. Als Hyperoxie-Kammer wurde eine Plexiglaskammer vom Ausmaß 90 cm x 42 cm x 38 cm mit ausreichendem Lichteinfluss genutzt, die mit einer Rate von 3,5 l/min kontinuierlich ventiliert wurde. Die O₂-Konzentration wurde mithilfe eines Miniox II Monitors (Catalyst Research, Owing Mills, MD) überwacht. Um die Hyperoxie-bedingte Belastung der Muttertiere zu minimieren, erfolgte alle 24 h eine Rotation der Mütter zwischen einem Hyperoxie-Wurf und einem gleichaltrigen Normoxie-Wurf. Die Hyperoxie-Exposition der Versuchstiere in der Interventionsgruppe wurde für 14 Tage aufrechterhalten. Am 14. postnatalen Tag wurde ein Teil der Tiere getötet und der Organentnahme zugeführt. Die restlichen Tiere wurden in Normoxie-Verhältnisse überführt und verblieben dort bis zur

Tötung am 28. postnatalen Tag. Die Mäuse der Normoxie-Gruppe wurden über ihre gesamte Lebensdauer hinweg bei Raumluftbedingungen gehalten. Analog zur Interventionsgruppe erfolgte die Tötung der Versuchstiere teils am 14., teils am 28. postnatalen Tag (P14 bzw. P28).

Wie in Abbildung 7 veranschaulicht ergeben sich durch das Versuchsdesign mit zwei unterschiedlichen Zeitpunkten (P14 und P28), dem Vergleich von Wildtypen und *Cxcl10*-Knockout-Mäusen sowie der Gegenüberstellung von Intervention (Hyperoxie) und Kontrolle (Normoxie) insgesamt acht Versuchsgruppen.

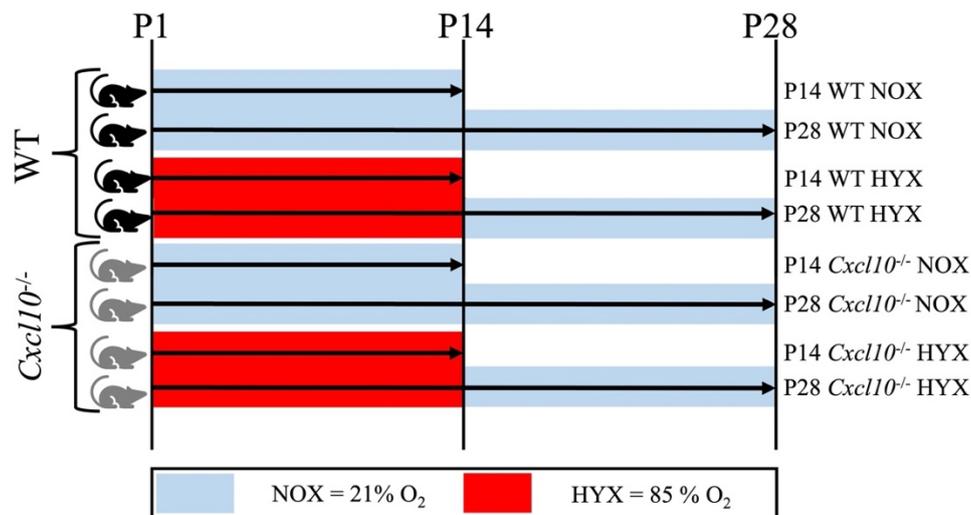


Abbildung 7: Detaillierte Übersicht über das experimentelle Setup der Tierstudie. Es wurden mit P14 und P28 zwei Zeitpunkte untersucht. Pro Zeitpunkt wurden vier Gruppen festgelegt: WT NOX, WT HYX, *Cxcl10*^{-/-} NOX und *Cxcl10*^{-/-} HYX. Die P28-HYX-Tiere waren der Hyperoxie bis zum 14. postnatalen Tag ausgesetzt und wurden anschließend in die Normoxie überführt. Abkürzungen: P1/14/28 = postnataler Tag 1/14/28; WT = Wildtyp; *Cxcl10*^{-/-} = *Cxcl10*-Knockout; NOX = Normoxie; HYX = Hyperoxie.

3.2.3 Präparation und Organentnahmen

Die Tötung der Mäuse erfolgte am 14. und 28. postnatalen Tag durch Punktion der Aorta abdominalis bzw. durch eine rechtsventrikuläre Punktion und konsekutives Ausbluten. Um eine möglichst stressfreie Tötung zu gewährleisten, wurden die Tiere vorher durch die intraperitoneale Injektion eines Narkosegemischs aus Xylazin (10 mg/kg Körpergewicht) und Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht) in Kochsalzlösung tief anästhesiert. Zur Organentnahme wurden die Tiere in Rückenlage auf einem Präparationstisch fixiert. Es folgten eine mediane Eröffnung von Bauchhöhle und Thorax mittels chirurgischer Schere sowie die Darstellung der Organe durch Entfernen des umgebenden Fett- und Bindegewebes.

Das angewandte Verfahren zur Entnahme und Präparation der Lungen ist von Alejandro Alcázar et al. vorbeschrieben¹⁷⁶. Nach einer Ligatur des rechten Hauptbronchus mithilfe eines

chirurgischen Fadens wurde die rechte Lunge distal der Ligatur abgesetzt und einer Kältekonservierung zugeführt. Hierzu wurde sie mittels Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung für die RNA- und Proteinanalysen bei -80 °C gelagert. Die linke Lunge wurde mittels Druckfixation für die histologischen Untersuchungen aufbereitet. Zu diesem Zweck wurde eine Tracheotomie durchgeführt. Über eine durch den Luftröhrenschnitt eingebrachte Kanüle (26 G) erfolgte nun eine Insufflation der Lunge mit 4%igem (Masse/Vol.) Paraformaldehyd (PFA) bei einem Druck von 20 cmH₂O. Die Trachea wurde mit einem chirurgischen Knoten verschlossen, um ein Entweichen des PFA und ein Kollabieren der Lunge zu vermeiden. Daraufhin wurde die Lunge abgesetzt und für 24 h in einer 4%igen PFA-Lösung fixiert.

Die Tierversuche sowie die Tötung der Tiere und die nachfolgenden Organentnahmen wurden von Universitätsprofessor Dr. med. Dr. nat. med. M. A. A. Alcázar, Frau Dr. nat. med. J. Mohr und Frau Dr. med. vet. V. Jentgen aus meiner Arbeitsgruppe (Universität zu Köln und Uniklinik Köln, Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Experimentelle Pädiatrie, Experimentelle Pneumologie) ausgeführt.

3.3 Histologische Analysen

3.3.1 Aufbereitung der Lungen für die Histologie

Die in 4% PFA fixierten Lungen wurden schrittweise dehydriert und paraffiniert. Dazu wurden sie initial für 72 h in einer 70%igen Isopropanollösung inkubiert. Die weitere Dehydratation sowie die Paraffinierung wurden mithilfe eines Leica ASP300 S Gewebeeinfiltrationsautomaten (Leica Biosystems) durchgeführt. Tabelle 2 zeigt die einzelnen Inkubationsschritte, die im Automaten erfolgten.

Tabelle 2: Inkubationsprogramm des Gewebeeinfiltrationsautomaten zur Dehydrierung und Paraffinierung der in PFA fixierten Lungen.

Reagenz	Inkubationszeit
70% EtOH	30 min
99,5% Isopropanol	3 x 30 min
99,5% Isopropanol	45 min
99,5% Isopropanol	3 x 75 min
Xylol	15 min
Paraffin (55-65 °C)	3 x 120 min

Mit einer Paraffinausgießstation (Leica EG1150 H; Leica Biosystems) wurden die derart behandelten Lungen anschließend in Blöcke eingegossen. Zum Aushärten wurden die Paraffinblöcke auf eine Kühlplatte (Leica EG1150 C; Leica Biosystems) überführt.

Um Gewebeschnitte für die histologischen Untersuchungen anzufertigen, wurden die Paraffinblöcke mit den darin eingebetteten Lungen mithilfe eines manuellen Mikrotoms (Leica RM 2035 BioCut; Leica Biosystems) geschnitten. Dabei wurde die Schnittdicke auf 3 µm festgelegt. Die Paraffinschnitte wurden zum Glätten für einige Minuten in ein Warmwasserbad (37-40 °C) überführt und anschließend auf die beschichteten Objektträger (ThermoScientific SuperFrost® Plus, 76 x 26 mm; Menzel Gläser) aufgebracht. Daraufhin wurden die Präparate über Nacht in einem Wärmeschrank bei 40 °C getrocknet.

Die Ausrichtung des Organs bzw. Gewebestücks im Paraffinblock sowie die Wahl der Schnittebene können quantitative, histomorphometrisch erhobene Parameter und somit die Ergebnisse der Analysen beeinflussen^{177,178}. Um einen Bias zu vermeiden, wurde das Gewebe nach dem Protokoll für *isotropic uniform random* (IUR) *sections* geschnitten¹⁷⁷. Hierbei wurde die in der Histomorphometrie etablierte Orientator-Methode angewandt, bei der die Orientierung der Schnittebene in Relation zum Präparat nach einem standardisierten Verfahren randomisiert wird¹⁷⁷. Eine weitere Anforderung an Gewebeschnitte für die quantitative Mikroskopie ist, dass sie in statistischem Sinne repräsentativ für die Gesamtheit des untersuchten Gewebes sein müssen¹⁷⁹. Zur Erfüllung dieses Qualitätskriteriums wurden die Schnitte aus unterschiedlich tiefen Schichten der Lunge gewonnen. So wurden pro Probe drei Serien zu je 30 Schnitten angefertigt, wobei zwischen den einzelnen Serien jeweils 30 bis 40 Schnitte verworfen wurden. Die Schnitte für die verschiedenen Färbungen und Untersuchungen wurden anschließend zufällig aus allen Serien ausgewählt.

3.3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Als Grundlage für verschiedene histomorphometrische Analysen wurde eine HE-Färbung durchgeführt. Hierzu wurden die Präparate initial in Neo-Clear entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe [100%, 96%, 80%, 70% (Vol./Vol.) Ethanol (EtOH)] rehydriert. Anschließend wurden sie in einer sauren Hämalaunlösung nach Mayer inkubiert und mit Leitungswasser gebläut. Darauf folgte die Färbung mit einer 0,5%igen Eosin G-Lösung. Der Eosin G-Lösung wurde vor der Nutzung ein Tropfen 100%ige Essigsäure pro 100 ml Lösung beigegeben. Die gefärbten Schnitte wurden mit einer aufsteigenden Alkoholreihe [70%, 80%, 96%, 100% (Vol./Vol.) EtOH] erneut dehydriert und mit Neo-Clear geklärt. Zuletzt wurden die Präparate mit Deckgläsern (VWR International) eingedeckt, wobei Neo-Mount (Merck) als

Mounting-Medium verwendet wurde. Das vollständige Färbeprotokoll ist im Anhang tabellarisch dargestellt (vgl. Appendix 1).

3.3.3 Picro Sirius-Red-Färbung

Durch eine Färbung mit Picro Sirius-Red wurden Kollagenablagerungen und fibrotische Prozesse sichtbar gemacht. Für die Färbung wurden je zwei Schnitte pro Tier verwendet. Zuerst wurden die Schnitte entparaffiniert, rehydriert (vgl. 3.3.2) und in destilliertem Wasser (dH₂O) gewaschen. Nun wurden sie für 4 min in einer 0,2%igen Phosphormolybdänsäurelösung inkubiert und daraufhin über 75 min mit einer Picro Sirius-Red-Lösung gefärbt. Nach zweimaligem Waschen in 0,5%iger Essigsäure wurden die Präparate mit EtOH [2 x 100% (Vol./Vol.) EtOH] dehydriert und in Neo-Clear geklärt, um anschließend eingedeckt zu werden. Das ausführliche Färbeprotokoll befindet sich im Anhang (vgl. Appendix 2). Die Anwendung der Färbung an Lungengewebe ist vorbeschrieben^{180,181}.

3.3.4 Elastika-Färbung nach Hart

An vier Paraffinschnitten pro Tier wurde eine Färbung der elastischen Fasern nach Hart durchgeführt. Die Färbung ist vorbeschrieben und in der Arbeitsgruppe etabliert¹⁷⁴. Die Präparate wurden hierbei zuerst in Neo-Clear und einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert (vgl. 3.3.2) und daraufhin über Nacht in einer Resorcin-Fuchsinhaltigen Färbelösung [1 Volumenanteil Resorcin-Fuchsin nach Weigert; 9 Volumenanteile 1% (Vol./Vol.) HCl in 70% (Vol./Vol.) EtOH] inkubiert. Nach mehreren Waschschritten erfolgte anschließend eine Gegenfärbung mit Tartrazine. Nun wurden die Präparate mit EtOH [96%, 100% (Vol./Vol.) EtOH] dehydriert, mit Neo-Clear geklärt und eingedeckt. Das vollständige Färbeprotokoll ist im Anhang aufgeführt (vgl. Appendix 3).

3.3.5 Quantitative Histomorphometrie

Zur Untersuchung der murinen Lungen wurden verschiedene histomorphometrische Parameter erhoben. Anhand der HE-gefärbten Schnitte wurden lichtmikroskopisch *mean linear intersept* (MLI), *radial alveolar count* (RAC), alveoläre Septumdicke und die durchschnittliche Oberfläche der einzelnen Alveole bestimmt. Pro Tier wurden dazu je vier Schnitte zufällig ausgewählt und mithilfe eines Leica SCN400 Slide Scanners (Leica Biosystems) bis zu einer Vergrößerung von 20X vollständig digitalisiert. Zur Auswertung der

generierten Bilddateien wurden die Programme Cell[^]D 3.4 (Olympus), ImageJ2 (ImageJ) und Aperio ImageScope (Aperio Technologies) verwendet.

Der MLI als Maß für die alveoläre Septierung sowie als indirektes Maß für die gesamtalveoläre Oberfläche (*alveolar surface area*) wurde nach vorbeschriebenem Prinzip bestimmt^{101,103}. Pro Schnitt wurden zehn Gesichtsfelder in 20-facher Vergrößerung aufgenommen, wobei große Bronchiolen und Gefäße bewusst ausgelassen wurden. Ebenso wurden atelektatische Lungenabschnitte ausgeschlossen. Anschließend wurde mit der Software Cell[^]D 3.4 (Olympus) ein Gitternetz aus horizontal und vertikal verlaufenden Linien mit definierten Abständen auf das Gesichtsfeld projiziert. Die Schnittpunkte von Gitternetz und alveolären Septen wurden gezählt. Zur Berechnung des MLI wurde nun die Gesamtlänge aller Gitternetzlinien durch die Gesamtanzahl an Schnittpunkten dividiert (vgl. Abbildung 8)¹⁰³.

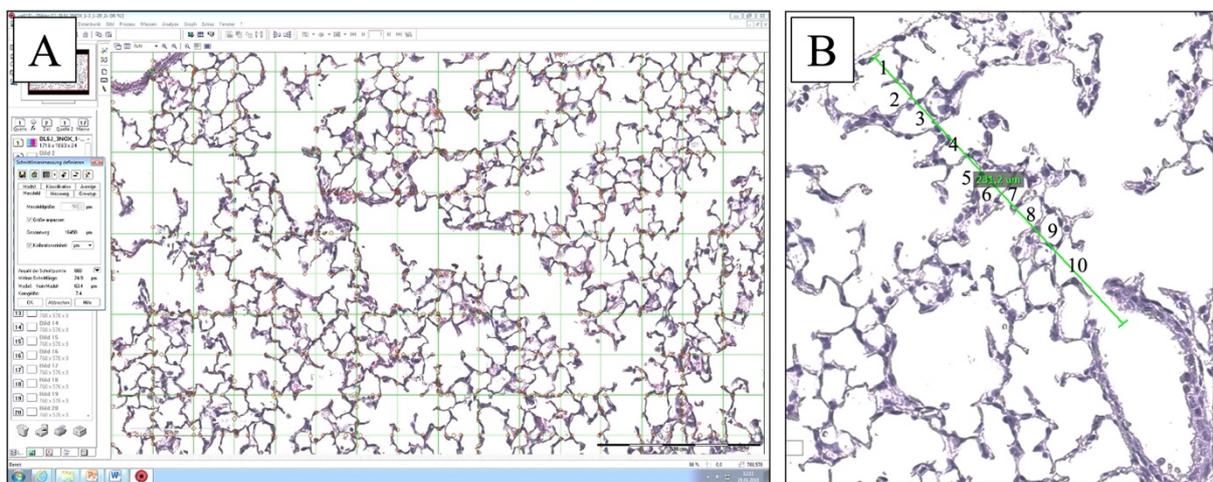


Abbildung 8: Beispielhafte Bestimmung von MLI und RAC. A: Bestimmung des *mean linear intercept* (MLI). B: Bestimmung des *radial alveolar count* (RAC).

Zur Analyse der Komplexität der terminalen respiratorischen Einheit bzw. der Alveolarisierung des Lungenazinus wurde der RAC verwendet¹⁸²⁻¹⁸⁴. Hierbei wurde verfahren, wie erstmals von Emery und Mithal beschrieben¹⁸⁴. Es wurden alle *Bronchioli respiratorii* innerhalb eines Schnittes aufgesucht. Als *Bronchioli respiratorii* wurden diejenigen Bronchiolen identifiziert, die innerhalb einer Schnittebene eindeutig sowohl mit respiratorischem Flimmerepithel besetzte Wandabschnitte als auch Anschluss an die Alveolen erkennen ließen. Vom Zentrum eines jeden *Bronchiolus respiratorius* aus wurde eine Linie senkrecht zum nächstgelegenen Bindegewebsseptum bzw. zur viszeralen Pleura eingezeichnet. Anschließend wurden alle Alveolen gezählt, die von dieser Senkrechten geschnitten wurden (vgl. Abbildung 8).

Neben MLI und RAC wurde die alveoläre Septumdicke gemessen, die Rückschlüsse auf den Grad der Fibrosierung des alveolären Interstitiums erlaubt¹⁸⁵. Hierzu wurden pro Schnitt zehn Gesichtsfelder bei 20-facher Vergrößerung fotografiert. In jedem Gesichtsfeld wurden zehn

Septen mithilfe der Software ImageJ2 (ImageJ) untersucht, wobei jeweils zwei pro Bildquadrant sowie zwei zusätzliche aus dem zentralen Bildbereich ausgewählt wurden. Die Septumdicke wurde wie vorbeschrieben einheitlich am schmalsten Punkt des Septums gemessen ¹⁸⁶.

Zur Analyse der Alveolengröße als Surrogat-Parameter für den Grad der alveolären Rarefizierung wurde mithilfe des Durchmessers die Oberfläche der einzelnen Alveole näherungsweise bestimmt. Pro Gesichtsfeld wurden mittels ImageJ2 (ImageJ) zehn geschlossene Alveolen aus allen Bildbereichen untersucht, wobei der Durchmesser konstant an der breitesten Stelle der Alveole von Wand zu Wand gemessen wurde. Die Oberfläche wurde anschließend idealisiert mit der Formel für die Oberfläche einer Kugel berechnet:

$$\text{Oberfläche} = 4 \times \pi \times \left(\frac{\text{Durchmesser}}{2} \right)^2$$

Formel 1: Oberfläche einer Kugel.

Mithilfe der Picro Sirius-Red Färbung wurde die Menge an Kollagen im Lungengewebe quantifiziert. Hierzu wurden mit dem Lichtmikroskop (Mikroskop BX43; Olympus) nach vorherigem Weißabgleich pro Schnitt bis zu zehn Gesichtsfelder in 20-facher Vergrößerung bei konstanter Belichtungszeit (1 ms) fotografiert. Große Bronchiolen und Gefäße wurden bei der Aufnahme der Gesichtsfelder vermieden. Nun wurde die Fläche des rot gefärbten Kollagens mithilfe der *color threshold* Funktion der Software ImageJ2 (ImageJ) bei einheitlichen Einstellungen (Hue: 185-255; Saturation: 31-255; Brightness: 70-255) ermittelt. Darüber hinaus wurde die Bildfläche des Gesamtgewebes quantifiziert. Anschließend wurde ein Quotient aus der vom Kollagen eingenommenen Fläche und der des Gesamtgewebes gebildet.

Anhand der Elastika-Färbung nach Hart wurde nach vorbeschriebenem Verfahren die Dichte an elastischen Fasern im Lungenparenchym untersucht ¹⁷⁴. Dafür wurden bei einheitlicher Belichtungszeit bis zu zehn Gesichtsfelder pro Schnitt bei 20-facher Vergrößerung aufgenommen. Erneut wurden Bereiche mit großen Bronchiolen und Gefäßen sowie atelektatische Lungenabschnitte vermieden. Positiv-gefärbte Areale wurden manuell als elastisches Fasergewebe definiert. Ihr Flächenanteil wurde nun mit der Software cellSens Dimension (Olympus) quantifiziert. Analog zum Kollagengehalt wurde die Menge an elastischen Fasern als Flächenanteil am Gesamtgewebe des jeweiligen Gesichtsfelds ausgedrückt.

Außerdem wurden die nach Hart gefärbten Schnitte für eine Zählung der sekundären Septen herangezogen. Die sekundären Septen entstehen im Zuge der alveolären Phase der Lungenentwicklung aus den Primärsepten und unterteilen die vorbestehenden pulmonalen Sacculi in zahlreiche Alveolen, welche die finale Funktionseinheit der Lunge darstellen¹⁸⁷. Sind nur wenige sekundäre Septen vorhanden, impliziert dies eine geringe Anzahl an Alveolen und eine reduzierte Gasaustauschfläche^{187,188}. Innerhalb eines Gesichtsfelds wurden alle sekundären Septen anhand ihrer anatomischen Struktur und Lokalisation identifiziert und manuell ausgezählt. Die histomorphometrisch bestimmten Werte wurden mithilfe der Software GraphPad Prism 7 statistisch analysiert und graphisch gegenübergestellt.

3.3.6 Immunhistochemie

Neben der Erhebung der genannten histomorphometrischen Parameter erfolgte eine histologische Untersuchung von Makrophagen und Blutgefäßen. Diese wurden zwecks besserer Identifikation im Gewebeschnitt immunhistochemisch markiert. Es wurde Hämatoxylin zur Gegen- bzw. Hintergrundfärbung verwendet. Die immunhistochemischen Färbungen wurden in Absprache mit Frau Prof. Dr. M. Odenthal im Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Uniklinik Köln (Kerpener Str. 62, 50937 Köln) durch Frau M. Müller durchgeführt.

Zur Hervorhebung der Makrophagen wurde eine Macrosialin-Immunhistochemie (IHC) eingesetzt. Macrosialin, welches das murine Pendant zum humanen CD68 (*cluster of differentiation 68*) darstellt, ist ein transmembranäres Glykoprotein, das in hohem Maße auf Zellen des mononukleären Phagozyten-Systems exprimiert wird und sich daher als Makrophagenmarker eignet¹⁸⁹. Die Blutgefäße wurden mittels von-Willebrand-Faktor (vWF)-IHC zur Darstellung gebracht. Bei vWF handelt es sich um ein Glykoprotein, das ausschließlich auf der Oberfläche von Endothelzellen sowie im Zytoplasma von Megakaryozyten exprimiert wird¹⁹⁰. Es wurden jeweils zwei bis drei Schnitte pro Antigen und pro Tier immunhistochemisch gefärbt und anschließend bei 20-facher Vergrößerung mit einem Leica SCN400 Slide Scanner (Leica Biosystems) eingelesen. Zur Auswertung der Bilddateien wurden die Programme ImageJ2 (ImageJ) und Aperio ImageScope (Aperio Technologies) verwendet. Pro Schnitt wurden bis zu zehn Gesichtsfelder bei einer Vergrößerung von 20X fotografiert und anschließend manuell ausgezählt. Es wurde die Gesamtanzahl an Makrophagen sowie die der Blutgefäße pro Gesichtsfeld bestimmt, wobei bei Letzteren zwischen Gefäßen mit einem Durchmesser von <20 µm und ≥20-100 µm unterschieden wurde.

3.3.7 Ki67-Immunfluoreszenz

Zur Untersuchung der Zellproliferation wurde eine Ki67-Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Mit dieser können proliferierende Zellen durch Fluoreszenzmarkierung des als Proliferationsmarkers dienenden nukleären Proteins Ki67 (Kiel-Antigen Nr. 67) im Gewebeschnitt detektiert und so quantifiziert werden¹⁹¹. Um das Paraffin zum Schmelzen zu bringen, wurden die Schnitte initial für 2 h bei 60 °C in einem Wärmeschrank erhitzt und dann zum vollständigen Entparaffinieren für 3 x 10 min in Neo-Clear inkubiert. Daraufhin wurde das Gewebe in einer absteigenden Alkoholreihe [je 1 min in 100%, 96%, 80%, 70% (Vol./Vol.) EtOH] rehydriert und für 1 min in dH₂O gespült. Die rehydrierten Schnitte wurden für 5 min bei RT mit Lösung A des MaxBlock™ Autofluorescence Reducing Kits (MaxVision Biosciences Inc.) inkubiert und dann für 1 min in 60% EtOH, für 5 min in dH₂O sowie für 2 x 3 min in PBS (*phosphate buffered saline*) gewaschen. Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte in einen Citrat-Puffer (1X Dako Target Retrieval Solution Citrate; Dako) überführt und für 25 min mittels Dampfgeräts erhitzt. Die abgekühlten Schnitte wurden 1 h lang bei RT mit Sea Block (Thermo Fisher Scientific) blockiert und anschließend für 24 h bei 4 °C mit dem Primärantikörper (Ki67 polyklonaler Antikörper; Thermo Fisher Scientific) inkubiert. Der Ki67-Antikörper wurde zuvor in Dako Antikörper-Verdünnungspuffer (Dako) verdünnt (1:1000). Nach Bindung des primären Antikörpers wurden die Schnitte für 3 x 5 min in PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (Alexa Fluor® 488-AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG; Jackson ImmunoResearch Laboratories; Verdünnung 1:500 in PBS) für 1 h bei RT. Im Anschluss wurde das Gewebe erneut für 3 x 5 min in PBS sowie für 5 min in dH₂O gewaschen und 5 min lang bei RT mit Lösung B des MaxBlock™ Autofluorescence Reducing Kits (MaxVision Biosciences Inc.) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in dH₂O (je 2 min) erfolgte eine Inkubation der Schnitte für 10 min mit einer DAPI-Arbeitslösung (DAPI-Stammlösung 1:1000 verdünnt in PBS). Durch die Färbung mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) werden alle Nuklei, also auch solche nicht proliferierender Zellen, markiert und können so quantifiziert werden. Abschließend wurden die Schnitte mit dH₂O gespült und unter Verwendung von Fluoromount (Sigma-Aldrich) als Mounting-Medium mit Deckgläsern eingedeckt.

Zur Auswertung wurden bei 40-facher Vergrößerung bis zu fünf Gesichtsfelder pro Schnitt mit dem Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX43; Olympus) sowie der Software cellSens Dimension (Olympus) aufgenommen und mithilfe des Programms ImageJ2 (ImageJ) ausgewertet. Die Ki67-positiven Zellkerne wurden manuell gezählt, dann wurde ihr Anteil an der Gesamtanzahl an Zellkernen im Gesichtsfeld berechnet.

3.3.8 TUNEL-Assay

Um apoptotische Zellen im Gewebe zu visualisieren, wurde ein *terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling* (TUNEL)-Assay durchgeführt. Hierbei werden im Rahmen der Apoptose entstehende DNA-Doppelstrangbrüche durch eine Fluoreszenzmarkierung der Bruchenden sichtbar gemacht^{192,193}. Das TUNEL-Assay wurde mit einer proSFTPC-Immunfluoreszenzfärbung kombiniert. Die Gewebeschnitte wurden initial in Neo-Clear (3 x 10 min) entparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert [je 3 min in 100%, 96%, 80%, 70% (Vol./Vol.) Ethanol] und für 3 min in dH₂O gewaschen. Nun wurden sie für 10 min in Wasserstoffperoxid [eine Tablette Harnstoff-Wasserstoffperoxid (Roth) in 5 ml dH₂O] inkubiert und dann 1 min in dH₂O und 2 x 1 min in PBS gespült. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit Lösung A des MaxBlock™ Autofluorescence Reducing Kits (MaxVision Biosciences Inc.) für 5 min bei RT. Im Anschluss an vier weitere Waschschrte (1 min in 60% EtOH, 5 min in dH₂O, 2 x 3 min in PBS) wurden die Schnitte für 18 min bei 37 °C mit Proteinase K inkubiert, in dH₂O abgespült und 1 h lang bei RT mit Sea Block (Thermo Fisher Scientific) blockiert. Nun wurde das Gewebe mit der TUNEL-Lösung des *In Situ Cell Death Detection Kits* (Roche) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Zur Herstellung der TUNEL-Lösung wurden *label*- und *enzyme*-Lösung entsprechend der Herstelleranweisung im Verhältnis 9:1 gemischt. Anschließend wurden die Schnitte für 3 x 2 min in PBST (0,1% Tween 20 in PBS) gewaschen und für 24 h bei 4 °C mit dem Anti-proSFTPC-Antikörper (Merck Millipore) inkubiert. Der Antikörper wurde in Dako Antikörper-Verdünnungspuffer (Dako) verdünnt (1:500). Nach erneutem Waschen für 3 x 2 min in PBST erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper [Cy[™]3-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG, Jackson ImmunoResearch Laboratories; Verdünnung 1:500 in Dako Antikörper-Verdünnungspuffer (Dako)] für 1 h bei RT. Als nächstes wurden die Schnitte für 3 min in PBST gewaschen, für 10 min mit DAPI-Arbeitslösung (DAPI-Stammlösung 1:1000 verdünnt in PBS) inkubiert und nochmals in PBST abgespült. Zuletzt wurden sie mithilfe von Fluoromount (Sigma-Aldrich) eingedeckt.

Die Schnitte wurden unmittelbar nach dem Eindecken mikroskopiert. Analog zur Ki67-Immunfluoreszenzfärbung wurden bis zu fünf Gesichtsfelder bei 40-facher Vergrößerung fotografiert (vgl. Abschnitt 3.3.7). In den Gesichtsfeldern wurden TUNEL-positive, proSFTPC-positive und DAPI-positive Zellen manuell ausgezählt.

3.4 Methoden zur Untersuchung der Expressionsmuster auf mRNA-Ebene

3.4.1 RNA-Isolation und Bestimmung der RNA-Konzentration

Zur Homogenisierung des Lungengewebes und zur Isolation der RNA wurden der Gewebeprobe initial 500 µl TRI Reagenz beigelegt. Eine zusätzliche Homogenisierung wurde durch eine Schwingmühle (20 s, 30 Hz) erreicht. Die homogenisierten Proben wurden gevortext und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden sie mit 100 µl Chloroform versetzt und nochmals für 15 s gevortext. Nach dreiminütiger Inkubation bei RT wurden sie zwecks Phasentrennung zentrifugiert [15 min, 12000 Umdrehungen pro Minute (UpM), 4 °C]. Die obere, wässrige und RNA-haltige Phase wurde in ein frisches *tube* (= Mikroreaktionsgefäß) überführt, während der Rest verworfen wurde. Um eine Präzipitation der RNA herbeizuführen, wurden die Proben nun für 20 min auf Eis mit 250 µl Isopropanol inkubiert und dann erneut zentrifugiert (15 min, 15000 UpM, 4 °C). Der entstandene Überstand wurde verworfen und das zurückgebliebene RNA-Pellet zur Steigerung der Reinheit zweimalig gewaschen. Dies geschah durch die Zugabe von je 500 µl 75% (Vol./Vol.) Ethanol, gefolgt von erneutem Zentrifugieren (5min, 15000 UpM, 4 °C), Abgießen des Ethanols und Lufttrocknen (30 min) des Pellets. Zuletzt wurde die kristallisierte RNA in Abhängigkeit der Pelletgröße in 20 bis 40 µl DEPC-behandeltem H₂O gelöst. RNA-Konzentration und -Reinheit wurden photometrisch durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD₂₆₀) bzw. des Quotienten aus OD₂₆₀ und OD₂₈₀ (entsprechend der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 280 nm) bestimmt (maximale Konzentration: 1 µg/µl, ansonsten weitere Verdünnung; OD₂₆₀/OD₂₈₀ zwischen 1,8 und 2). Für die Messung wurde ein Infinite[®] M200 PRO NanoQuant (Tecan) verwendet. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.4.2 Synthese von cDNA

Um durch reverse Transkription zur isolierten *messenger* RNA (mRNA) komplementäre DNA (engl. *complementary* DNA/cDNA) herzustellen, wurde verfahren wie in Tabelle 3 dargestellt. Zuerst wurde das RNA-Isolat bei RT mit DNase inkubiert, um mögliche Kontaminationen mit genomischer DNA zu beseitigen. Es wurden hierbei identische Mengen RNA, nämlich je 1 µg pro Probe, verwendet. Um den DNase-Verdau zu beenden, wurden die Proben anschließend bei 65°C mit EDTA inkubiert. Nun wurden Oligo(dt)-Primer, welche sich spezifisch an mRNA anlagern, sowie Random-Primer beigelegt. Zur Primerhybridisierung wurden die Proben für 5 min bei 70 °C inkubiert. Indem die Proben für 1 min auf Eis heruntergekühlt wurden, wurde der Vorgang gestoppt. Abschließend wurden die Proben bei 37 °C mit MMLV Reverse

Transkriptase, einem dNTP-Mix und einem RNase-Inhibitor inkubiert. Die entstandene cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

Tabelle 3: Protokoll zur Synthese von cDNA.

Schritt	Komponenten	Volumen [μ l]	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Inkubation [min]
0	1 μ g RNA-Isolat in DEPC-behandeltem H ₂ O	8	-	-
1	DNase 10X Reaktionspuffer	1	RT	15
	RNase-freie DNase	1		
		2		
2	EDTA Stop-Lösung (25 mM)	1	65	15
3	Random-Primer (0,5 μ g/ μ l)	0,6	70	5
	Oligo(dt)-Primer (16T) (0,5 μ g/ μ l)	0,4		
	DEPC-behandeltes H ₂ O	4		
		5		
4	-	-	auf Eis	1
5	dNTP-Mix (10 mM)	1,25	37	60
	RNase-Inhibitor (40 U/ μ l)	0,5		
	MMLV Reverse Transkriptase (200 U/ μ l)	1		
	MMLV-Puffer 5X	5		
	DEPC-behandeltes H ₂ O	2,25		
		10		
6	-	-	auf Eis	1

3.4.3 Quantitative RT-PCR

Um die Genexpression quantitativ zu untersuchen, wurde auf das Verfahren der *real time polymerase chain reaction* (RT-PCR) zurückgegriffen. Hierbei wurden mit einem SYBR-Green- sowie einem TaqMan-basierten Verfahren zwei gut etablierte Techniken angewandt. SYBR-Green ist ein Färbemittel, das in doppelsträngige DNA (dsDNA) interkaliert und dabei zur Fluoreszenz angeregt wird, sodass von der Stärke des emittierten Lichts auf die Menge an dsDNA rückgeschlossen werden kann^{194,195}. Bei der TaqMan-Methode binden spezifische Oligonukleotidsonden an die zu untersuchende Sequenz und werden im Zuge der Primerextension durch eine hitzestabile Taq-Polymerase hydrolysiert, wodurch es zur Freisetzung und damit Aktivierung des an die Sonde gebundenen Fluoreszenzmarkers (Reporter) kommt, der nun nicht mehr durch den Quencher am anderen Ende der Sonde

supprimiert wird ^{194,195}. Für die RT-PCR wurden ein 7500 Real time PCR System (Applied Biosystems) und die zugehörige Software (Applied Biosystems 7500 Real time PCR Software; Thermo Fisher Scientific) verwendet. DNA-Proben, SYBR-Green- und TaqMan-Mixe wurden in eine 96-Well-Platte übertragen; bei der Negativkontrolle wurde anstelle von cDNA spezielles H₂O für Hochleistungschromatographie (LC-MS grade) beigefügt. Die Mengenangaben und die genaue Aufschlüsselung der Komponenten sind Tabelle 4 zu entnehmen. Die Platte wurde mit einer Folie versiegelt, zentrifugiert (3 min, 1200 UpM, 20°C) und in das RT-PCR System überführt. Die gewählten Einstellungen sowie das genaue Programm des Thermocyclers in Abhängigkeit von der Methode sind in Tabelle 5 und Tabelle 6 aufgeführt. Eine Liste der verwendeten Primer und Sonden findet sich im Anhang (vgl. Appendix 4). Sie wurden mittels Primer Express Software (Thermo Fisher Scientific) designt und sind im Labor etabliert.

Tabelle 4: RT-PCR Proben-Zusammensetzung.

Methode	Komponenten	Volumen [µl]
TaqMan-Verfahren	Platinum qPCR Supermix-UGD w/ROX	12,5
	H ₂ O für Hochleistungschromatographie (LC-MS grade)	8,5
	TaqMan-Sonde (2 µM)	0,5
	Forward-Primer (6 µM)	0,5
	Reverse-Primer (6 µM)	0,5
	cDNA-Probe	2,5
		25
SYBR-Green-Verfahren	GoTaq qPCR Master Mix 2X	10
	H ₂ O für Hochleistungschromatographie (LC-MS grade)	8
	Forward-Primer (10 µM)	0,5
	Reverse-Primer (10 µM)	0,5
	cDNA-Probe	1
		20

Tabelle 5: Voreinstellungen 7500 Real time PCR System.

Methode	Einstellung („Plate setup“)
TaqMan-Verfahren	Reporter: „FAM“
	Quencher: „TAMRA“
SYBR-Green-Verfahren	Reporter: „SYBR“
	Quencher: „none“

Tabelle 6: RT-PCR Thermocycler-Programm.

Method	Thermocycler Phase	Temperatur [°C]	Dauer	
TaqMan-Verfahren	Erwärmung/Initialisierung	50	2 min	
		95	10 min	
	Zyklische Phase (40 Wiederholungen)		95	15 s
			60	1 min
SYBR-Green-Verfahren	Erwärmung/Initialisierung	50	2 min	
		95	10 min	
	Zyklische Phase (40 Wiederholungen)		95	15 s
			60	1 min
	Schmelzkurvenanalyse		95	15 s
			60	1 min
		95	30 s	
		60	15 s	

3.4.4 Statistische Auswertung der RT-PCR-Ergebnisse

Zur Quantifizierung der Genexpression wurde die $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode verwendet¹⁹⁶. Es handelt sich hierbei um ein Verfahren der relativen Quantifizierung, das auf den bei der RT-PCR gewonnenen *cycle threshold* (Ct)-Werten basiert¹⁹⁶. Initial wurden die Ct-Werte des Zielgens von Probe und Kontrolle mit denen des zugehörigen *house keeping* Gens (HKG) normalisiert¹⁹⁶. Als HKG wurde aus *Gapdh*, *Actb* und *Rna18sn5* das am wenigsten regulierte Gen ausgewählt (P14: *Actb*; P28: *Rna18sn5*). Anschließend wurde aus den normalisierten Werten der Expressionsunterschied zwischen Probe und Kontroll-Mittelwert bestimmt und als Faktor (*fold induction*) dargestellt¹⁹⁶. Als Kontrollgruppen wurde die Gruppen P14 bzw. P28 WT NOX festgelegt. Die gewonnenen Werte wurden mithilfe der GraphPad Prism 7 Software statistisch analysiert und graphisch dargestellt.

$$\Delta Ct_{Probe} = Ct_{Zielgen(Probe)} - Ct_{HKG(Probe)}$$

$$\Delta Ct_{Kontrolle} = Ct_{Zielgen(Kontrolle)} - Ct_{HKG(Kontrolle)}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Probe} - \text{Mittelwert } \Delta Ct_{Kontrollen}$$

$$\text{fold induction} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$[Ct = \text{threshold cycle}]$$

Formel 2: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode zur Berechnung des relativen Unterschieds in der mRNA-Expression.

3.5 Methoden zur Untersuchung von Proteinexpression und Signalwegen

3.5.1 Proteinisolation und Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Proteinisolation für die Immunoblots wurden dem gefrorenen Lungengewebestück je nach Größe 100 bis 200 µl CHAPS-Puffer beigelegt. Der Puffer wurde unmittelbar vorher mit 1% Halt Protease-Inhibitor Cocktail versetzt. Nun erfolgte eine Homogenisierung durch Mörsern und Sonifizieren (3 Zyklen à 20 s, Power 50%). Die homogenisierten Proben wurden für 1 h auf Eis inkubiert und dabei alle 10 min gevortext. Anschließend wurde das Lysat zentrifugiert (15 min, 15000 UpM, 4 °C). Der dabei entstandene proteinhaltige Überstand wurde in ein neues *tube* überführt. Für die Zymographie wurde ein separates Proteinisolat hergestellt. Hierbei wurde analog zum beschriebenen Verfahren vorgegangen, jedoch wurde anstelle des CHAPS-Puffers PBS verwendet, um die Aktivität der Proteasen zu erhalten. Die Proteinkonzentrationen wurden für beide Isolate mithilfe des Pierce™ BCA Protein Assay Kits (Thermo Fisher Scientific) entsprechend dem zugehörigen Herstellerprotokoll bestimmt. Hierzu wurden Reagenz A und B des Kits im Verhältnis 1:50 gemischt. 200 µl des Gemischs wurden pro Well in eine 96-Well-Platte vorgelegt. Die Proteinproben wurden verdünnt (1:10) und gemeinsam mit der als Referenz dienenden Standardreihe [0 mg/ml bis 2 mg/ml bovines Serumalbumin (BSA)] jeweils zweifach auf die 96-Well-Platte aufgetragen. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37 °C wurde mit einem Infinite M 200 Pro Nanoquant (Tecan) die Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Aus den gemessenen Absorptionswerten wurden mithilfe der aus der BSA-Verdünnungsreihe generierten Standardkurve die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben berechnet. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

3.5.2 Immunoblot-Analyse

Der Immunoblot ist ein auf Antikörper-Antigen-Interaktion basierendes Verfahren, mit dem spezifische Proteine innerhalb eines Proteingemischs qualitativ oder semiquantitativ untersucht werden können¹⁹⁷⁻¹⁹⁹. Hierbei werden die Proteine initial mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) separiert, um dann auf eine Nitrozellulosemembran übertragen zu werden, wo schließlich der Nachweis mithilfe spezifischer Antikörper erfolgt^{175,198-200}. Zur Vorbereitung wurden die in CHAPS-Puffer isolierten Proteine aufgetaut, mit dem 5X SDS-PAGE Ladungspuffer versetzt und für 10 min bei 70 °C erwärmt. Die Proteinmenge pro Probe wurde dabei auf 20 µg normiert. Sammel- und Trenngel (4% bzw. 10-12 % Polyacrylamid) wurden hergestellt wie in Abschnitt 3.1.2 aufgeführt. Die Laufkammer des Gelsystems wurde mit 1X Laemmli-Puffer befüllt. Anschließend wurde das Sammelgel mit den vorbereiteten Proben beladen. Als Referenzmarker für die Proteingrößen wurde außerdem PageRuler™ Prestained Protein Ladder von Thermo Fisher Scientific aufgetragen. Nun wurden die Proteine elektrophoretisch getrennt (45 min bei 80 V, gefolgt von 3 h bei 120 V). Der Gelelektrophorese liegt folgendes Prinzip zugrunde: Das Erhitzen und die Behandlung mit SDS bewirken eine Denaturierung der Proteine; außerdem erhalten sie durch das an die Aminosäuren bindende SDS eine negative Gesamtladung, die ungefähr proportional zu ihrer Größe ist¹⁷⁵. Im elektrischen Feld wandern die Proteine umso schneller durch die Poren des Polyacrylamidgels zum Plus-Pol, je kleiner ihre Molekülmasse ist, sodass sich eine Trennung gemäß der Größe ergibt¹⁷⁵. Die derart separierten Proteine wurden mittels Semi-Dry-Blotting vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Hierzu wurde die Membran mit kaltem dH₂O (4 °C) aktiviert und gemeinsam mit den Gel-Blotting-Filterpapieren für 30 min im Transferpuffer (4 °C) inkubiert. Gel und Membran wurden gemeinsam mit je zwei Lagen Filterpapier darüber und darunter im Semi-Dry-Blotter platziert, wo der Proteintransfer erfolgte (2 h bei 1,3 mA/cm²). Zur Überprüfung eines regelrechten Transfers wurde eine Ponceau-Färbung der Membran durchgeführt. Um unspezifische Proteinbindungen zu vermeiden, wurde die Membran anschließend mit einer Blockierungslösung [5% Milchpulver + 2% BSA in TBST (*Tris buffered saline with Tween-20*)] behandelt. Nun wurde sie für 30 min bei RT sowie über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper inkubiert. Die Antikörper wurden entsprechend der Herstellerempfehlung mit 5% Milchpulver in TBST oder mit 5% BSA in TBST verdünnt. Eine Zuordnung des verwendeten Mediums und des Verdünnungsfaktors zu den jeweiligen Antikörpern findet sich im Anhang (vgl. Appendix 5). Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurde die Membran mit TBST (3 x 10 min) gewaschen und für 1 h bei RT mit dem *horseradish peroxidase* (HRP)-konjugierten sekundären Antikörper, verdünnt in 5% Milchpulver in TBST, inkubiert. Nachdem die Membran erneut mit TBST gewaschen wurde (3

x 10 min), erfolgte die Detektion der Proteinbanden durch Chemilumineszenz. Hierfür wurde das Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent Kit von GE Healthcare genutzt. Zur Detektion der Lumineszenz und zur Visualisierung der Banden wurden ein ChemiDoc XRS+ Imaging System und die Software Image Lab™ von Bio-Rad-Laboratories GmbH verwendet.

Teilweise wurden mehrere Proteine auf derselben Membran analysiert. Um bereits gebundene Antikörper durch Spaltung der Disulfidbrücken wieder abzulösen, wurde die Membran mit einem β -Mercaptoethanol (β -ME)-haltigen Stripping-Puffer für 15 min in einem 56 °C warmem Wasserbad inkubiert und 3 x 10 min in TBST gewaschen. Daraufhin wurde die Membran erneut blockiert (90 min) und es wurde ein neuer Primärantikörper appliziert. Anschließend wurde weiter verfahren wie oben beschrieben.

Die semiquantitative Analyse der Immunoblots erfolgte densitometrisch. Die Dichte der Proteinbanden wurde mithilfe des Programms Image Lab™ (Bio-Rad-Laboratories GmbH) gemessen. Zur Normalisierung wurde ein Quotient aus der Dichte des untersuchten Proteins mit der Ladungskontrolle (β -Actin) gebildet. Die ermittelten Werte wurden mithilfe von GraphPad Prism 7 statistisch untersucht und graphisch dargestellt.

3.5.3 Zymographie

Die Zymographie ist eine Methode zur Untersuchung proteolytischer Enzyme, die auf der Degradation eines Substrats innerhalb eines SDS-haltigen Gels basiert^{201,202}. Die Ausdehnung der dabei entstehenden Banden kann mithilfe einer Coomassie-Blau-Färbung sichtbar gemacht werden und erlaubt Rückschlüsse auf die proteolytische Aktivität innerhalb der Probe^{201,202}. Zuerst wurden die Proteasen mittels SDS-PAGE separiert. Hierzu wurde das in PBS isolierte Protein für 10 min bei RT mit dem 3,5X Ladungspuffer inkubiert. Es wurde eine Gesamtmenge von 30 μ g Protein pro Probe verwendet. Nach der Befüllung der Laufkammer mit 1X Laemmli-Puffer wurde das Sammelgel mit den Proben sowie mit PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific) als Referenz für die Molekülmassen beladen. Sammelgel und Trenngel wurden hergestellt wie in Abschnitt 3.1.2 dargestellt. Das Trenngel wurde hierbei mit 0,1% Gelatine als Substrat für die untersuchten Proteasen, MMP-2 und -9, versetzt. MMP-2 und -9 besitzen eine ausgeprägte Gelatinase-Aktivität²⁰³. Nach der Elektrophorese (30 min bei 80 V, gefolgt von 1 h bei 120 V) wurde das Trenngel für 30 min bei RT in 1X Renaturierungspuffer inkubiert. Durch das im Puffer enthaltene Triton X 100 wird das SDS entfernt²⁰⁴. Nun erfolgte eine Inkubation des Gels mit dem Entwicklungspuffer; erst für 30 min bei RT, dann über Nacht bei 37 °C in frischem Puffer. Um die während der Entwicklung stattfindende Degradation der Gelatine sichtbar zu machen,

wurde das Gel anschließend für 30 min bei RT in der Coomassie-Färbelösung inkubiert. Überschüssige Färbelösung wurde durch Waschen in dH₂O entfernt. Das dargestellte Bandenmuster wurde durch UV-Transillumination mithilfe eines ChemiDoc XRS+ Imaging Systems sowie der Software Image Lab™ (Bio-Rad-Laboratories GmbH) dokumentiert. Die Banden wurden semiquantitativ densitometrisch analysiert. Hierzu wurde mit dem Programm Image Lab™ erst ein Negativbild des Zymogramms erzeugt, woraufhin die Bandendichte gemessen wurde. Zur statistischen Untersuchung und graphischen Darstellung der Messwerte wurde GraphPad Prism 7 verwendet.

3.6 Statistische Analyse und graphische Darstellung der Ergebnisse

Für die statistischen Analysen und die graphische Darstellung der Ergebnisse wurde die Software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software) verwendet. Zum Vergleich zweier Gruppen wurde ein Mann-Whitney-U-Test eingesetzt. Hierbei wurde ein Signifikanzniveau von 0,05 festgelegt. In der graphischen Darstellung wurden die Werte als Mittelwert \pm Standardfehler (*standard error of the mean*; SEM) abgebildet und signifikante Ergebnisse wie folgt gekennzeichnet: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

4 Ergebnisse

4.1 P14 – Einfluss der CXCL10-Defizienz auf die akute Lungenschädigung durch die Hyperoxie

Die Phase der akuten Lungenschädigung durch die Hyperoxie wurde entsprechend des oben dargestellten Versuchsaufbaus anhand des Zeitpunkts P14 untersucht. Bis dahin waren die Mäuse der Interventionsgruppen (WT HYX und *Cxcl10*^{-/-} HYX) durchgängig der Hyperoxie ausgesetzt. Untersuchungsergebnisse am P14 reflektieren somit die Vorgänge und Veränderungen in der murinen Lunge, die während der fortdauernden schädigenden Einwirkung der Hyperoxie abgelaufen sind (vgl. Abbildung 6; vgl. 3.2).

4.1.1 Einfluss der CXCL10-Defizienz auf das Lungenwachstum unter Hyperoxie

4.1.1.1 Alveoläres Wachstum

Um das alveoläre Wachstum während der Hyperoxie-Exposition zu analysieren, wurden *radial alveolar count* (RAC), *mean linear intersept* (MLI) und die durchschnittliche Oberfläche einer einzelnen Alveole nach dem oben erläuterten Vorgehen bestimmt (vgl. 3.3.5).

Am postnatalen Tag 14 (P14) war der RAC als Maß des alveolären Wachstums bei den Hyperoxie-exponierten Wildtypen (WT HYX) im Vergleich zu den Normoxie-Kontrollen (WT NOX) signifikant vermindert. Der MLI und die Oberfläche der einzelnen Alveole, die jeweils invers mit der gesamtalveolären Oberfläche (*alveolar surface area*) korreliert sind, waren erhöht. Die untersuchten Surrogatparameter zeigen eine alveoläre Rarefizierung und somit eine alveoläre Wachstumsstörung sowie die damit einhergehende emphysemartige Alveolenarchitektur unter Hyperoxie an (vgl. Abbildung 9).

Bei den CXCL10-defizienten Tieren (*Cxcl10*^{-/-} HYX) zeigte sich unter Hyperoxie im Vergleich zu den Wildtypen (WT HYX) ein geringfügig, aber signifikant erhöhter RAC. Für den MLI konnte kein Unterschied festgestellt werden. Die Oberfläche der einzelnen Alveole war bei den Hyperoxie-exponierten Knockout-Tieren (*Cxcl10*^{-/-} HYX) im Vergleich zu den Wildtypen (WT HYX) verringert. Die CXCL10-Defizienz hatte demnach eine verbesserte Alveologenese unter Hyperoxie zur Folge (vgl. Abbildung 9).

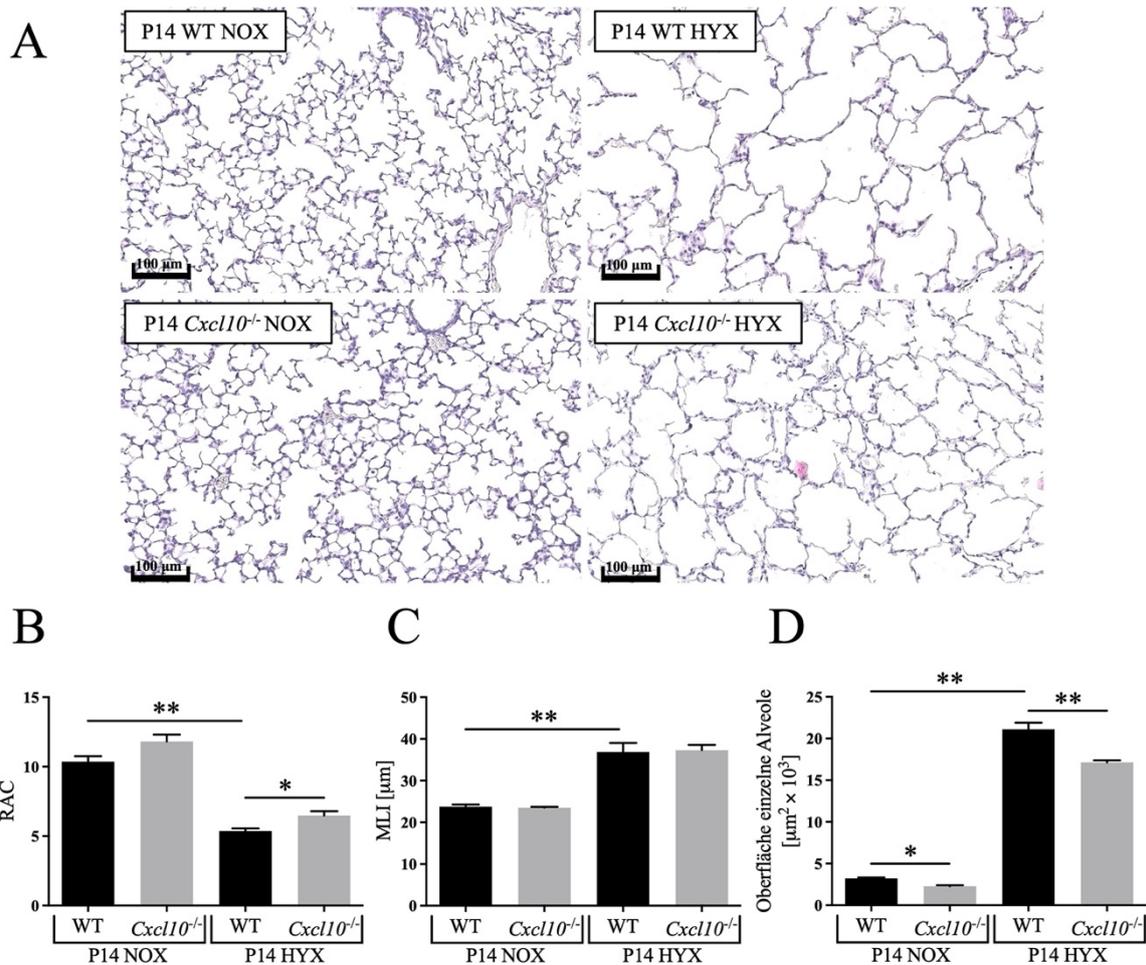


Abbildung 9: Verbesserte Alveolarisierung unter Hyperoxie bei CXCL10-Defizienz. A: repräsentative Lungenschnitte vom P14 gefärbt mit Hämatoxylin-Eosin; Vergrößerung = 20X; Maßstab = 100 µm. B-D: Ergebnisse der Analysen von *radial alveolar count* (RAC; A), *mean linear intercept* (MLI; B) und durchschnittlicher Oberfläche der einzelnen Alveole (C); n = 3-6/Gruppe; Mann-Whitney-Test; MW ± SEM; *p<0,05; **p<0,01. Abkürzungen: WT = Wildtyp; *Cxcl10*^{-/-} = *Cxcl10*-Knockout; NOX = Normoxie (21% O₂); HYX = Hyperoxie (85% O₂); P14 = postnataler Tag 14.

4.1.1.2 Zellüberleben und Homöostase der Alveolarepithelzellen

Zellproliferation und -überleben sind für die Integrität und das Wachstum der Lunge von großer Bedeutung. Darum haben wir neben den morphologischen Wachstumsparametern auch Apoptose und Proliferation in der Hyperoxie-exponierten Lunge untersucht. Ein besonderer Fokus lag auf der Homöostase der ATII-Zellen, die durch ihre Progenitorzellfunktion ein wichtiger Motor des Wachstums der Lunge und ihrer Regeneration nach Schädigung sind (vgl. 2.2)^{29,30}.

Apoptotische Zellen wurden mithilfe eines TUNEL-Assays fluoreszenzmikroskopisch im Gewebeschnitt visualisiert. Durch eine Immunfluoreszenzfärbung auf proSFTPC wurden

außerdem ATII-Zellen markiert. Zur Gegenfärbung der DNA wurde DAPI verwendet. Die apoptotischen Zellen im Gewebeschnitt wurden manuell ausgezählt und auf 100 Zellen normalisiert (vgl. 3.3.8).

In der Gruppe der Hyperoxie-exponierten Wildtypen (WT HYX) war die Anzahl apoptotischer Zellen (TUNEL+) gegenüber der Normoxie-Gruppe (WT NOX) signifikant erhöht. Die isolierte Betrachtung zeigte zudem eine gesteigerte Anzahl apoptotischer ATII-Zellen (TUNEL+ und proSFTPC+) unter Hyperoxie (vgl. Abbildung 10).

Im Vergleich mit den Wildtypen (WT HYX) waren die CXCL10-defizienten Mäuse (*Cxcl10*^{-/-} HYX) partiell vor der vermehrten Apoptose unter Hyperoxie geschützt. So waren im pulmonalen Gewebeschnitt signifikant weniger apoptotische Zellen (TUNEL+) nachweisbar. Für die Anzahl apoptotischer ATII-Zellen (TUNEL+ und proSFTPC+) war eine Reduktion angedeutet. Der Unterschied war statistisch jedoch nicht signifikant (vgl. Abbildung 10).

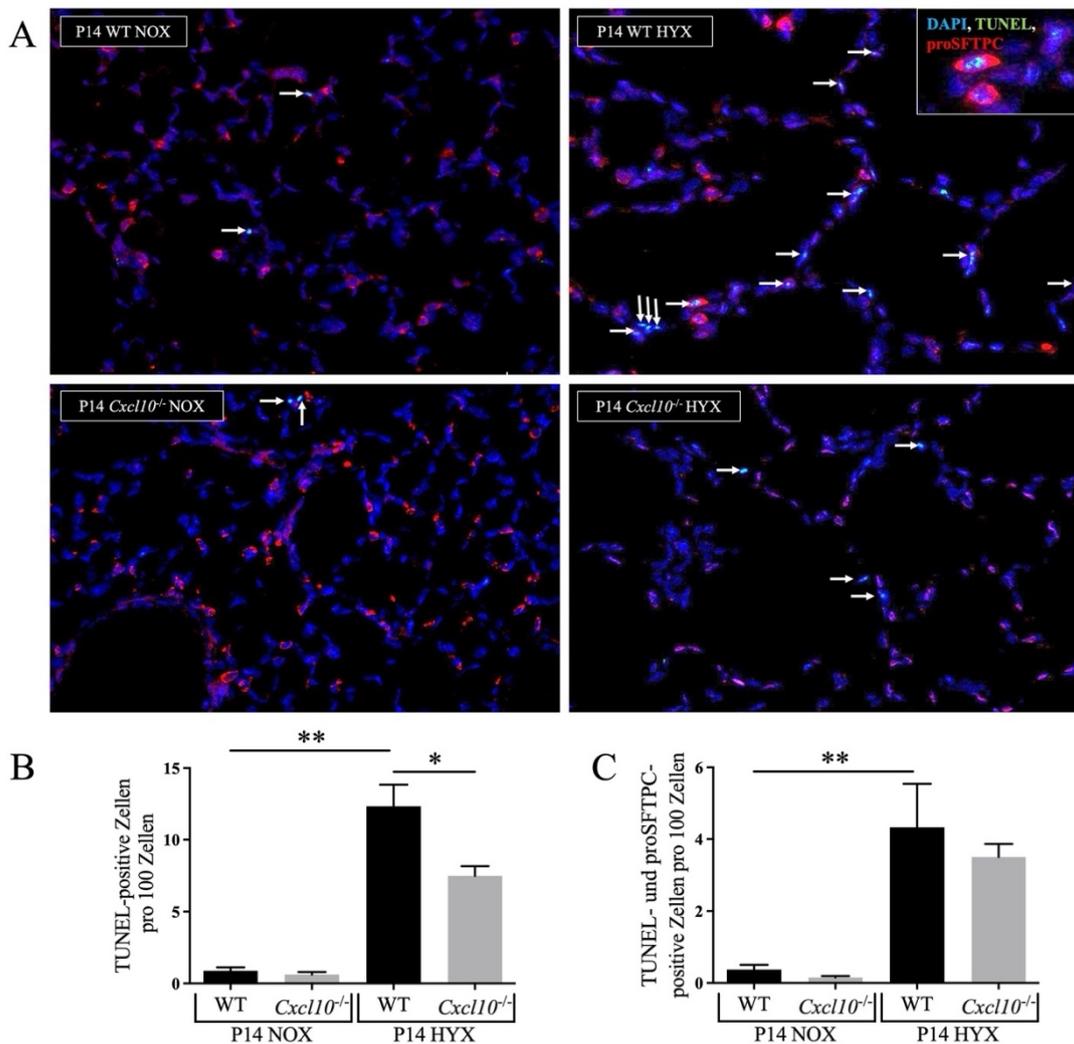


Abbildung 10: CXCL10-Defizienz schützt vor Apoptose unter Hyperoxie. A: TUNEL-Assay und pro-Surfactant-Protein-C (proSFTPC)-Immunfluoreszenz repräsentativer Lungenschnitte am P14; DNA-Gegenfärbung mit DAPI; Vergrößerung = 40X. B, C: Quantifizierung TUNEL-positiver Zellen (B) sowie TUNEL- und proSFTPC-positiver Zellen (C) pro 100 Zellen; n = 3-5/Gruppe; Mann-Whitney-Test; MW ± SEM; *p<0,05; **p<0,01. Abkürzungen: WT = Wildtyp; TUNEL = *terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling*; *Cxcl10*^{-/-} = *Cxcl10*-Knockout; NOX = Normoxie (21% O₂); HYX = Hyperoxie (85% O₂); P14 = postnataler Tag 14.

Neben der apoptotischen haben wir auch die proliferative Aktivität im Lungengewebe betrachtet. Zum einen wurde die Proliferation durch Auszählung Ki67-positiver Zellen in der Immunfluoreszenz untersucht (vgl. 3.3.7). Zum anderen erfolgte eine Analyse des Proliferationsmarkers PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) mittels Immunoblot.

Beide Verfahren zeigten unter Hyperoxie eine im Vergleich zur Normoxie gesteigerte Proliferation. Im Gegensatz zur Apoptose konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Hyperoxie-exponierten Wildtypen (WT HYX) und Knockout-Mäusen (*Cxcl10*^{-/-} HYX) festgestellt

werden (vgl. Abbildung 11). Aufgrund des fehlenden Unterschieds haben wir auf eine gesonderte Untersuchung der ATII-Zellen verzichtet.

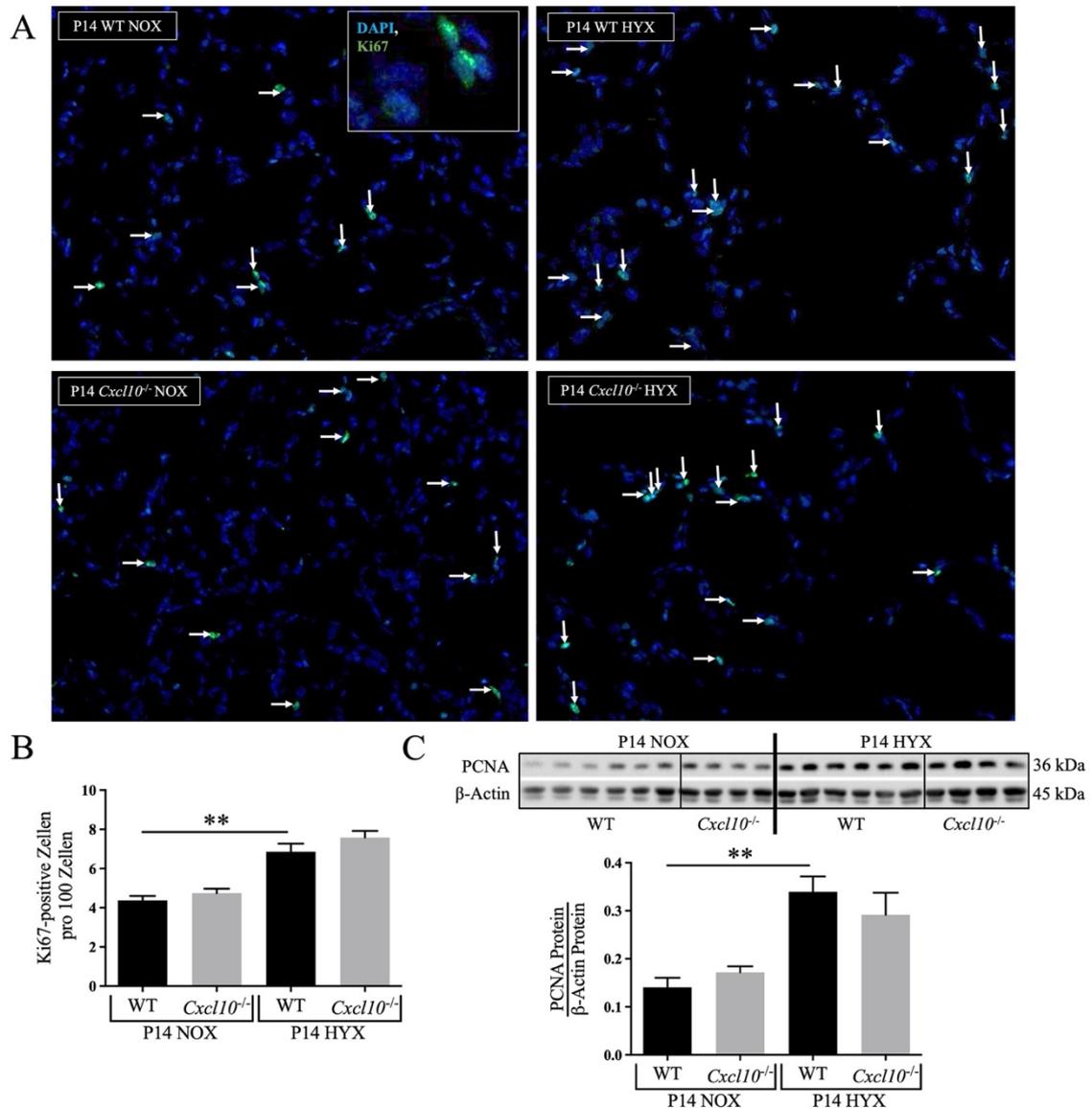


Abbildung 11: Gesteigerte Zellproliferation bei Hyperoxie-Exposition. A: Ki67-Immunfluoreszenz repräsentativer Lungenschnitte vom P14; DNA-Gegenfärbung mit DAPI; Vergrößerung = 40X. B: Quantifizierung Ki67-positiver Zellen normalisiert auf 100 Zellen. C: Proteinexpression des Proliferationsmarkers PCNA in der Lunge am P14; repräsentativer Immunoblot mit densitometrischer Auswertung in Relation zu β -Actin (Ladungskontrolle). B, C: n = 3-6/Gruppe (B) bzw. 4-6/Gruppe (C); Mann-Whitney-Test; MW \pm SEM; *p<0,05; **p<0,01. Abkürzungen: WT = Wildtyp; *Cxcl10*^{-/-} = *Cxcl10*-Knockout; NOX = Normoxie (21% O₂); HYX = Hyperoxie (85% O₂); P14 = postnataler Tag 14.

Zur genaueren Beurteilung der AEC-Homöostase bei CXCL10-Defizienz wurde die Expression alveolarepithelialer Marker in der Lunge auf mRNA- und Protein-Ebene untersucht. Hierbei wurden Aquaporin 5 (AQP5) sowie verschiedene Surfactant-Proteine (SFTP) als Marker der AEC herangezogen^{205,206}

Die Genexpression der untersuchten AEC-Marker war bei den Wildtypen in der Hyperoxie-Gruppe (WT HYX) im Vergleich zur Normoxie-Kontrolle (WT NOX) nicht signifikant verändert (vgl. Abbildung 12).

Interessanterweise zeigten die CXCL10-defizienten Tiere unter Normoxie (*Cxcl10*^{-/-} NOX) verglichen mit den Wildtypen (WT NOX) eine verminderte Expression von *Sftpa*, *-b* und *-d* sowie eine angedeutete, aber nicht signifikante Reduktion in der *Aqp5*-Expression. Es lag also ein Verlust mehrerer AEC-Marker vor. Unter Hyperoxie unterschied sich die mRNA-Expression der untersuchten Gene zwischen Knockouts (*Cxcl10*^{-/-} HYX) und Wildtypen (WT HYX) nicht wesentlich (vgl. Abbildung 12).

Im Gegensatz zu den Wildtypen (s.o.) hatte die Hyperoxie-Exposition bei den CXCL10-defizienten Tieren einen signifikanten Einfluss auf die mRNA-Expression der AEC-Marker. So war die Expression von *Aqp5*, *Sftpb* und *Sftpd* unter Hyperoxie (*Cxcl10*^{-/-} HYX) im Vergleich zur Normoxie (*Cxcl10*^{-/-} NOX) gesteigert, während *Sftpa* vermindert exprimiert wurde (vgl. Abbildung 12).

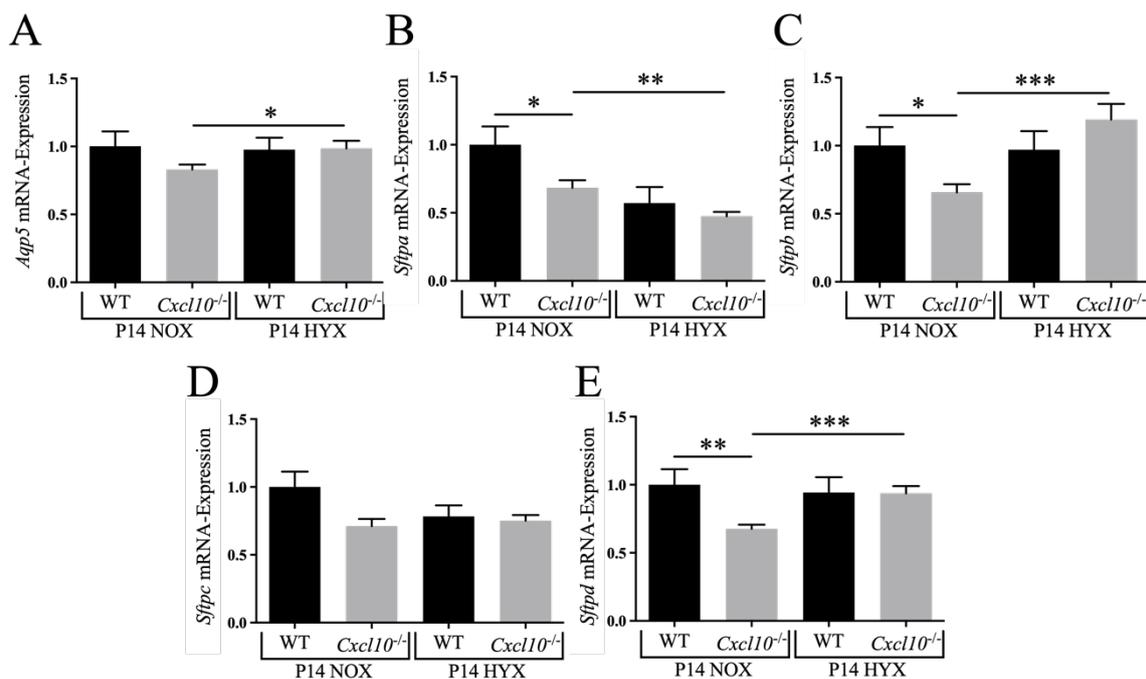


Abbildung 12: CXCL10 beeinflusst die mRNA-Expression alveolarepithelialer Marker in der Lunge. A-E: Relative mRNA-Expression der Alveolarepithelzell-Marker *Aqp5* (A), *Sftpa* (B), *Sftpb* (C), *Sftpc* (D) und *Sftpd* (E) in der Lunge am P14; n = 6-9/Gruppe; Mann-Whitney-Test; MW ± SEM; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. Abkürzungen: *Aqp5* = Aquaporin 5; *Sftp* = Surfactant-Protein; WT = Wildtyp; *Cxcl10*^{-/-} = *Cxcl10*-Knockout; NOX = Normoxie (21% O₂); HYX = Hyperoxie (85% O₂); P14 = postnataler Tag 14.

Der Immunoblot zeigte bei den Wildtypen unter Hyperoxie (WT HYX) eine signifikant erhöhte Proteinkonzentration von proSFTPC im Vergleich zur Normoxie-Kontrolle (WT NOX). Dies deutet darauf hin, dass bis zum P14 unter Hyperoxie eine Vermehrung der Alveolarepithelzellen (v.a. ATII-Zellen²⁰⁶) stattgefunden hat. AQP5-Protein (ATI-Marker²⁰⁵) war unter Hyperoxie angedeutet, aber nicht signifikant reduziert (vgl. Abbildung 13).

Bei den CXCL10-defizienten Tieren führte die Hyperoxie (*Cxcl10*^{-/-} HYX) nicht zu einer Zunahme von proSFTPC im Vergleich zur Normoxie Gruppe (*Cxcl10*^{-/-} NOX). Insgesamt war die Proteinexpression von proSFTPC bei den Knockout-Tieren (*Cxcl10*^{-/-} HYX) in Relation zu den Wildtypen (WT HYX) unter Hyperoxie signifikant vermindert (vgl. Abbildung 13).

Die Ergebnisse legen nahe, dass CXCL10 die Homöostase der AEC auf komplexe Art und Weise beeinflusst.

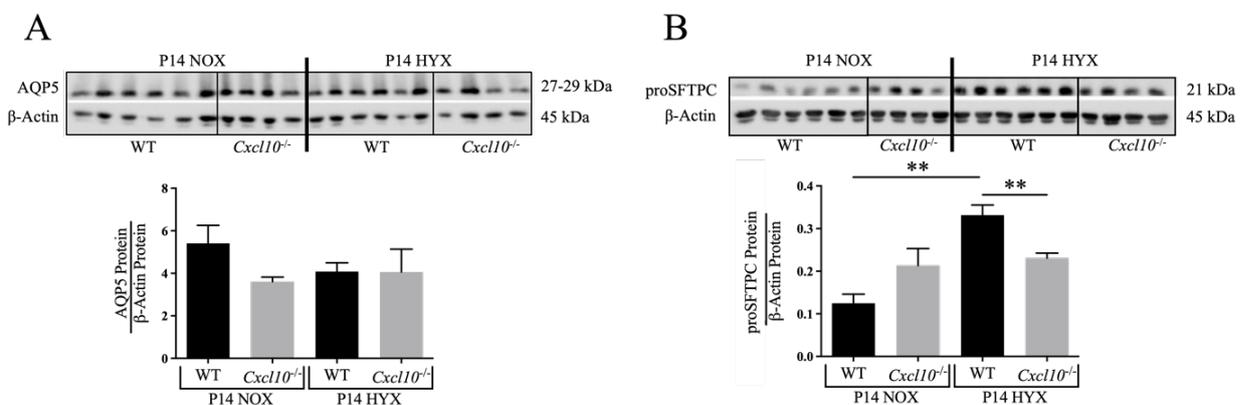


Abbildung 13: CXCL10-Defizienz verändert Expression von pro-Surfactant-Protein-C unter Hyperoxie. Proteinexpression der alveolarepithelialen Marker Aquaporin 5 (AQP5) und pro-Surfactant-Protein-C (proSFTPC) zum Zeitpunkt P14. A, B: Repräsentative Immunoblots mit densitometrischer Auswertung in Relation zu β -Actin (Ladungskontrolle) für AQP5 (A) und proSFTPC (B); n = 4-6/Gruppe; Mann-Whitney-Test; MW \pm SEM; *p<0,05; **p<0,01. Abkürzungen: WT = Wildtyp; *Cxcl10*^{-/-} = *Cxcl10*-Knockout; NOX = Normoxie (21% O₂); HYX = Hyperoxie (85% O₂); P14 = postnataler Tag 14.

4.1.1.3 Angiogenese

Die Vaskularisierung der Lunge am P14, die als Momentaufnahme die Angiogenese während der Lungenschädigung durch die Hyperoxie widerspiegelt, wurde mit zwei Methoden untersucht. Zum einen erfolgte eine manuelle Auszählung der Blutgefäße im pulmonalen Gewebeschnitt. Hierbei wurde durch eine vWF-Immunhistochemie die korrekte Identifizierung der Blutgefäße sichergestellt (vgl. 3.3.6). Zum anderen wurde mittels Immunoblot der Proteingehalt des Endothelmarkers VE-Cadherin in der Lunge analysiert.

Bei den Hyperoxie-exponierten Wildtypen (WT HYX) war die Anzahl an Blutgefäßen im Lungengewebe im Vergleich zur Normoxie-Kontrolle (WT NOX) signifikant vermindert.

Insbesondere wurden weniger Gefäße <20 µm gezählt (vgl. Abbildung 14). Passend zur reduzierten Gefäßanzahl war auch die Protein-Konzentration von VE-Cadherin in der Hyperoxie-Gruppe reduziert (vgl. Abbildung 15). Den Ergebnissen ist eine Beeinträchtigung der Angiogenese unter Hyperoxie zu entnehmen.

Bei den CXCL10-defizienten Mäusen (*Cxcl10*^{-/-} HYX) war im Vergleich zu den Wildtypen (WT HYX) die Gesamtanzahl an Gefäßen bis 100 µm nach Hyperoxie-Exposition erhöht. Die separate Betrachtung der Gefäße <20 µm bzw. ≥20-100 µm zeigte keine signifikanten Unterschiede, aber einen Trend zugunsten der Knockout-Tiere (vgl. Abbildung 14). Der protektive Effekt der CXCL10-Defizienz bestätigte sich im Immunoblot nicht. Hier zeigten die Knockout-Tiere (*Cxcl10*^{-/-} HYX) verglichen mit den Wildtypen (WT HYX) sogar einen aggravierten Verlust des Endothelmarkers VE-Cadherin bei Hyperoxie-Exposition (vgl. Abbildung 15).

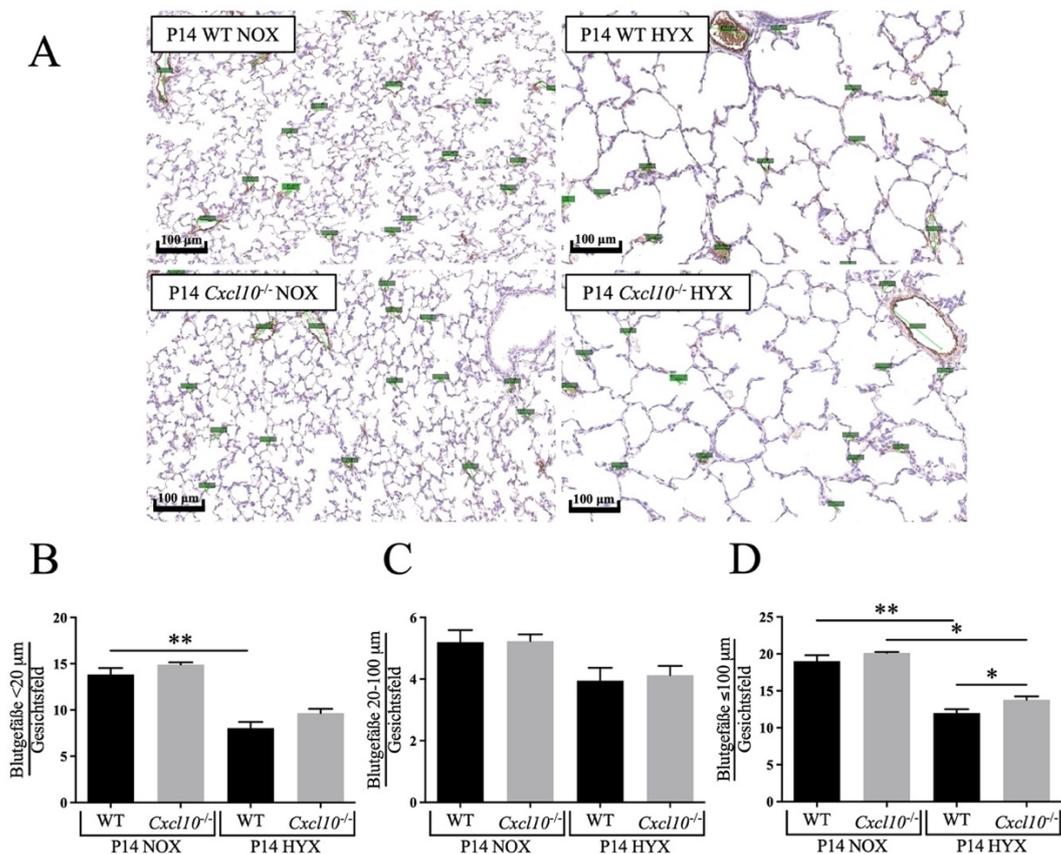


Abbildung 14: Erhöhte pulmonale Gefäßanzahl unter Hyperoxie bei CXCL10-Defizienz. A: repräsentative Lungenschnitte mit vWF-Immunhistochemie und Hämatoxylin-Hintergrundfärbung; P14; Vergrößerung = 20X; Maßstab = 100 µm. B-D: Ergebnisse der Auszählung für die Gefäße <20 µm (B) bzw. ≥20-100 µm (C) sowie Ergebnisse der Gesamtanzahl an Gefäßen bis 100 µm (D); Auszählung pro Gesichtsfeld; n = 3-6/Gruppe; Mann-Whitney-Test; MW ± SEM; *p<0,05; **p<0,01. Abkürzungen: vWF = von-Willebrand-Faktor; WT = Wildtyp; *Cxcl10*^{-/-} = *Cxcl10*-Knockout; NOX = Normoxie (21% O₂); HYX = Hyperoxie (85% O₂); P14 = postnataler Tag 14.

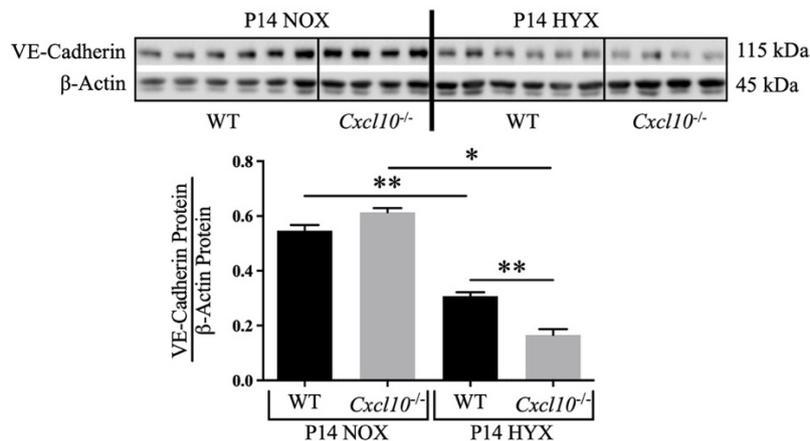


Abbildung 15: CXCL10-Defizienz aggraviert Verlust von Endothelmarkern unter Hyperoxie. Proteinexpression des endothelialen Markers VE-Cadherin in der Lunge am P14. Repräsentativer Immunoblot mit densitometrischer Auswertung in Relation zu β -Actin (Ladungskontrolle); n = 4-6/Gruppe; Mann-Whitney-Test; MW \pm SEM; *p<0,05; **p<0,01. Abkürzungen: WT = Wildtyp; *Cxcl10*^{-/-} = *Cxcl10*-Knockout; NOX = Normoxie (21% O₂); HYX = Hyperoxie (85% O₂); P14 = postnataler Tag 14.

4.1.2 Einfluss der CXCL10-Defizienz auf die extrazelluläre Matrix und deren Umbau unter Hyperoxie

4.1.2.1 Zusammensetzung der extrazellulären Matrix

Die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (EZM) haben wir für den P14 zuerst Histologie-basiert untersucht. Als Surrogatparameter für den Grad der Fibrose wurde die Septumdicke gemessen (vgl. 3.3.5). Zudem wurden wichtige Bestandteile der pulmonalen EZM – Kollagen und elastische Fasern – im Gewebeschnitt mithilfe spezieller Färbetechniken demaskiert und anschließend quantifiziert. Zur Anfärbung des Kollagens wurde Picro Sirius-Red verwendet (vgl. 3.3.3). Die elastischen Fasern wurden nach Hart gefärbt (vgl. 3.3.4). Die Auswertung erfolgte für die absolute Fläche der angefärbten Fasern sowie für ihren Flächenanteil am Gesamtgewebe.

Bei den Wildtypen zeigten sich unter Hyperoxie-Exposition (WT HYX) im Vergleich zu den Normoxie-Kontrollen (WT NOX) deutlich verbreiterte interalveoläre Septen. Zudem war unter Hyperoxie ein stark gesteigerter Kollagengehalt nachweisbar (vgl. Abbildung 16). Die Ergebnisse weisen auf einen fibrotischen Umbau der Lungenmatrix nach Hyperoxie-Exposition hin.

Bei den Knockout-Mäusen (*Cxcl10*^{-/-} HYX) war die Zunahme der Septumdicke unter Hyperoxie signifikant milder ausgeprägt als bei den Wildtypen (WT HYX). Auch deutete sich eine Verminderung des Kollagengehalts an, wobei der Unterschied statistisch nicht signifikant war (vgl. Abbildung 16). Insgesamt hatte die CXCL10-Defizienz in unserem Experiment also einen protektiven Effekt in Bezug auf die Hyperoxie-induzierte Fibrose.

A

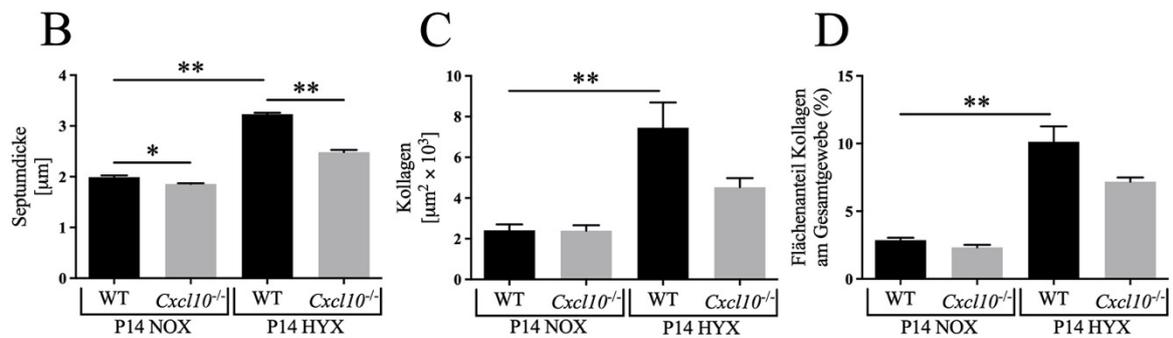
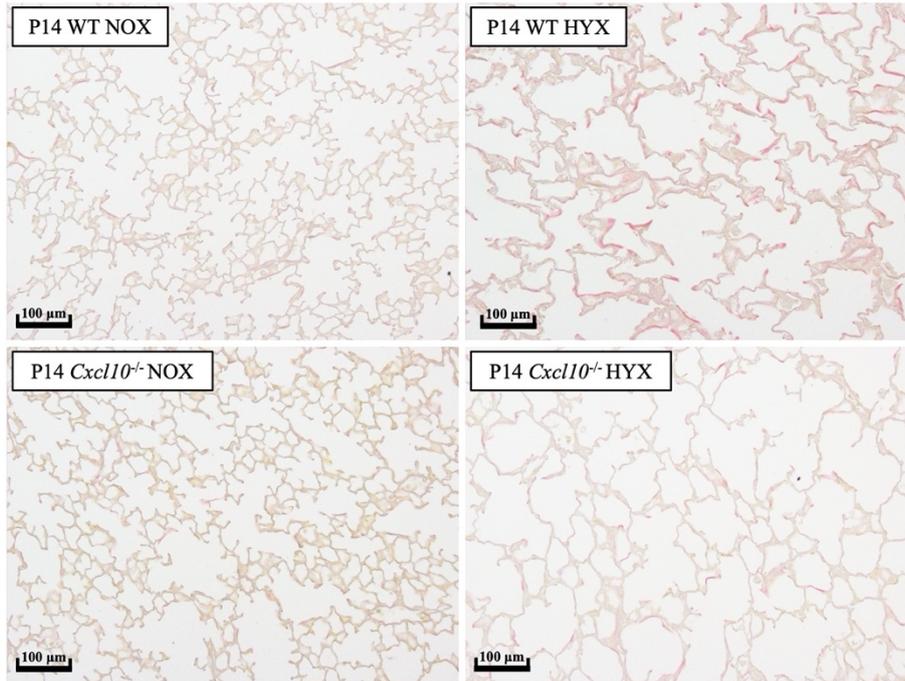


Abbildung 16: Schutz vor Hyperoxie-induzierter Fibrose bei CXCL10-Defizienz. A: Picro Sirius-Red-Färbung repräsentativer Lungenschnitte vom P14; Vergrößerung = 20X; Maßstab = 100 µm. B: Septumdicke zum Zeitpunkt P14. C, D: Quantifizierung der Sirius-Red-positiven Fläche (= Kollagen) als Absolutwert (C) sowie als Flächenanteil am Gesamtgewebe (D). B-D: n = 3-6/Gruppe; Mann-Whitney-Test; MW ± SEM; *p<0,05; **p<0,01. Abkürzungen: WT = Wildtyp; *Cxcl10*^{-/-} = *Cxcl10*-Knockout; NOX = Normoxie (21% O₂); HYX = Hyperoxie (85% O₂); P14 = postnataler Tag 14.

Sowohl bei den Wildtypen (WT HYX) als auch bei den Knockout-Mäusen (*Cxcl10*^{-/-} HYX) führte die Hyperoxie-Exposition zu einem Verlust elastischer Fasern. Ein signifikanter Unterschied bestand zwischen Wildtyp- und Knockout-Tieren im Hinblick auf die elastischen Fasern nicht (vgl. Abbildung 17).

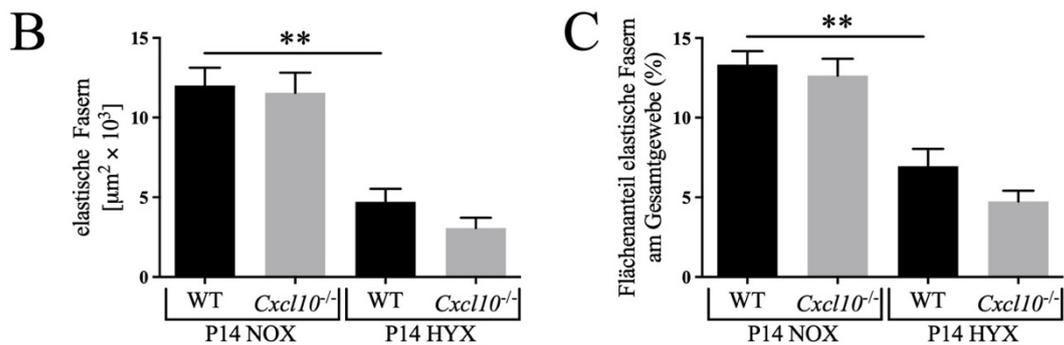
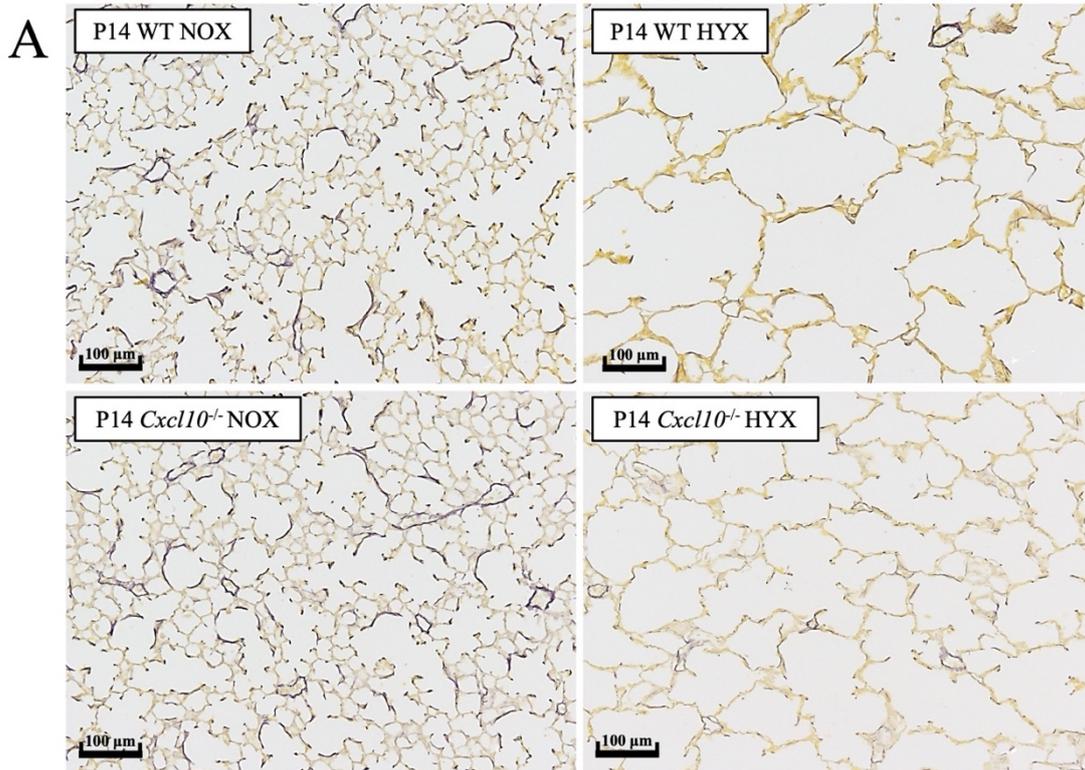


Abbildung 17: Verlust elastischer Fasern bei Hyperoxie-Exposition. A: Elastika-Färbung nach Hart repräsentativer Lungenschnitte vom P14; Vergrößerung = 20X; Maßstab = 100 μm . B, C: Quantifizierung der Hart-positiven Fläche (= elastische Fasern) als Absolutwert (B) sowie als Flächenanteil am Gesamtgewebe (C); n = 3-6/Gruppe; Mann-Whitney-Test; MW \pm SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Abkürzungen: WT = Wildtyp; *Cxcl10*^{-/-} = *Cxcl10*-Knockout; NOX = Normoxie (21% O₂); HYX = Hyperoxie (85% O₂); P14 = postnataler Tag 14.

4.1.2.2 Kollagen-Neubildung

Da wir in der Histologie-basierten Analyse bei den CXCL10-defizienten Mäusen Anzeichen einer verminderten Fibrose unter Hyperoxie finden konnten (vgl. 4.1.2.1), haben wir im nächsten Schritt mögliche Ursachen hierfür überprüft. Zuerst haben wir untersucht, ob die Kollagen-Neubildung verändert ist. Hierzu wurde die Expression von α smooth muscle actin (α -SMA; Genname: *Actin alpha 1/Acta1*) betrachtet. α -SMA wird von Myofibroblasten

exprimiert, die durch die Bildung von Kollagen zur Gewebereparatur beitragen, bei Dysregulation aber auch eine Fibrose hervorrufen können^{96,97}. Zudem wurde die mRNA-Expression verschiedener Kollagene (*Col1a1*, *Col3a1*, *Col4a4*) in der Lunge untersucht.

Bei den Hyperoxie-exponierten Wildtypen (WT HYX) war die Expression von α -SMA im Vergleich zur Normoxie-Kontrolle (WT NOX) sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene gesteigert (vgl. Abbildung 18). Dies ist mit einer Vermehrung intrapulmonaler Myofibroblasten vereinbar. Die Kollagenexpression am untersuchten Zeitpunkt unterschied sich zwischen Hyperoxie- (WT HYX) und Normoxie-Gruppe (WT NOX) nicht (vgl. Abbildung 19).

Bei den CXCL10-defizienten Tieren (*Cxcl10*^{-/-} HYX) zeigte sich unter Hyperoxie eine ähnlich starke Expressionssteigerung von α -SMA wie bei den Wildtypen (WT HYX) (vgl. Abbildung 18). Auch die Genexpression der untersuchten Kollagene unterschied sich nicht wesentlich von der der Wildtypen. Zwar war die Expression von *Col1a1* bei den Knockout-Mäusen (*Cxcl10*^{-/-} HYX) unter Hyperoxie im Vergleich zu den Wildtypen (WT HYX) signifikant erhöht, allerdings war die Ausprägung des Effekts gering (vgl. Abbildung 19). Insgesamt konnten wir somit keine Hinweise auf eine relevant veränderte Kollagen-Synthese bei CXCL10-Defizienz finden.

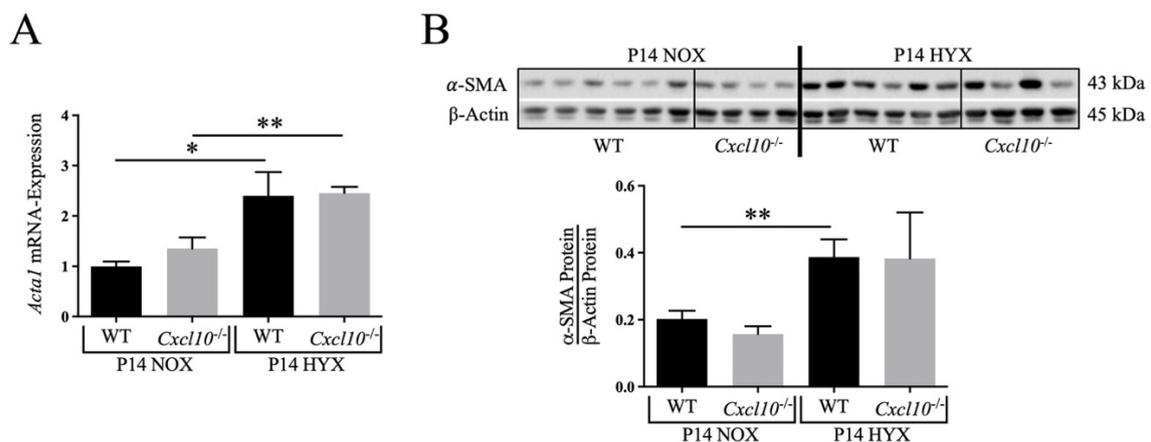


Abbildung 18: Hyperoxie fördert Expansion von Myofibroblasten in der Lunge. Expression des Myofibroblasten-Markers α -SMA/*Acta1* in der Lunge am P14. A: relative mRNA-Expression von *Acta1*. B: repräsentative Immunoblots mit densitometrischer Auswertung in Relation zu β -Actin (Ladungskontrolle) für α -SMA. A, B: n = 6-9/Gruppe (A) bzw. n = 4-6/Gruppe(B); Mann-Whitney-Test; MW \pm SEM; *p<0,05; **p<0,01. Abkürzungen: WT = Wildtyp; *Cxcl10*^{-/-} = *Cxcl10*-Knockout; NOX = Normoxie (21% O₂); HYX = Hyperoxie (85% O₂); P14 = postnataler Tag 14.

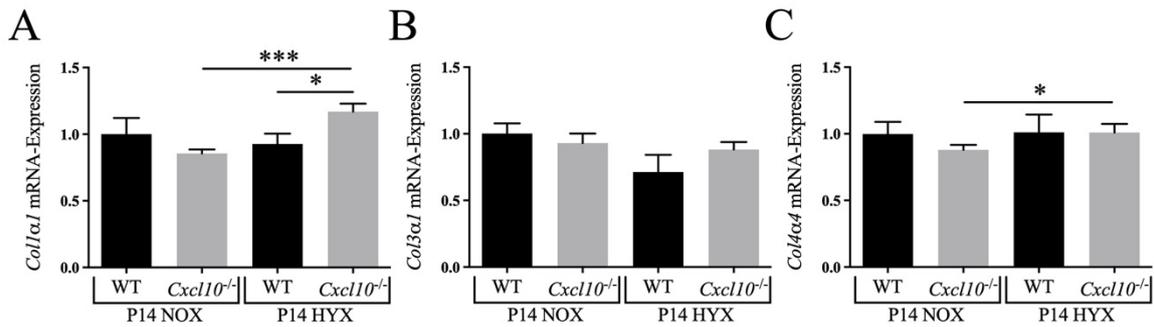


Abbildung 19: Kollagenexpression in der murinen Lunge. Relative mRNA-Expression von *Col1a1* (A), *Col3a1* (B) und *Col4a4* (C) in der Lunge am P14; n = 6-9/Gruppe; Mann-Whitney-Test; MW ± SEM; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. Abkürzungen: WT = Wildtyp; *Cxcl10*^{-/-} = *Cxcl10*-Knockout; NOX = Normoxie (21% O₂); HYX = Hyperoxie (85% O₂); P14 = postnataler Tag 14.

4.1.2.3 Profibrotische Signalwege

Nachdem die Untersuchung der Kollagen-Neubildung keine hinreichende Erklärung für die abgemilderte Hyperoxie-induzierte Fibrose bei CXCL10-Defizienz liefern konnte (vgl. 4.1.2.2), haben wir im nächsten Schritt den TGF-β-Signalweg untersucht. TGF-β fördert die Akkumulation von EZM und wirkt damit profibrotisch^{19,102,207}. In früheren tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass Hyperoxie eine vermehrte Aktivierung des TGF-β-Signalwegs in der Lunge hervorruft¹⁹. TGF-β vermittelt seine Effekte über membranständige Rezeptoren^{102,207}. Die Rezeptorbindung bewirkt intrazellulär die Phosphorylierung verschiedener SMAD-Proteine [benannt nach dem Gen *Sma* von *Caenorhabditis elegans* und dem Drosophila-Gen *Mad* (*mothers against decapentaplegic*)], die dann in den Zellkern translozieren und die Expression der Zielgene regulieren^{102,207,208}.

Um Rückschlüsse auf die TGF-β-Signalkaskade ziehen zu können, haben wir die mRNA-Expression von *Tgfb* selbst betrachtet. Zur genaueren Analyse der Aktivität haben wir dann die Phosphorylierung des *second messenger* SMAD2 quantifiziert. Zudem haben wir die Zielgen-Expression anhand des *connective tissue growth factor* (CTGF; Gen: *cellular communication network factor 2/Ccn2*) untersucht.

Bei den Wildtypen zeigten die genannten Untersuchungen eine Aktivierung der TGF-β-Signalkaskade unter Hyperoxie (WT HYX) im Vergleich zur Normoxie (WT NOX). Die mRNA-Expression von *Tgfb* war nicht verändert, allerdings waren eine signifikante Steigerung der SMAD-Phosphorylierung und eine vermehrte Gen- sowie Proteinexpression von *Ccn2* bzw. CTGF zu beobachten (vgl. Abbildung 20).

Bei CXCL10-Defizienz waren verglichen mit den Wildtypen keine signifikanten Veränderungen im TGF-β-Signalweg nachweisbar (vgl. Abbildung 20).

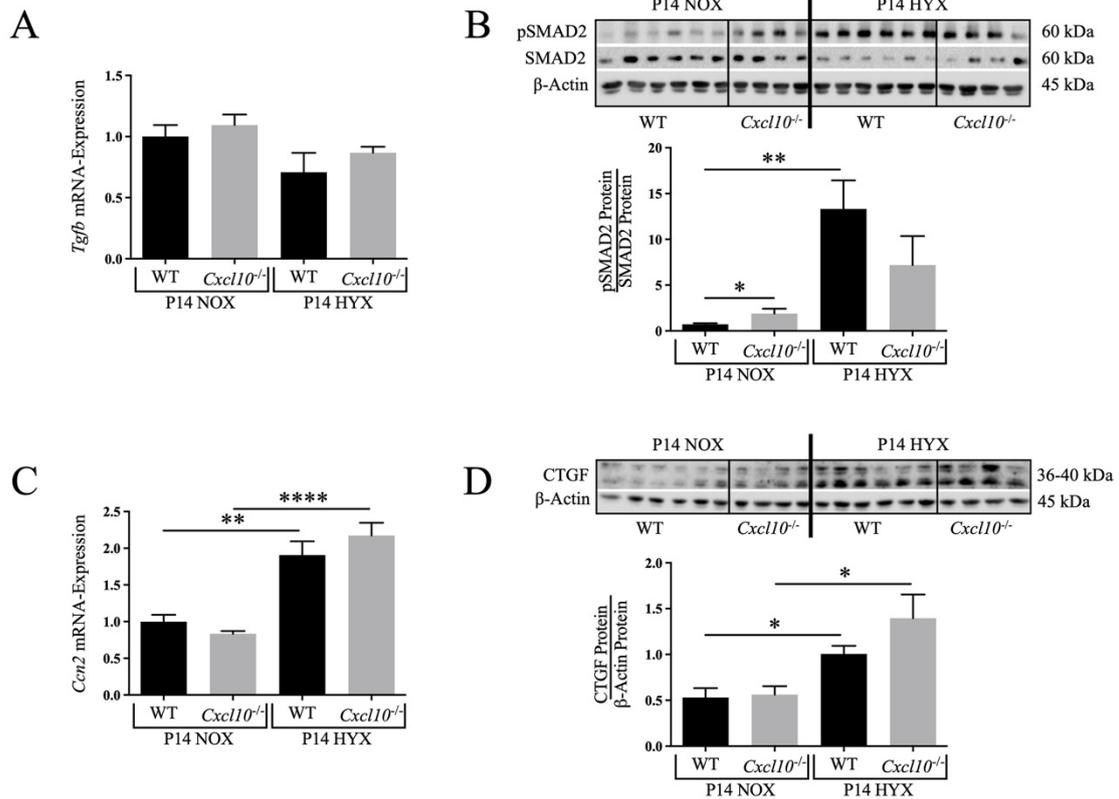


Abbildung 20: Aktivierung des TGF- β -Signalwegs unter Hyperoxie. A, C: relative mRNA-Expression von *transforming growth factor β* (*Tgfb*; A) und *cellular communication network factor 2* (*Ccn2*; C) in der Lunge am P14. B, D: Proteinexpression in der Lunge am P14; repräsentative Immunoblots mit densitometrischer Auswertung in Relation zu SMAD2 (B) bzw. β -Actin (D) für pSMAD (B) und *connective tissue growth factor* (CTGF; D). A-D: n = 6-9/Gruppe (A, C) bzw. 4-6/Gruppe (B, D); Mann-Whitney-Test; MW \pm SEM; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001. Abkürzungen: WT = Wildtyp; *Cxcl10*^{-/-} = *Cxcl10*-Knockout; NOX = Normoxie (21% O₂); HYX = Hyperoxie (85% O₂); P14 = postnataler Tag 14.

4.1.2.4 Protease-Aktivität

Weder die Kollagen-Neubildung noch die Aktivität des profibrotischen TGF- β waren bei CXCL10-Defizienz relevant verändert (vgl. 4.1.2.2 und 4.1.2.3). Daher haben wir als nächstes die proteatische Aktivität in der Lunge untersucht, um die unter Hyperoxie veränderte Zusammensetzung der EZM bei CXCL10-Defizienz zu erklären (vgl. 4.1.2.1). Hierbei haben wir uns auf zwei MMPs bzw. deren Vorstufen konzentriert. MMPs sind in der Lage, verschiedene Proteine der EZM zu zersetzen²⁰⁹. So können MMP-2 und MMP-9 sowohl Kollagen als auch Elastin degradieren²⁰⁹. Da in Studien hinreichend gezeigt wurde, dass BPD und Hyperoxie-induzierte Lungenerkrankung mit einer gesteigerten Expression und Aktivität verschiedener Proteasen, darunter MMP-2 und -9, einhergehen, wurde auf die Gegenüberstellung von Normoxie- und Hyperoxie-Gruppe verzichtet²¹⁰⁻²¹³. Wir haben uns auf den Vergleich von Hyperoxie-exponierten Wildtypen (WT HYX) und Knockout-Mäusen

(*Cxcl10*^{-/-} HYX) konzentriert. Für die genannten Gruppen wurde die pulmonale Aktivität von proMMP-2, MMP-2 und proMMP-9 mittels Zymographie quantifiziert (vgl. 3.5.3).

Bei den CXCL10-defizienten Mäusen (*Cxcl10*^{-/-} HYX) war die Aktivität von MMP-2 und dem Vorläufer proMMP-2 unter Hyperoxie im Vergleich zu den Wildtypen (WT HYX) nicht signifikant verändert. Für proMMP-9 konnte bei den Knockout-Tieren (*Cxcl10*^{-/-} HYX) jedoch eine zwei- bis dreifache Aktivitätssteigerung nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 21).

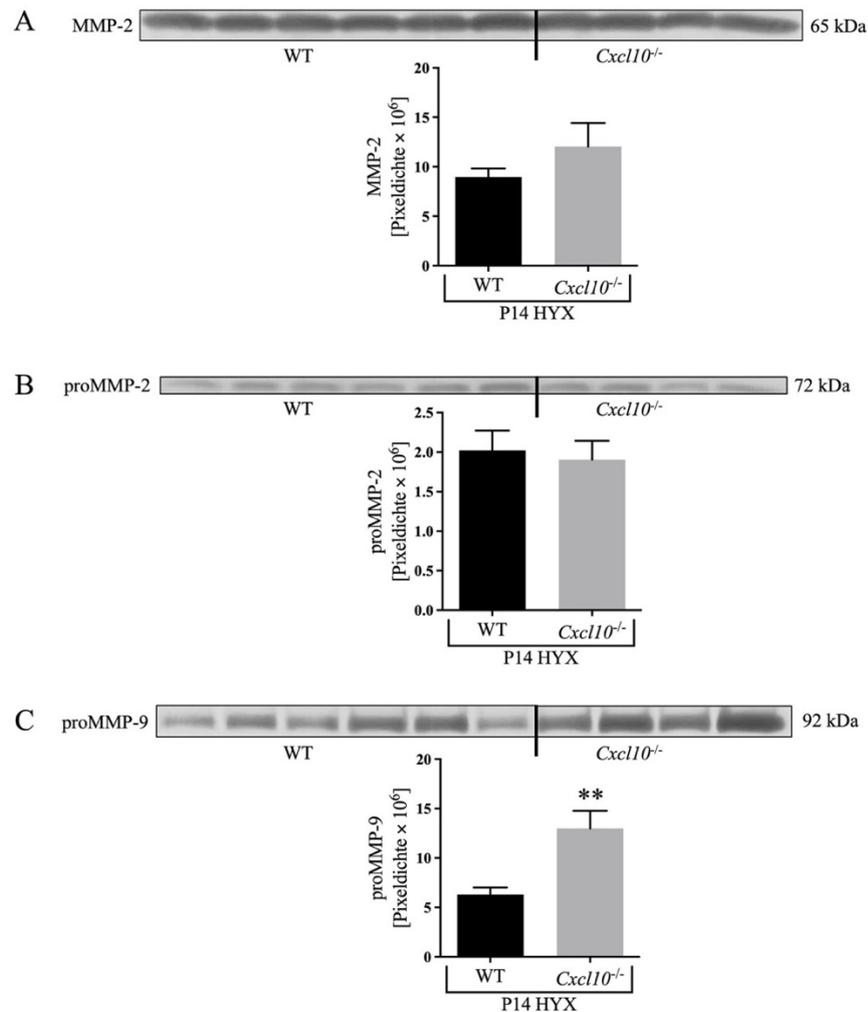


Abbildung 21: Erhöhte pulmonale Protease-Aktivität unter Hyperoxie bei CXCL10-Defizienz. Repräsentative Zymographie und densitometrische Quantifizierung der Aktivität von Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP-2; A), proMMP-2 (B) und proMMP-9 (C) in der Hyperoxie-exponierten Lunge am P14; n = 4-6/Gruppe; Mann-Whitney-Test; MW ± SEM; *p<0,05; **p<0,01. Abkürzungen: WT = Wildtyp; *Cxcl10*^{-/-} = *Cxcl10*-Knockout; NOX = Normoxie (21% O₂); HYX = Hyperoxie (85% O₂); P14 = postnataler Tag 14.

4.1.3 Einfluss der CXCL10-Defizienz auf Makrophageninflux und -polarisierung unter Hyperoxie

Um den Influx von Makrophagen ins Lungengewebe zu analysieren, wurden sie mittels CD68-Immunhistochemie im Gewebeschnitt gefärbt und ausgezählt (vgl. 3.3.6). Neben der Quantifizierung erfolgten auch Untersuchungen zu Aktivierung und Polarisierung der intrapulmonalen Makrophagen. Hierzu wurde die mRNA-Expression verschiedener Mediatoren der Makrophagendifferenzierung mittels RT-PCR analysiert. Als Marker für die proinflammatorischen M1-ähnlichen Makrophagen wurden die Gene *I11b*, *I16*, *Mmp12* und *Tnfa* untersucht, als Marker der entzündungsmodulierenden M2-ähnlichen Zellen *I14*, *I110* und *Arginase 1 (Arg1)* ^{143,158}.

Bei den Wildtypen war unter Hyperoxie (WT HYX) eine deutlich gesteigerte Makrophagenakkumulation gegenüber der Normoxie-Kontrolle (WT NOX) zu beobachten (vgl. Abbildung 22). Zudem zeigte sich unter Hyperoxie eine signifikante Expressionssteigerung der M1-ähnlichen Marker *I11b*, *I16* und *Mmp12*. Besonders *I16* war stark hochreguliert, nämlich etwa um den Faktor 20. Auf Seiten der M2-ähnlichen Marker wurde *I110* unter Hyperoxie vermehrt exprimiert, während für *I14* und *Arg1* kein Unterschied feststellbar war (vgl. Abbildung 23). Das beobachtete Expressionsmuster zeigt eine Dominanz des M1-ähnlichen Makrophagenphänotyps unter Hyperoxie an.

Bei den CXCL10-defizienten Mäusen (*Cxcl10*^{-/-} HYX) war die Makrophagenanzahl unter Hyperoxie im Vergleich zu den Wildtypen (WT HYX) signifikant vermindert. Tatsächlich war die pulmonale Akkumulation von Makrophagen nahezu vollständig geblockt (vgl. Abbildung 22). Das Expressionsmuster der untersuchten Gene der Polarisierung unterschied sich hingegen nicht wesentlich von dem der Wildtypen. Auch hier war unter Hyperoxie (*Cxcl10*^{-/-} HYX) im Vergleich zur Normoxie (*Cxcl10*^{-/-} NOX) vor allem die Expression der M1ähnlichen Marker (*I16*, *Mmp12* und *Tnfa*) gesteigert. Interessanterweise exprimierten die CXCL10-defizienten Tiere (*Cxcl10*^{-/-} HYX) im Vergleich zu den Wildtypen (WT HYX) bei Hyperoxie-Exposition signifikant mehr *I16*. Die M2-ähnlichen Marker waren unter Hyperoxie im Vergleich zur Normoxie kaum verändert (vgl. Abbildung 23). Die Zusammenschau der Ergebnisse lässt auf eine Hemmung der chemotaktischen Makrophageninvasion bei unveränderter -aktivierung und -polarisierung schließen.

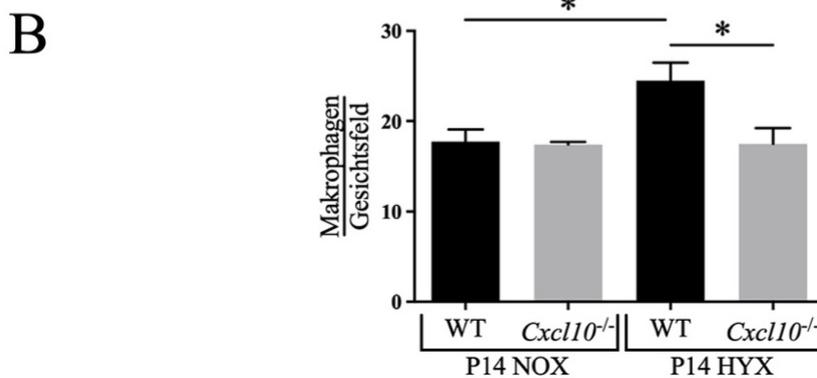
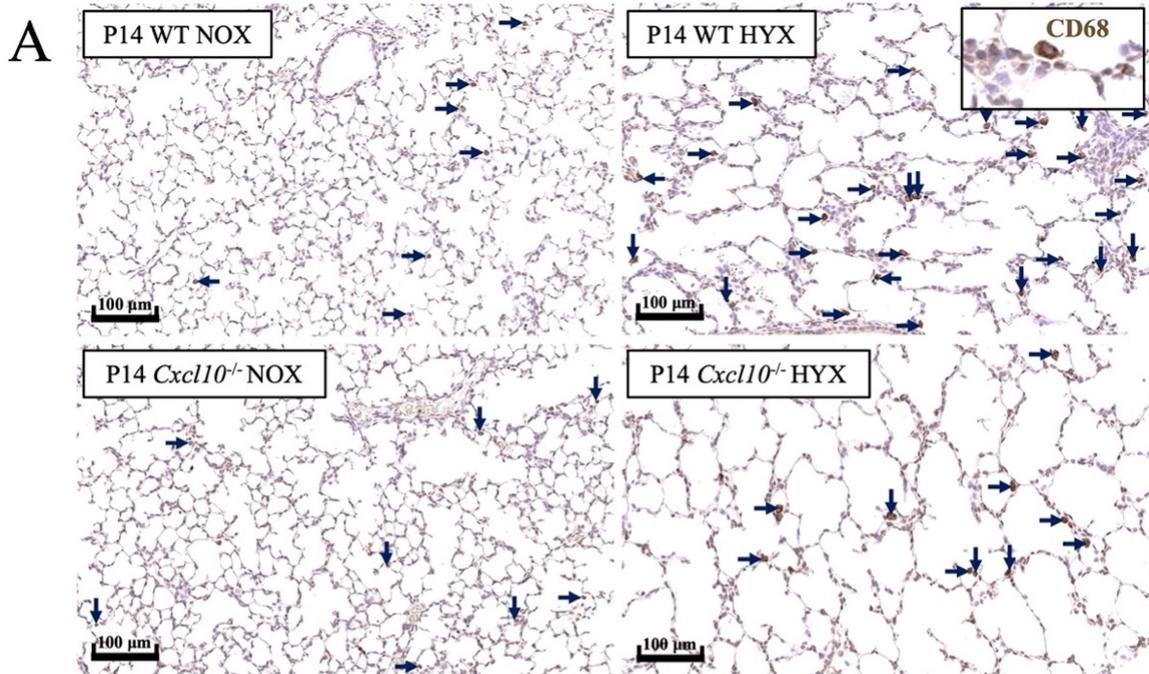


Abbildung 22: CXCL10-Defizienz blockt pulmonale Makrophageninvasion unter Hyperoxie. A: repräsentative Lungenschnitte mit CD68-Immunhistochemie und Hämatoxylin-Hintergrundfärbung; P14; Vergrößerung = 20X; Maßstab = 100 µm. B: Quantifizierung CD68-positiver Zellen in der Lunge am P14; Anzahl pro Gesichtsfeld; n = 3-6/Gruppe; Mann-Whitney-Test; MW ± SEM; *p<0,05. Abkürzungen: CD68 = *cluster of differentiation* 68; WT = Wildtyp; *Cxcl10*^{-/-} = *Cxcl10*-Knockout; NOX = Normoxie (21% O₂); HYX = Hyperoxie (85% O₂); P14 = postnataler Tag 14.

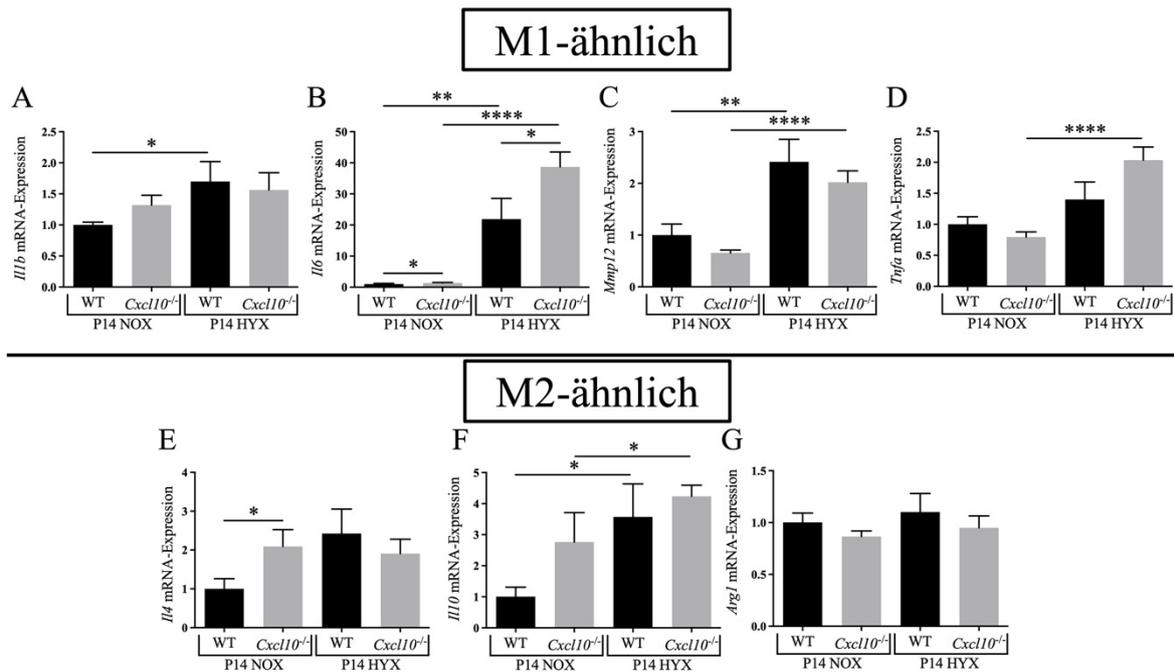


Abbildung 23: Hyperoxie fördert M1-ähnliche Makrophagenpolarisierung. Relative mRNA-Expression der M1-ähnlichen Marker *Il1b*, *Il6*, *Mmp12*, *Tnfa* (A-D) und der M2-ähnlichen Marker *Il4*, *Il10*, *Arg1* (E-G) in der Lunge am P14; n = 6-9/Gruppe; Mann-Whitney-Test; MW ± SEM; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001. Abkürzungen: *Il* = Interleukin; *Mmp12* = Matrix-Metalloproteinase 12; *Tnfa* = Tumor-Nekrosefaktor α; *Arg1* = Arginase 1; WT = Wildtyp; *Cxcl10*^{-/-} = *Cxcl10*-Knockout; NOX = Normoxie (21% O₂); HYX = Hyperoxie (85% O₂); P14 = postnataler Tag 14.

4.2 P28 – Auswirkungen der CXCL10-Defizienz auf die Regenerationsphase nach beendeter Hyperoxie-Exposition

Während die Untersuchungsergebnisse vom P14 die Prozesse und Veränderungen in der murinen Lunge unter fortdauernder Einwirkung der Hyperoxie widerspiegeln, ist der Zeitpunkt P28 repräsentativ für die Erholungsphase nach Wegfall des schädigenden Reizes. So konnten sich die Versuchstiere aus beiden Interventionsgruppen (WT HYX und *Cxcl10*^{-/-} HYX) zwischen P14 und P28 in Normoxie-Verhältnissen von der Lungenschädigung durch die Hyperoxie erholen (vgl. Abbildung 6; vgl. 3.2).

4.2.1 Einfluss der CXCL10-Defizienz auf das Lungenwachstum in der Regenerationsphase

4.2.1.1 Alveoläres Wachstum

Den Stellenwert von CXCL10 für die Regeneration haben wir unserer vierten Forschungsfrage entsprechend vorwiegend anhand des alveolären Wachstums untersucht (vgl. 2.5). Bei der Analyse der Alveolarisierung wurde analog zum Zeitpunkt P14 vorgegangen (vgl. 4.1.1.1).

Bei den ehemals Hyperoxie-exponierten Wildtypen (WT HYX) zeigte sich im Vergleich mit den Normoxie-Kontrollen (WT NOX) am P28 eine signifikante Erhöhung von MLI und durchschnittlicher Oberfläche der einzelnen Alveole. Dies ist im Sinne einer persistierenden alveolären Rarefizierung zu werten. Zudem war in der Hyperoxie-Gruppe (WT HYX) eine Verringerung des RAC als Indikator eines verminderten alveolären Wachstums angedeutet. Der Unterschied im RAC war im Gegensatz zum Zeitpunkt P14 statistisch jedoch nicht signifikant (p -Wert = 0,111) (vgl. Abbildung 24). Den Ergebnissen ist zu entnehmen, dass in Hinblick auf die Alveolarisierung nach der vierzehntägigen Erholungsphase keine vollständige Regeneration von der Schädigung durch die Hyperoxie eingetreten ist.

Bei den CXCL10-defizienten Tieren konnten wir am P14 (*Cxcl10*^{-/-} HYX) im Vergleich mit den Wildtypen (WT HYX) eine abgemilderte alveoläre Rarefizierung und Wachstumsstörung unter Hyperoxie nachweisen (durchschnittliche Oberfläche der einzelnen Alveole vermindert, RAC erhöht; vgl. 4.1.1.1). Am P28 war bei den Knockout-Tieren aus der Hyperoxie-Gruppe (*Cxcl10*^{-/-} HYX) die Oberfläche der einzelnen Alveole im Vergleich zu den Wildtypen (WT HYX) weiterhin reduziert. Der protektive Effekt der CXCL10-Defizienz in Bezug auf den RAC ist zwischen P14 und P28 hingegen verloren gegangen (vgl. Abbildung 24).

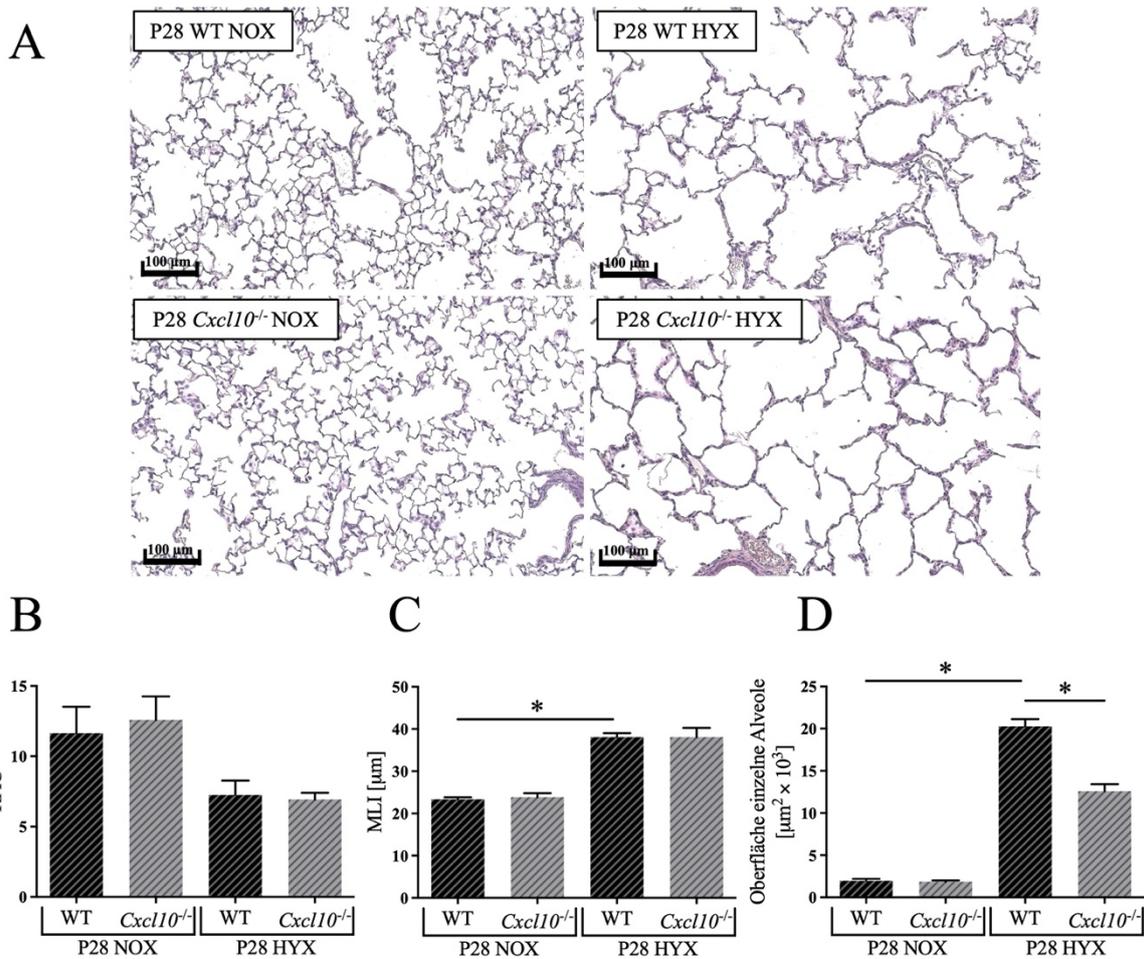


Abbildung 24: Alveoläres Aufholwachstum nach beendeter Hyperoxie-Exposition. A: repräsentative Lungenschnitte gefärbt mit Hämatoxylin-Eosin; Vergrößerung = 20X; Maßstab = 100 µm. B-D: Ergebnisse der Analysen von *radial alveolar count* (RAC; A), *mean linear intercept* (MLI; B) und der durchschnittlichen Oberfläche der einzelnen Alveole (C); n = 3-5/Gruppe; Mann-Whitney-Test; MW ± SEM; *p<0,05. Abkürzungen: WT = Wildtyp; *Cxcl10*^{-/-} = *Cxcl10*-Knockout; NOX = Normoxie (21% O₂); HYX = Hyperoxie (85% O₂); P28 = postnataler Tag 28.

4.2.1.2 Homöostase der Alveolarepithelzellen

Wie an anderer Stelle bereits betont wurde, sind AEC, insbesondere die ATII-Zellen, von großer Bedeutung für ein ungestörtes alveoläres Wachstum und eine funktionierende pulmonale Regeneration (vgl. 2.2). Um das Lungenwachstum in der Regenerationsphase zu beurteilen, haben wir für den Zeitpunkt P28 neben den histomorphometrischen Parametern der Alveolarisierung deshalb auch die Homöostase der AEC untersucht. Hierzu wurde – wie schon für den Zeitpunkt P14 – die mRNA-Expression verschiedener Gene quantifiziert, die spezifisch von AEC exprimiert werden (*Aqp5*, *Sftpa*, *Sftpb*, *Sftpc*, *Sftpd*).

Zwischen den ehemals Hyperoxie-exponierten Wildtypen (WT HYX) und der Normoxie-Kontrolle (WT NOX) bestand nahezu kein Unterschied in der Expression der AEC-Marker. Bei

der Interventionsgruppe (WT HYX) zeigte sich lediglich eine minimale Expressionsminderung für *Aqp5* und *Sftpc*, wobei die Relevanz aufgrund der geringen Ausprägung des Effekts in Frage gestellt werden muss. Insgesamt wiesen die Ergebnisse bei den Wildtypen auf eine weitestgehend unbeeinträchtigte Homöostase der AEC während der Regenerationsphase hin (vgl. Abbildung 25).

Anders sah es bei den CXCL10-defizienten Tieren aus. Verglichen mit den Wildtypen (WT HYX) war bei den Knockout-Mäusen der Interventionsgruppe (*Cxcl10*^{-/-} HYX) die Expression aller untersuchten alveolärethelialen Marker deutlich vermindert. Auch innerhalb der Kontrollgruppen war bei CXCL10-Defizienz (*Cxcl10*^{-/-} NOX) ein Verlust von AEC-Markern gegenüber den Wildtypen (WT NOX) zu beobachten. Konkret war hier die mRNA-Expression von *Sftpc* und *Sftpd* verringert (vgl. Abbildung 25). Letztgenannter Befund passt zu den Untersuchungsergebnissen vom P14, wo unter Normoxie ebenfalls eine gestörte Expression von AEC-Markern auffällig war (vgl. 4.1.1.2). Die Zusammenschau der Ergebnisse zeigt, dass die vollständige Abwesenheit von CXCL10 bei Ausbleiben des schädigenden Reizes der Hyperoxie in der Phase von P14 bis P28 die Homöostase der AEC stört.

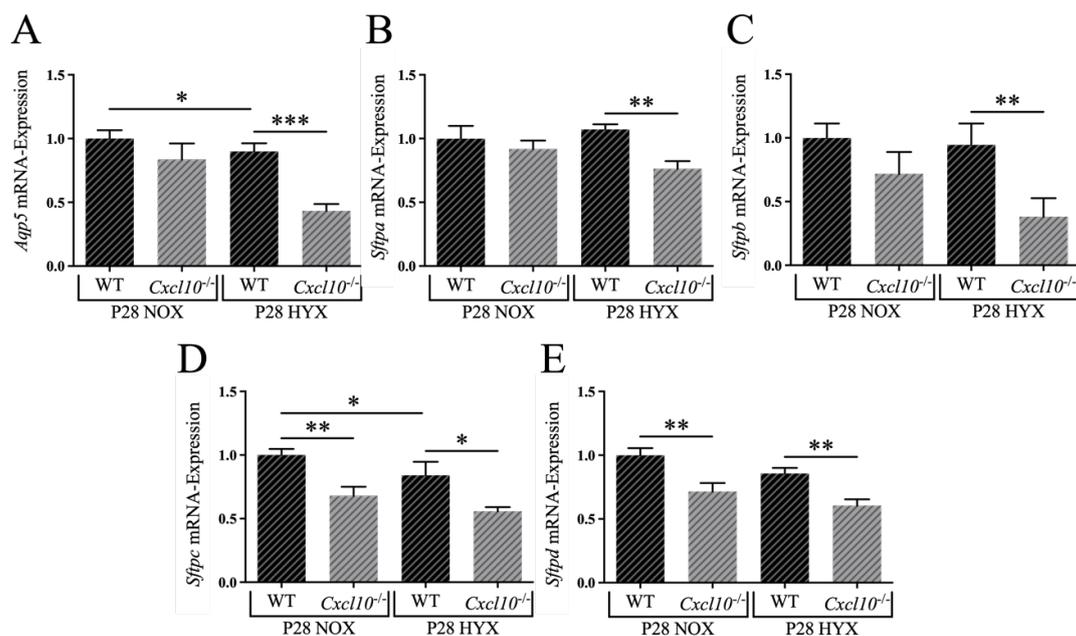


Abbildung 25: Verlust der Alveolarepithelmarker in der Regenerationsphase bei CXCL10-Defizienz. A-E: Relative mRNA-Expression der Alveolarepithelzell-Marker *Aqp5* (A), *Sftpa* (B), *Sftpb* (C), *Sftpc* (D) und *Sftpd* (E) in der Lunge am P28; n = 8-10/Gruppe; Mann-Whitney-Test; MW ± SEM; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. Abkürzungen: *Aqp5* = Aquaporin 5; *Sftp* = Surfactant-Protein. WT = Wildtyp; *Cxcl10*^{-/-} = *Cxcl10*-Knockout; NOX = Normoxie (21% O₂); HYX = Hyperoxie (85% O₂); P28 = postnataler Tag 28.

5 Diskussion

5.1 Schlussfolgerung aus den Ergebnissen: CXCL10 – Ein biphasischer Mechanismus

In der vorliegenden Arbeit haben wir die funktionelle Rolle von CXCL10 in der Hyperoxie-induzierten Lungenerkrankung der neugeborenen Maus erforscht. Der hierbei gewählte Versuchsaufbau war zweiphasig. In der ersten Phase haben wir die Relevanz von CXCL10 für die akute Lungenschädigung durch die Hyperoxie betrachtet, in der zweiten Phase die Rolle in der anschließenden pulmonalen Regeneration (vgl. Abbildung 6; vgl. 3.2).

Während der akuten Lungenschädigung konnten wir bei den CXCL10-defizienten Mäusen ein verbessertes alveoläres Wachstum und eine verminderte Apoptose nachweisen (vgl. 4.1.1.1 und 4.1.1.2). Die Knockout-Tiere waren darüber hinaus teilweise vor einem fibrotischen Umbau der EZM unter Hyperoxie geschützt (vgl. 4.1.2.1). Die Reduktion der Kollagenakkumulation war insbesondere mit einer gesteigerten Proteaseaktivität assoziiert (vgl. 4.1.2.4). Insgesamt schützte die CXCL10-Defizienz durch eine verbesserte Alveolarisierung und einen verminderten Matrixumbau zum Teil vor dem Hyperoxie-induzierten pulmonalen Phänotyp. Als mögliche Ursache für diesen Befund ging aus unserer Studie eine Hemmung der Hyperoxie-vermittelten Inflammation hervor. So war bei CXCL10-defizienten Mäusen die Makrophageneinwanderung fast vollständig geblockt (vgl. 4.1.3). Wir sehen unsere Hypothese, dass CXCL10 teilweise zur Pathogenese der Hyperoxie-induzierten Lungenerkrankung als Modell der BPD beiträgt (vgl. 2.5), damit als bestätigt an.

In der zweiwöchigen Erholungsphase nach beendeter Hyperoxie-Exposition ging der alveoläre Wachstumsvorteil der CXCL10-defizienten Mäuse teilweise verloren (vgl. 4.2.1.1). Die Wildtyp-Mäuse mit erhaltener CXCL10-Expression holten in Bezug auf das alveoläre Wachstum bei Fehlen des schädigenden Stimulus der Hyperoxie auf. Zudem beobachteten wir bei CXCL10-Defizienz in Normoxie einen Verlust der AEC-Marker (vgl. 4.2.1.2). Beides zeigt, dass eine CXCL10-Defizienz die pulmonale Regeneration negativ beeinflusst.

In Zusammenschau der Ergebnisse schlagen wir daher einen biphasischen Mechanismus für CXCL10 vor: (1) Eine überschießende Freisetzung von CXCL10, wie sie während der akuten Lungenschädigung durch die Hyperoxie beobachtet werden kann, wirkt sich über eine Förderung der Inflammation negativ auf Lungenwachstum, Zellhomöostase und die EZM aus. (2) Ein physiologisches Maß an CXCL10 ist aber wichtig, um eine normale Funktion und ein ungestörtes Wachstum der Lunge zu gewährleisten (vgl. Abbildung 26).

Akute Lungenschädigung durch die Hyperoxie



Regenerationsphase

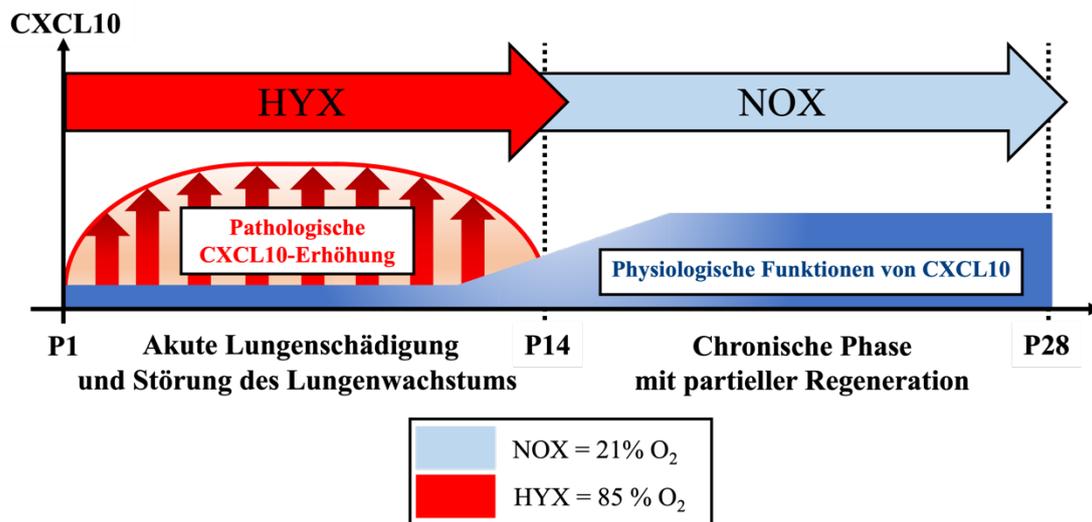
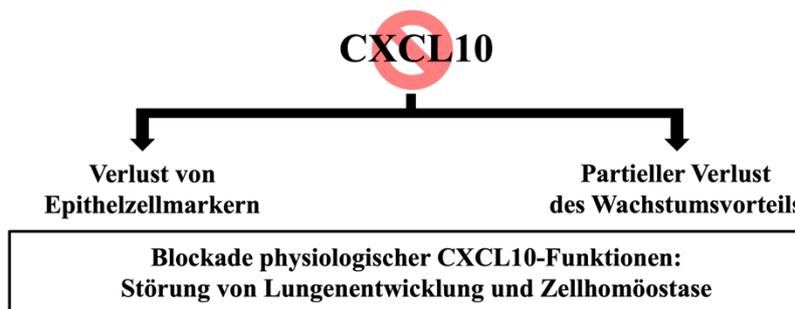


Abbildung 26: CXCL10 – Ein biphasischer Mechanismus. Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse der vorliegenden Studie und schlussfolgerndes Arbeitsmodell. Abkürzungen: EZM = extrazelluläre Matrix; P1/14/28 = postnataler Tag 1/14/28; NOX = Normoxie; HYX = Hyperoxie.

5.2 Das Modell der Hyperoxie-induzierten Lungenerkrankung der neugeborenen Maus als translationales Modell der bronchopulmonalen Dysplasie

Die Forschung zur Pathophysiologie der BPD ist in hohem Maße auf tierexperimentelle Studien angewiesen, da aufgrund der glücklicherweise sinkenden Mortalität Frühgeborener nur wenige Autopsiepräparate für humane Studien zur Verfügung stehen und verlässliche *in-vitro*-Modelle bisher fehlen²¹⁴. Die Herausforderung in der *in-vitro*-Modellierung der Lungenentwicklung bzw. der BPD liegt darin, dass ein adäquates Modell eine hohe biologische Komplexität abbilden muss, die neben offensichtlichen Faktoren wie einer Multizellularität auch Aspekte wie Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen sowie das Wechselspiel zwischen Immunzellen und strukturellen Lungenbestandteilen umfasst. Durch die Entwicklung von Organoiden, die auf multilinearen Stammzellen basieren, ist man dem idealen *in-vitro*-Modell aktuell so nah wie noch nie²¹⁵. Bis zur Ausreifung und Verbreitung dieser Methode werden Tiermodelle aber weiterhin die erste Wahl in der pathophysiologischen BPD-Forschung bleiben.

Um verlässlich auf die BPD rückschließen zu können, ist die Qualität und Repräsentativität der genutzten Tiermodelle unabdingbare Voraussetzung. Es stellt sich die Frage, inwieweit der Phänotyp der BPD im Tierexperiment überhaupt reproduziert werden kann. Morty et al. geben zu bedenken, dass die BPD beim Menschen rein klinisch definiert wird (vgl. 2.3.2), diese Definition aber nicht auf die als Modellorganismen genutzten Tiere übertragbar ist¹⁰⁰. Folglich wird zur Kontrolle einer gelungenen tierexperimentellen Modellierung i.d.R. der pathomorphologische Phänotyp betrachtet^{100,214}. Ob auch die klinische Situation treffend widerspiegelt wird, bleibt dabei weitestgehend unklar¹⁰⁰. Allerdings bietet die Histologie-fokussierte Betrachtung mit ihrer histomorphometrischen Objektivierbarkeit auch entscheidende Vorteile (vgl. 3.3.5).

Für die vorliegende Arbeit wurde das in meiner Arbeitsgruppe etablierte BPD-Modell der Hyperoxie-induzierten Lungenschädigung der neugeborenen Maus verwendet (vgl. 3.2.2)^{19,174}. Zahlreiche Studien belegen, dass die Hyperoxie-vermittelte chronische Lungenerkrankung die wesentlichen pathohistologischen Aspekte der BPD aufweist, nämlich alveoläre Rarefizierung, vaskuläre Simplifizierung und Umbau der Lungenmatrix^{19,143,174,216-223}. Der morphologische Phänotyp der BPD kann also in seinen wesentlichen Charakteristika treffend modelliert werden. Dies verdeutlichen auch unsere Untersuchungsergebnisse bei den Wildtyp-Mäusen vom P14 (vgl. 4.1).

Es bleibt zu diskutieren, ob die Mechanismen, durch welche die Ausbildung dieses Phänotyps erreicht wird, repräsentativ für die pathogenetischen Prozesse bei der BPD sind. Oben haben wir ein kurzes Konzept für die Genese der BPD skizziert, demzufolge die pulmonale Unreife

bei Frühgeborenen die wesentliche Ursache für die Entstehung der Erkrankung darstellt (vgl. 2.3.3.1) ³². Die nächste Ebene in der Pathogenese bilden gemäß diesem Krankheitsmodell schädigende Stimuli, die die immature Lunge angreifen und ihre normale Entwicklung beeinträchtigen (vgl. 2.3.3) ³². Ein gutes Tiermodell sollte beide Aspekte der Pathogenese (Unreife und Schädigung) beinhalten.

Reifgeborene Mäuse befinden sich genau wie frühgeborene Menschen zum Zeitpunkt der Geburt in der sakkulären Phase der Lungenentwicklung (vgl. 2.2) ^{100,224}. Die pulmonale Unreife als Ausgangspunkt der Pathogenese ist in unserem Versuchsaufbau dementsprechend eindeutig gegeben. Dass keine hundertprozentige Übertragbarkeit besteht, wird schon darin ersichtlich, dass reifgeborene Mäuse postpartal im Gasaustausch deutlich weniger beeinträchtigt sind als menschliche Frühgeborene ¹⁰⁰. Schließlich sind sie normalerweise ohne respiratorische Unterstützung überlebensfähig. Tiermodelle, die mit frühgeborenen Tieren wie z.B. Pavianen oder Schafen arbeiten, können die komplexen Besonderheiten der Frühgeburt, die sich nicht auf die Immaturität der Lunge beschränken, besser simulieren ²²⁵⁻²²⁹.

Als lungenschädigender Reiz diente in unserem Experiment eine normobare Hyperoxie. Mit 85% wurde dabei eine sehr hohe FiO_2 gewählt. Hilgendorff et al. kritisieren, dass eine derart aggressive Hyperoxie für die heutige, zurückhaltende Sauerstofftherapie beim Frühgeborenen nicht repräsentativ ist ²¹⁴. Nardiello et al., die die Auswirkungen verschiedener Sauerstoffkonzentrationen auf die Lunge der neugeborenen Maus untersucht haben, konnten jedoch zeigen, dass erst ab 85-prozentiger Hyperoxie sowohl eine Reduktion der Alveolenzahl als auch eine Verdickung der interalveolären Septen zu beobachten ist ²³⁰. Bei einer niedrigeren FiO_2 fehlt der Einfluss auf die Septumdicke ²³⁰. Die genutzte 85-prozentige Hyperoxie ist daher für die adäquate Modellierung der Histopathologie der BPD notwendig. Weiterhin wurde in der genannten Studie in Hinblick auf die bestmögliche phänotypische Modellierung eine 14-tägige Hyperoxie-Exposition beginnend am P1 als optimales Interventionszeitfenster identifiziert ²³⁰.

Andere BPD-Modelle nutzen zur Induktion der Lungenschädigung abweichende Noxen wie z.B. ein chronisches Beatmungstrauma oder eine simulierte Infektion ^{214,231,232}. Jeder einzelne Ansatz wird der multifaktoriellen Ätiopathogenese der „neuen“ BPD nicht gerecht, da hier i.d.R. das Zusammenwirken von Beatmung, Sauerstofftherapie und Infektion ausschlaggebend ist und nicht ein Einzelfaktor (vgl. 2.3.1 und 2.3.3) ^{32,56,75}. Ein ideales Tiermodell müsste die verschiedenen Trigger der BPD vereinen und darüber hinaus gängige klinische Maßnahmen wie Surfactant-Administration und pränatale Lungenreifeinduktion implizieren; nur dann könnte die klinische Situation ganzheitlich abgebildet werden. Während man sich diesem

Idealmodell in manchen Studien (vgl. Coalson et al. ²²⁵) bereits annähert, limitieren der große Aufwand und die hohen Kosten die flächendeckende Umsetzung.

Das Modell der Hyperoxie-induzierten chronischen Lungenschädigung der Maus bringt also wie jedes andere translationale Modell gewisse Einschränkungen bezüglich Übertragbarkeit und Aussagekraft mit sich. Es ist jedoch in der wissenschaftlichen Praxis gut etabliert, praktikabel und umfasst wesentliche Aspekte der BPD. Ein großer Vorteil liegt zudem darin, dass das Modell auch erfolgreich auf gentechnisch modifizierte Mäuse – wie in diesem Fall die *Cxcl10*-Knockout-Mäuse (vgl. 3.2.1) oder auch *Il6*-Knockouts – angewandt werden kann ¹⁴³. Dies ermöglicht die gezielte funktionelle Untersuchung einzelner Gene bzw. Proteine im Kontext eines komplexen Organismus sowie Krankheitsgeschehens. Versteht man das genutzte Mausmodell nicht unkritisch als Äquivalent der Erkrankung, sondern eben als Modell, kann es einen wertvollen Beitrag zum pathophysiologischen Verständnis der BPD leisten.

5.3 Die ambivalente Rolle der Inflammation bei bronchopulmonaler Dysplasie und Hyperoxie-induzierter chronischer Lungenerkrankung der Maus

Es wurde hinreichend betont, dass eine pulmonale Inflammation eine übergeordnete Rolle in der Pathogenese der BPD einnimmt ^{23,32,75,100,112,140}. Auch haben wir bereits verschiedene Mechanismen besprochen, über die im Zuge dieser Entzündungsreaktion die Integrität der Lunge gestört und ihr Wachstum beeinträchtigt wird. Unter anderem haben wir direkt zytotoxische Effekte der freigesetzten proinflammatorischen Mediatoren (z.B. TNF- α), die Sekretion gewebeschädigender Proteasen und ROS durch rekrutierte Entzündungszellen (v.a. NGZ und Makrophagen) und die Dysregulation wichtiger Signalwege hervorgehoben (vgl. 2.4) ^{112,144,153,213}.

Trotz ihrer schädigenden Potenz ist eine verallgemeinernd negative Betrachtung der Entzündung nicht angemessen. Als physiologische Reaktion auf eine Gewebeschädigung unterschiedlichster Art ist Inflammation für Reparatur und Regeneration unerlässlich ^{138,233,234}. Ein Paradebeispiel für die ambivalenten Eigenschaften der Inflammation sind die zu den Entzündungszellen zählenden Makrophagen. Einerseits können Makrophagen Gewebe über die oben genannten Mechanismen schädigen (vgl. 2.4.1). Andererseits räumen sie Detritus ab, koordinieren den EZM-Umbau und steuern Zellproliferation, Gewebeneubildung und Angiogenese als Antwort auf entstandene Defekte ²³⁴⁻²³⁶. Die destruktiven Effekte einer Makrophagen-vermittelten Inflammation werden in der akuten Schädigungsphase unseres Experiments sichtbar (vgl. 4.1 und 5.1). Die Bedeutung einer ungestörten Chemotaxis von Entzündungszellen für die Regeneration wird wiederum durch die zweite Phase des Experiments unterstrichen (vgl. 4.2 und 5.1).

Dass Inflammation für Regeneration und physiologische Organentwicklung essenziell ist, wird auch in anderen Studien erkenntlich, bei denen in die inflammatorischen Abläufe eingegriffen wurde. So wurde im Mausmodell demonstriert, dass der vollständige Verlust von IL-6 während der Lungenentwicklung eine beeinträchtigte Alveologenese zur Folge hat ¹⁴³. Zhang et al. konnten am Beispiel der Niere zeigen, dass sich die Inhibition der Makrophagenfunktion negativ auf die Erholung nach einer Schädigung auswirkt ²³⁷. Auch der Prozess der Angiogenese in der unreifen Lunge, der wesentlich die Alveologenese antreibt, spiegelt die Ambivalenz von Entzündung wider ^{80,82,238}. Einerseits ist die ausgeprägte pulmonale Inflammation bei der BPD mit einer beeinträchtigten Angiogenese assoziiert (vgl. 2.3.4) ¹¹². Andererseits geht aus experimentellen Studien hervor, dass die Angiogenese gleichermaßen durch eine Suppression der Entzündung gestört wird ²³⁸. So konnte gezeigt werden, dass die Blockade des inflammatorischen Transkriptionsfaktors *nuclear factor kappa B* (NF-κB) in neugeborenen Mäusen eine reduzierte Kapillardichte sowie eine konsekutive alveoläre Hypoplasie hervorruft ²³⁸.

Entzündung ist nicht per se pathologisch – insbesondere dann nicht, wenn sie kontrolliert und während umschriebener Phasen stattfindet ¹³⁸. Eine ausbalancierte Inflammation ist bei der BPD aber nicht gegeben. Stattdessen induziert die prolongierte Einwirkung der Noxe (O₂, Beatmung, Infektion etc.) eine langanhaltende und dysregulierte Entzündung, die in einer fehlgeleiteten und überschießenden Reparatur mündet ^{32,138}. Letztere begründet auch wesentlich den Umbau der Lungenmatrix und begünstigt somit die Entstehung einer interstitiellen Fibrose ^{32,112,234,239}.

Ein Zeichen der inflammatorischen Dysregulation bzw. Dysbalance ist die im Vergleich zu den entzündungshemmenden Mediatoren übermäßige Expression proinflammatorischer Zytokine (z.B. IL-6), die auch in unserer Studie reproduziert werden konnte (vgl. 4.1.3) ¹¹². Auch das zugunsten des M1-ähnlichen Phänotyps verschobene Verhältnis von M1- und M2-ähnlichen Makrophagen, das unter chronischer Hyperoxie beobachtet wird, kann entsprechend interpretiert werden ¹⁴³. Hier ist nochmal darauf hinzuweisen, dass die dichotome Trennung von M1 versus M2 simplifiziert ist und die Komplexität der jeweiligen Makrophagensubpopulationen und ihrer differentiellen Funktionen nicht widerspiegelt (vgl. 2.4.1) ²³⁴.

Die These, dass in Bezug auf inflammatorische Prozesse die richtige Balance entscheidend ist, steht im Einklang mit unseren Studienergebnissen. Wir haben gezeigt, dass die übermäßige Sekretion von CXCL10 während der akuten Schädigung durch die Hyperoxie das Lungenwachstum stört, während ein physiologisches Maß an CXCL10 unter anderem für eine pulmonale Regeneration und regelrechte AEC-Homöostase benötigt wird. Daher haben wir

auf einen biphasischen Mechanismus von CXCL10 geschlossen (vgl. 5.1). CXCL10 kann also konzentrations- und kontextabhängig negative oder vorteilhafte Effekte vermitteln – so wie inflammatorische Prozesse im Allgemeinen schädlich oder förderlich sein können (s.o.). Letztlich stützt sich unser Verständnis der BPD-assoziierten Entzündung noch zu großen Teilen auf Vermutungen. Weitere Forschungsarbeit ist nötig, um die genauen Entzündungsmechanismen bei der BPD besser zu verstehen. Auf alle Fälle sind stets die physiologischen Funktionen der Inflammation zu berücksichtigen. Diese müssen insbesondere auch bei der Entwicklung antiinflammatorischer Therapien bedacht werden.

5.4 Makrophagen am Beispiel anderer Lungenerkrankungen

Unsere Studie unterstreicht neben dem Stellenwert von CXCL10 vor allem die Schlüsselrolle der Makrophagen in der Hyperoxie-induzierten Lungenschädigung als Modell der BPD. In ihrer Funktion als Regulatoren der Immunantwort sind Makrophagen aber auch für andere Lungenerkrankungen von großem Interesse¹⁵⁴. Zum Beispiel sind sie an der Pathogenese der Pneumonie bei COVID-19 (*coronavirus disease 2019*) und an der Entstehung der Lungenfibrose beteiligt^{240,241}. Erkenntnisse aus diesen und anderen Erkrankungen können dabei helfen, unsere Beobachtungen besser einzuordnen; und umgekehrt.

Man nimmt an, dass die ausgeprägte pulmonale Entzündung und Schädigung, die bei schweren Fällen von COVID-19 beobachtet werden kann, maßgeblich auf einen sog. Zytokinsturm infolge einer dysregulierten Immunantwort zurückzuführen ist^{240,242}. Transkriptionale Analysen haben gezeigt, dass im Respirationstrakt schwer erkrankter Patienten proinflammatorische Makrophagen vorkommen, die unter anderem CXCL10 freisetzen und so weitere Entzündungszellen – darunter auch weitere Makrophagen – anlocken^{165,240}. Die Sekretion des autokrin wirkenden CXCL10 durch die Makrophagen befeuert also im Sinne eines sich selbst verstärkenden Prozesses die Inflammation²⁴⁰. Hierin liegt ein potenzieller Mechanismus der überschießenden Immunreaktion bei COVID-19²⁴⁰. Die beschriebene proinflammatorische Spirale könnte auch bei der dysregulierten Entzündung in der BPD eine Rolle spielen. Die durch uns nachgewiesene blockierte Makrophageninvasion bei CXCL10-Defizienz (vgl. 4.1.3) verdeutlicht, dass es möglich ist, hemmend in diesen Prozess einzugreifen.

Misharin et al. haben gezeigt, dass Makrophagen in die Pathogenese der Lungenfibrose involviert sind und dass dabei verschiedene Subpopulationen unterschiedliche Rollen innehaben²⁴¹. Nur die Makrophagen, die sich von rekrutierten Monozyten ableiten (sog. *monocyte-derived macrophages*), tragen zur experimentellen Lungenfibrose bei²⁴¹. Für die gewebeständigen AM wurde kein profibrotischer Effekt nachgewiesen²⁴¹. In unserem

Experiment haben wir bei CXCL10-Defizienz sowohl eine Reduktion der Makrophageneinwanderung (vgl. 4.1.3) als auch der Hyperoxie-induzierten Fibrose (vgl. 4.1.2.1) beobachtet. In Zusammenschau mit den Ergebnissen von Misharin et al. kann man vermuten, dass durch das Ausschalten von CXCL10 die Zusammensetzung der pulmonalen Makrophagenpopulation modifiziert wurde, was sich dann auf den Matrixumbau ausgewirkt hat. Diese Theorie bleibt allerdings hypothetisch, da wir in unserer Studie residente und rekrutierte Makrophagen nicht differenziert haben.

Es gibt noch weitere Lungenerkrankungen, wie z.B. das Asthma bronchiale und die chronisch-obstruktive Lungenerkrankung, an deren Pathophysiologie Makrophagen beteiligt sind ¹⁵⁴. Unsere Ergebnisse aus der Hyperoxie-induzierten Lungenschädigung tragen dazu bei, die komplexe Rolle der Makrophagen in der neonatalen Lungenschädigung besser zu verstehen und heben mit CXCL10 zudem einen vielversprechenden potenziellen Therapieansatz hervor, der auch für verschiedene andere (Lungen-)Erkrankungen von Interesse sein könnte.

5.5 Wie CXCL10 den pulmonalen Phänotyp beeinflusst

Während der akuten Lungenschädigung durch die Hyperoxie konnten wir bei CXCL10-Verlust einen verbesserten pulmonalen Phänotyp nachweisen, der sich in Form einer gesteigerten Alveolarisierung sowie einer verminderten Septumdicke als Korrelat eines abgemilderten fibrotischen Umbaus der Lunge äußerte (vgl. 4.1.1.1 und 4.1.2.1). Es stellt sich die Frage, welche Mechanismen den phänotypischen Auswirkungen der CXCL10-Defizienz zugrunde liegen.

Die stark verminderte pulmonale Makrophagenakkumulation unter Hyperoxie war neben dem protektiven Effekt des CXCL10-Verlustes auf den pulmonalen Phänotyp der markanteste Befund unserer Studie (vgl. 4.1.3). Die Vermutung liegt nahe, dass das verbesserte Lungenwachstum bei CXCL10-Defizienz maßgeblich auf diese Makrophagendepletion und die folglich verminderte Inflammation zurückzuführen ist.

Neue Erkenntnisse aus der experimentellen BPD sind damit vereinbar. So konnten Hirani et al. zeigen, dass Hyperoxie durch die Aktivierung der IL-6/STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*)-Achse zu einer gestörten Interaktion zwischen Makrophagen und ATII-Zellen führt ¹⁴³. Damit wurde ein möglicher Mechanismus präsentiert, durch den Makrophagen die Alveolenbildung stören können ¹⁴³. Auch Kalymbetova et al. bringen die gestörte Alveolarisierung in der Hyperoxie-induzierten Lungenerkrankung kausal mit Makrophagen in Verbindung ¹⁵⁷. Sie schlagen vor, dass im Zuge der Hyperoxie eine neue Makrophagenpopulation aus den gewebeständigen AM hervorgeht, die eine Störung der

normalen Alveolo- und Organogenese vermittelt ¹⁵⁷. Demzufolge spielt neben dem quantitativen Aspekt auch die Polarisierung der Makrophagen eine entscheidende Rolle ¹⁵⁷.

Während in unserem Experiment die Makrophagenanzahl unter Hyperoxie bei CXCL10-Verlust deutlich reduziert war, sahen wir weiterhin ein Expressionsmuster, das für den proinflammatorischen, M1-ähnlichen Makrophagenphänotyp charakteristisch ist (vgl. 4.1.3). Die Makrophagenpolarisierung scheint im Zuge der CXCL10-Defizienz folglich nicht günstig beeinflusst worden zu sein. Möglicherweise wird bei Blockade des chemotaktischen CXCL10 lediglich die Rekrutierung von Monozyten aus dem Blut gehemmt, während die AM weiterhin ihre gewohnte Differenzierung durchlaufen und – wie von Kalymbetova et al. beschrieben – die Alveologenese stören ¹⁵⁷. Dies könnte auch erklären, warum wir trotz der massiven Makrophagendepletion nur eine partielle phänotypische Protektion beobachten konnten.

In Bezug auf die EZM-Veränderungen bei CXCL10-Verlust sind auch Makrophagen-unabhängige Mechanismen zu diskutieren. Tanger et al. konnten demonstrieren, dass CXCL10 an der Steuerung der Fibroblastenmigration beteiligt ist ²⁴³. Während wir in unserem Experiment eine reduzierte Fibrose bei CXCL10-Verlust nachweisen konnten (vgl. 4.1.2.1), beobachteten Tanger et al. in ihrem Bleomycin-basierten Mausmodell der Lungenfibrose verstärkte fibrotische Veränderungen bei CXCL10-Defizienz ²⁴³. Sie postulieren deshalb einen antifibrotischen Effekt für CXCL10, den sie auf eine gehemmte Migration der Fibroblasten zurückführen ²⁴³. Manche Studien unterstützen die Theorie der antifibrotischen Wirkung von CXCL10, während andere wiederum eindeutig auf Fibrose-fördernde Eigenschaften hindeuten ^{244,245}. Möglicherweise ist in den verschiedenen Ergebnissen kein Widerspruch zu sehen, sondern ein Hinweis auf den von uns postulierten dualen und phasenabhängigen Mechanismus von CXCL10, der in Abhängigkeit von Konzentration, Kontext, Entwicklungs- und Pathogenesestadium unterschiedliche, teils sogar gegenteilige Wirkungen bedingt. Ergebnisse aus verschiedenen Krankheitsbildern bzw. -modellen können ohnehin nur bedingt direkt miteinander verglichen werden. Unsere zymographischen Untersuchungen (vgl. 4.1.2.4) zeigen außerdem, dass CXCL10 die EZM offensichtlich nicht nur über die Chemotaxis von Fibroblasten beeinflusst, sondern auch über die Protease-Aktivität. Als potenzieller antifibrotischer Mechanismus kommt auch eine Veränderung der Makrophagenpopulation durch CXCL10 in Frage (vgl. 5.4).

In Hinblick auf die Angiogenese in der Hyperoxie-exponierten Lunge hat unsere Studie nur geringfügige Effekte der CXCL10-Defizienz gezeigt. Die Anzahl an Blutgefäßen bis 100 µm war signifikant, aber nur leichtgradig erhöht, während die Proteinexpression des Endothelmarkers VE-Cadherin bei Blockade von CXCL10 reduziert war (vgl. 4.1.1.3). Geht man in Anbetracht der erhöhten Gefäßanzahl und der gesteigerten Alveolarisierung bei

CXCL10-Defizienz trotz des VE-Cadherin-Verlustes von einer verbesserten Angiogenese aus, kommen verschiedene Ursachen hierfür infrage: Es ist z.B. denkbar, dass der protektive Effekt auf die abgemilderte pulmonale Inflammation bei CXCL10-Knockout zurückgeht¹¹². Weiterhin ist ein Wegfall der vorbeschriebenen inhibierenden Wirkung von CXCL10 auf die Chemotaxis von Endothelzellen als Ursache der verstärkten Gefäßneubildung in Betracht zu ziehen¹⁷⁰.

Die Interaktionen zwischen CXCL10 und dem pulmonalen Phänotyp sind mehrheitlich spekulativ. Hier sollten unbedingt weitere Untersuchungen ansetzen. Möglicherweise kann man sich die protektive Wirkung einer CXCL10-Defizienz in Bezug auf Inflammation und Phänotyp aber schon früher zu Nutze machen.

5.6 CXCL10 als Angriffspunkt zielgerichteter Therapien

In der jüngeren Vergangenheit wurden für verschiedene entzündliche Lungenerkrankungen neue Therapien entwickelt, die gezielt in die jeweils zugrundeliegenden Entzündungsmechanismen eingreifen. Für das schwere eosinophile Asthma bronchiale z.B. sind mit Mepolizumab, Reslizumab und Benralizumab mittlerweile mehrere Therapeutika zugelassen, die als monoklonale Antikörper spezifisch die Signalübertragung von IL-5 hemmen und so zur Symptomkontrolle und Einsparung von GK beitragen können²⁴⁶⁻²⁴⁸. Bei kritischen Fällen von COVID-19 kann der IL-6-Antikörper Tocilizumab die Mortalität senken^{249,250}.

Auch für die BPD werden zielgerichtete antiinflammatorische Therapien unbedingt benötigt. In unserer Studie konnten wir während der akuten Lungenschädigung durch die Hyperoxie bei CXCL10-Defizienz einen verbesserten pulmonalen Phänotyp und eine Hemmung der Makrophagen-vermittelten Inflammation nachweisen (vgl. 5.1 und 5.4). Obwohl die zugrundeliegenden Mechanismen noch größtenteils spekulativ sind (vgl. 5.5), rückt CXCL10 als potenzieller Angriffspunkt einer gezielten BPD-Therapie in den Fokus.

Bei anderen inflammatorischen Krankheiten ist die Forschung zu CXCL10-basierten Behandlungen teilweise schon weit fortgeschritten. Bei der Colitis ulcerosa hat sich eine Therapie mit Anti-CXCL10-Antikörpern bereits in der Phase 2 der Arzneimittelstudie bewährt²⁵¹. Durch die Hemmung von CXCL10 konnte hier eine Verbesserung von klinischem und histologischem Bild erreicht werden²⁵¹. Auch bei Methotrexat-refraktären Verläufen der rheumatoiden Arthritis hat sich eine Behandlung mit Anti-CXCL10-Antikörpern als effektiv erwiesen²⁵². Vielversprechend ist darüber hinaus die Blockade der CXCL10-abhängigen T-Zell-Migration in die Langerhans-Inseln bei Diabetes mellitus Typ 1²⁵³. Neben Anti-CXCL10-Antikörpern wird teilweise auch die Blockade des zugehörigen Rezeptors (CXCR3) bei

entzündlichen Erkrankungen erprobt²⁵⁴. Die genannten Beispiele machen Mut, dass CXCL10-blockierende Behandlungen in Zukunft auch bei der BPD erfolgreich eingesetzt werden könnten.

5.7 Was wir Neues über die bronchopulmonale Dysplasie gelernt haben

Die vorliegende Arbeit hat sich anhand eines Tiermodells mit der Pathophysiologie der BPD befasst. Hierbei lag der Fokus auf der pulmonalen Entzündungsreaktion, die nach aktuellem Verständnis den wichtigsten Faktor in der Pathogenese der Erkrankung darstellt^{23,32,75,100,112,140}. Konkret wurde mithilfe von Knockout-Tieren erstmalig die funktionelle Rolle von CXCL10 in der Hyperoxie-induzierten Lungenerkrankung der neugeborenen Maus untersucht. Dabei sollte die Frage beantwortet werden, wie sich die CXCL10-Defizienz auf den pulmonalen Phänotyp unter Hyperoxie-Exposition und auf die anschließende Regenerationsphase auswirkt (vgl. 2.5).

In der Vergangenheit konnten verschiedene Studien eine Assoziation zwischen (experimenteller) BPD und einer gesteigerten CXCL10-Expression nachweisen^{149,172,173}. Ob und inwiefern CXCL10 aber auch pathophysiologisch an der Entwicklung der Lungenschädigung beteiligt ist, war bisher ungeklärt. Die vorliegende Arbeit belegt, dass CXCL10 funktionell zur Hyperoxie-induzierten chronischen Lungenerkrankung beiträgt und identifiziert darüber hinaus mehrere Pathomechanismen, die über CXCL10 beeinflusst werden. So konnten wir nachweisen, dass Makrophageninflux, Apoptose, alveoläres Wachstum und Proteaseaktivität in der Hyperoxie-exponierten Lunge zumindest partiell von CXCL10 abhängig sind (vgl. 4.1 und 5.1).

Durch Betrachtung der Regeneration nach Hyperoxie-Exposition haben wir außerdem Neues zu den physiologischen Funktionen von CXCL10 herausgefunden. So haben wir im Tiermodell belegt, dass der vollständige Verlust von CXCL10 mit negativen Auswirkungen für Regeneration, Wachstum und Homöostase der Lunge verbunden ist. Dadurch konnten wir einen phasenabhängigen Mechanismus für CXCL10 in der BPD erarbeiten (vgl. 4.2 und 5.1).

Im Einklang mit anderen kürzlich veröffentlichten Studien unterstreicht unsere Arbeit außerdem den herausragenden Stellenwert der Makrophagen für die (experimentelle) BPD (vgl. 4.1.3)^{143,157}.

Indem wir zeigen konnten, dass CXCL10-Defizienz während der akuten Schädigungsphase zu einer gehemmten pulmonalen Entzündung und einer phänotypischen Protektion in Hinblick auf Alveolarisierung und Septumdicke führt, konnten wir mit CXCL10 darüber hinaus einen vielversprechenden Angriffspunkt für zielgerichtete Therapien der BPD identifizieren.

5.8 Limitationen der Arbeit

Die vorherigen Abschnitte unterstreichen, dass die Ergebnisse unserer Studie interessante Schlussfolgerungen zur funktionellen Rolle von CXCL10 und allgemein zur Inflammation in der Hyperoxie-induzierten Lungenschädigung zulassen. Im Folgenden werden verschiedene Limitationen der vorliegenden Arbeit diskutiert, die bei der Interpretation der Studienergebnisse zu berücksichtigen sind.

Die begrenzte Aussagekraft des translationalen Modells der Hyperoxie-induzierten Lungenschädigung wurde als wichtige methodische Limitation bereits eingehend besprochen (vgl. 5.2). Ein weiterer potenzieller Fallstrick ergibt sich durch den Einsatz von Knockout-Tieren. Ein Review von El-Brolosy et al. hat sich kürzlich mit der genetischen Kompensation eines homozygoten Gen-Knockouts in verschiedenen Modellorganismen beschäftigt²⁵⁵. Demnach kann der Knockout eines Gens teilweise durch die Hochregulation verwandter Gene mit ähnlicher Funktion ausgeglichen werden²⁵⁵. Auch für unser Experiment ist eine derartige Kompensation des *Cxcl10*-Verlustes nicht auszuschließen. Zur weiteren Adressierung des Problems könnte man in Folgeexperimenten das Protein CXCL10 direkt hemmen und die resultierenden Effekte mit denen des Gen-Knockouts vergleichen.

In Bezug auf den experimentellen Aufbau ist weiterhin zu beachten, dass die mittels RT-PCR untersuchte mRNA-Expression immer nur einer Momentaufnahme entspricht, die nicht repräsentativ für alle Zeitpunkte der betrachteten Phase (vgl. Abbildung 6) sein muss. Wenn wir also am P14 bei den Wildtypen der Hyperoxie-Gruppe keine erhöhte Kollagenexpression messen können (vgl. 4.1.2.2), schließt dies keineswegs eine gesteigerte Kollagensynthese in der frühen Schädigungsphase (z.B. in der ersten Lebenswoche) aus. Immerhin zeigen die Untersuchungen des Myofibroblasten-Markers α -SMA (vgl. 4.1.2.2), des Kollagengehalts und der Septendicke (vgl. 4.1.2.1), dass während der Hyperoxie-Exposition eine Kollagenakkumulation stattgefunden haben muss. Die histologische Struktur und zu einem gewissen Grad auch die Proteinkonzentrationen sind über die Zeit deutlich konstanter als die Genexpression.

Schwierigkeit in der Interpretation von experimentellen Ergebnissen ergeben sich auch dann, wenn mehrere Verfahren zur Untersuchung derselben Variable scheinbar nicht vereinbare Resultate liefern. Dies kann dadurch begründet sein, dass die Methoden unterschiedlich sensitiv sind bzw. geringfügig anderen Einflüssen unterliegen. Anhand zweier konkreter Beispiele aus der vorliegenden Studie wird dieser Aspekt klarer:

Sowohl der MLI als auch die durchschnittliche Oberfläche der einzelnen Alveole gelten als Surrogatparameter der *alveolar surface area*, wobei sie sich antiproportional zu dieser verhalten^{101,103}. Während aber die Oberfläche der einzelnen Alveole bei den CXCL10-

defizienten Mäusen (*Cxcl10*^{-/-} HYX) im Vergleich zu den Wildtypen (WT HYX) unter Hyperoxie signifikant vermindert war (entsprechend einer erhöhten *alveolar surface area*), gab es im MLI keinen Unterschied (vgl. 4.1.1.1). Möglicherweise ist der MLI als Untersuchungsmethode weniger sensitiv. Denkbar ist auch, dass die Anzahl an Schnittpunkten mit dem Gitternetz (vgl. 3.3.5) aufgrund der verminderten Septendicke bei den Knockout-Mäusen (*Cxcl10*^{-/-} HYX; vgl. 4.1.2.1) reduziert war und dadurch die Effekte der höheren Alveolenanzahl auf den MLI verschleiert wurden. Wie genau die Diskrepanz zustande kommt, kann nicht abschließend geklärt werden. Es ist jedenfalls im Hinterkopf zu behalten, dass jeder Surrogatparameter mit Einschränkungen verbunden ist.

Dies zeigt auch das zweite Beispiel. Bei der Untersuchung der Vaskularisierung der murinen Lungen unter Hyperoxie waren die Aussagen der Gefäßauszählung und des Immunoblots für den Endothelmarker VE-Cadherin scheinbar widersprüchlich. VE-Cadherin war bei den CXCL10-defizienten Tieren (*Cxcl10*^{-/-} HYX) im Vergleich zu den Wildtypen (WT HYX) unter Hyperoxie vermindert, obwohl im Gewebeschnitt mehr Gefäße gezählt werden konnten (vgl. 4.1.1.3). Man kann sich fragen, inwiefern die Expression eines Endothelmarkers repräsentativ für die Gefäßanzahl ist. Tragen die kleinen Gefäße – die bei den Knockout-Tieren vornehmlich vermehrt waren – mit ihrer kleinen Endothelfläche überhaupt relevant zur Gesamtkonzentration von VE-Cadherin in der Lunge bei? Ist der Effekt gegenüber großen Pulmonalarterien oder Pulmonalvenen vielleicht vernachlässigbar? Repräsentiert das endotheliale Adhäsionsprotein VE-Cadherin die Menge an Endothelzellen oder eher die vaskuläre Permeabilität ²⁵⁶? Auch diese Fragen müssen vorerst unbeantwortet bleiben. Zumindest sollten die Ergebnisse zur Angiogenese kritisch betrachtet und nur mit Vorsicht gedeutet werden.

Zuletzt möchte ich darauf hinweisen, dass unsere Studie die funktionelle Rolle von CXCL10 in der Hyperoxie-induzierten Lungenerkrankung als Modell der BPD natürlich nur beginnend und damit unvollständig untersucht. Viele Ergebnisse sind eher deskriptiver Natur und lassen nur begrenzte Rückschlüsse auf die zugrundeliegenden Mechanismen zu. Im nächsten Kapitel wird es darum gehen, wie Folgefragen, die sich aus unserer Studie ergeben haben, beantwortet werden könnten und welche Experimente wir vorschlagen, um CXCL10 und mögliche Implikationen für die klinische Praxis weiter zu erforschen (vgl. 5.9).

5.9 Ausblick

Aus der vorliegenden Arbeit geht hervor, dass CXCL10 zur Pathogenese der Hyperoxie-induzierten Lungenerkrankung der neugeborenen Maus als Modell der BPD beiträgt (vgl. 5.1). Aufgaben anknüpfender Forschungsarbeiten könnten darin liegen, die Mechanismen hinter den unter Hyperoxie beobachteten Effekten genauer zu erforschen und die pathogenetische Bedeutung von CXCL10 zusätzlich zu verifizieren (1).

Außerdem konnten wir anhand unserer Studienergebnisse auf eine beeinträchtigte pulmonale Regeneration bei CXCL10-Defizienz schließen (vgl. 5.1). In unseren Analysen zur Regenerationsphase haben wir uns auf das Lungenwachstum als wichtigste phänotypische Zielgröße konzentriert. Andere Aspekte der Regeneration könnten Gegenstand nachfolgender Studien sein (2).

Da wir in unserem Experiment positive Auswirkungen einer CXCL10-Defizienz auf den pulmonalen Phänotyp während der Lungenschädigung durch die Hyperoxie beobachten konnten (vgl. 5.1), haben wir abschließend eine CXCL10-Blockade als mögliche Therapieoption bei der BPD diskutiert. Ob sich CXCL10 oder der zugehörige Rezeptor CXCR3 wirklich als therapeutische Angriffspunkte eignen, müsste weiter geprüft werden (3).

Vorschläge zu 1:

Wir haben postuliert, dass CXCL10 durch eine Veränderung der pulmonalen Makrophagenpopulation zur Pathogenese der Hyperoxie-induzierten Lungenschädigung beiträgt (vgl. 5.4 und 5.5). Anknüpfend an diese These könnte man gezielt analysieren, welche Makrophagenphänotypen bei erhaltener bzw. blockierter CXCL10-Sekretion in der Lunge vorzufinden sind. Es wäre interessant, zwischen residenten AM und *monocyte-derived macrophages* zu differenzieren, da diese nach aktuellem Stand der Forschung sehr unterschiedliche Funktionen übernehmen können^{157,241}. Weiterhin haben wir wiederholt betont, dass M1- und M2-ähnliche Makrophagen jeweils als aus heterogenen Subpopulationen bestehende Gruppen zu verstehen sind²³⁴. Auch diese könnte man spezifisch aufschlüsseln. Methodisch bieten sich hierfür *fluorescence activated cell sorting* (FACS) sowie *single cell RNA-sequencing* an^{257,258}.

Weiterhin könnte man untersuchen, wie die stark reduzierte Makrophagenakkumulation in der Hyperoxie-exponierten Lunge bei CXCL10-Defizienz zu erklären ist. Mechanistisch ist eine Blockade der Makrophageninvasion bei CXCL10-Verlust anzunehmen. Um diese Hypothese zu testen, könnte man in der Zellkultur die Chemotaxis pulmonaler Makrophagen unter Hyperoxie bei Blockade von CXCL10 bzw. CXCR3 analysieren.

Unsere Schlussfolgerung, dass CXCL10 zur Pathogenese der Hyperoxie-induzierten Lungenschädigung beiträgt, basiert auf unseren Erhebungen zur CXCL10-Defizienz. Die Beweisführung ist also indirekt aufgebaut. Im Sinne einer direkten Herangehensweise könnte man zur Untermauerung der These prüfen, ob durch die hochkonzentrierte Verabreichung von CXCL10 bei neugeborenen Mäusen der Phänotyp der Hyperoxie-induzierten Lungenerkrankung simuliert werden kann.

Vorschläge zu 2:

Um die Auswirkungen eines CXCL10-Verlustes auf die Erholung nach Hyperoxie-induzierter Lungenschädigung umfassender zu erforschen, könnte man neben dem Lungenwachstum in der Regenerationsphase auch andere Parameter – wie z.B. die Zusammensetzung der EZM – betrachten. Die Methoden könnten sich hierbei an unseren Untersuchungen zur akuten Schädigungsphase orientieren (vgl. 4.1).

Vorschläge zu 3:

Wir haben für CXCL10 einen dualen Mechanismus erarbeitet und die physiologische Bedeutung für Regeneration und Homöostase der Lunge hervorgehoben (vgl. 5.1). Möchte man CXCL10 als Angriffspunkt zielgerichteter Therapien der BPD nutzen, sollte die Blockade folglich zum Zeitpunkt der pathologisch erhöhten Freisetzung in der Schädigungsphase ansetzen. Am Tiermodell der Hyperoxie-induzierten Lungenerkrankung könnte man untersuchen, ob durch eine zeitlich auf die Phase der Hyperoxie-Exposition begrenzte Hemmung von CXCL10 ein pulmonaler Schutzeffekt erzielt werden kann, ohne dass die anschließende Regeneration gestört wird. Es sind schon verschiedene Antikörper gegen CXCR3 und CXCL10 in der Forschung etabliert, die man für eine derartige experimentelle Studie nutzen könnte ^{253,259,260}. Zudem sind humane monoklonale Anti-CXCL10-Antikörper (z.B. BMS-936557) für die Anwendung am Menschen zugelassen, die perspektivisch in klinischen BPD-Studien erprobt werden könnten ²⁶⁰. Die Hoffnung ist, dass in Zukunft durch eine präventive CXCL10-Blockade bei frühgeborenen Kindern die Beeinträchtigung des Lungenwachstums abgemildert werden kann.

6 Literaturverzeichnis

1. Chawanpaiboon S, Vogel JP, Moller AB, et al. Global, regional, and national estimates of levels of preterm birth in 2014: a systematic review and modelling analysis. *Lancet Glob Health* 2019; 7(1): e37-e46.
2. World Health Organization. Preterm birth. 2018. <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/preterm-birth> (zuletzt abgerufen am 17.08.2021).
3. Schleußner E. The prevention, diagnosis and treatment of premature labor. *Dtsch Arztebl Int* 2013; 110(13): 227-35; quiz 36.
4. Cutland CL, Lackritz EM, Mallett-Moore T, et al. Low birth weight: Case definition & guidelines for data collection, analysis, and presentation of maternal immunization safety data. *Vaccine* 2017; 35(48 Pt A): 6492-500.
5. World Health Organization. New global estimates on preterm birth published. 2018. <https://www.who.int/reproductivehealth/global-estimates-preterm-birth/en/> (zuletzt abgerufen am 30.09.2020).
6. Dong Y, Yu JL. An overview of morbidity, mortality and long-term outcome of late preterm birth. *World J Pediatr* 2011; 7(3): 199-204.
7. Raju TN, Higgins RD, Stark AR, Leveno KJ. Optimizing care and outcome for late-preterm (near-term) infants: a summary of the workshop sponsored by the National Institute of Child Health and Human Development. *Pediatrics* 2006; 118(3): 1207-14.
8. Stoll BJ, Hansen NI, Bell EF, et al. Neonatal outcomes of extremely preterm infants from the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics* 2010; 126(3): 443-56.
9. Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, Österreichische Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, Schweizer Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe. Prävention und Therapie der Frühgeburt. 2018. <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/015-025.html> (zuletzt abgerufen am 19.08.2021).
10. Ochiai M, Kinjo T, Takahata Y, et al. Survival and neurodevelopmental outcome of preterm infants born at 22-24 weeks of gestational age. *Neonatology* 2014; 105(2): 79-84.
11. Thébaud B, Goss KN, Laughon M, et al. Bronchopulmonary dysplasia. *Nat Rev Dis Primers* 2019; 5(1): 78.
12. Mercer BM. Periviable Birth and the Shifting Limit of Viability. *Clin Perinatol* 2017; 44(2): 283-6.
13. Seri I, Evans J. Limits of viability: definition of the gray zone. *J Perinatol* 2008; 28 Suppl 1: S4-8.
14. Iams JD, Romero R, Culhane JF, Goldenberg RL. Primary, secondary, and tertiary interventions to reduce the morbidity and mortality of preterm birth. *Lancet* 2008; 371(9607): 164-75.
15. Roberts D, Dalziel S. Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; (3): Cd004454.
16. Härtel C, Paul P, Hanke K, et al. Less invasive surfactant administration and complications of preterm birth. *Sci Rep* 2018; 8(1): 8333.
17. Allen MC, Cristofalo EA, Kim C. Outcomes of preterm infants: morbidity replaces mortality. *Clin Perinatol* 2011; 38(3): 441-54.
18. National Institutes of Health. Bronchopulmonary Dysplasia. n.d. <https://www.nhlbi.nih.gov/health-topics/bronchopulmonary-dysplasia> (zuletzt abgerufen am 19.08.2021).

19. Alejandre-Alcazar MA, Kwapiszewska G, Reiss I, et al. Hyperoxia modulates TGF-beta/BMP signaling in a mouse model of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 292(2): L537-49.
20. Voynow JA. "New" bronchopulmonary dysplasia and chronic lung disease. *Paediatr Respir Rev* 2017; 24: 17-8.
21. Principi N, Di Pietro GM, Esposito S. Bronchopulmonary dysplasia: clinical aspects and preventive and therapeutic strategies. *J Transl Med* 2018; 16(1): 36.
22. Jensen EA, Schmidt B. Epidemiology of bronchopulmonary dysplasia. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2014; 100(3): 145-57.
23. Strueby L, Thébaud B. Advances in bronchopulmonary dysplasia. *Expert Rev Respir Med* 2014; 8(3): 327-38.
24. Howling SJ, Northway WH, Jr., Hansell DM, Moss RB, Ward S, Müller NL. Pulmonary sequelae of bronchopulmonary dysplasia survivors: high-resolution CT findings. *AJR Am J Roentgenol* 2000; 174(5): 1323-6.
25. Davidson LM, Berkelhamer SK. Bronchopulmonary Dysplasia: Chronic Lung Disease of Infancy and Long-Term Pulmonary Outcomes. *J Clin Med* 2017; 6(1).
26. Burri PH. Fetal and postnatal development of the lung. *Annu Rev Physiol* 1984; 46: 617-28.
27. Mullassery D, Smith NP. Lung development. *Semin Pediatr Surg* 2015; 24(4): 152-5.
28. Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin, Deutsche Gesellschaft für Kinder und Jugendmedizin. Prävention und Therapie der bronchopulmonalen Dysplasie Frühgeborener. 2009. <https://gnpi.de/leitlinien/> (zuletzt abgerufen am 20.01.2022).
29. Barkauskas CE, Cronce MJ, Rackley CR, et al. Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *J Clin Invest* 2013; 123(7): 3025-36.
30. Guillot L, Nathan N, Tabary O, et al. Alveolar epithelial cells: master regulators of lung homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol* 2013; 45(11): 2568-73.
31. Burri PH. Structural aspects of postnatal lung development - alveolar formation and growth. *Biol Neonate* 2006; 89(4): 313-22.
32. Kalikkot Thekkeveedu R, Guaman MC, Shivanna B. Bronchopulmonary dysplasia: A review of pathogenesis and pathophysiology. *Respir Med* 2017; 132: 170-7.
33. Stenmark KR, Abman SH. Lung vascular development: implications for the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Annu Rev Physiol* 2005; 67: 623-61.
34. Northway WH, Jr., Rosan RC, Porter DY. Pulmonary disease following respirator therapy of hyaline-membrane disease. Bronchopulmonary dysplasia. *N Engl J Med* 1967; 276(7): 357-68.
35. Jobe AJ. The new BPD: an arrest of lung development. *Pediatr Res* 1999; 46(6): 641-3.
36. Polin RA, Carlo WA. Surfactant replacement therapy for preterm and term neonates with respiratory distress. *Pediatrics* 2014; 133(1): 156-63.
37. Rojas MA, Gonzalez A, Bancalari E, Claire N, Poole C, Silva-Neto G. Changing trends in the epidemiology and pathogenesis of neonatal chronic lung disease. *J Pediatr* 1995; 126(4): 605-10.
38. Bancalari EH, Jobe AH. The respiratory course of extremely preterm infants: a dilemma for diagnosis and terminology. *J Pediatr* 2012; 161(4): 585-8.

39. Coalson J, Bland R. Chronic Lung Disease in Early Infancy. New York: Marcel Dekker; 2000.
40. Husain AN, Siddiqui NH, Stocker JT. Pathology of arrested acinar development in postsurfactant bronchopulmonary dysplasia. *Hum Pathol* 1998; 29(7): 710-7.
41. Jobe AH, Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163(7): 1723-9.
42. Poindexter BB, Feng R, Schmidt B, et al. Comparisons and Limitations of Current Definitions of Bronchopulmonary Dysplasia for the Prematurity and Respiratory Outcomes Program. *Ann Am Thorac Soc* 2015; 12(12): 1822-30.
43. Jensen EA, Dysart K, Gantz MG, et al. The Diagnosis of Bronchopulmonary Dysplasia in Very Preterm Infants. An Evidence-based Approach. *Am J Respir Crit Care Med* 2019; 200(6): 751-9.
44. Hines D, Modi N, Lee SK, et al. Scoping review shows wide variation in the definitions of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants and calls for a consensus. *Acta Paediatr* 2017; 106(3): 366-74.
45. Maitre NL, Ballard RA, Ellenberg JH, et al. Respiratory consequences of prematurity: evolution of a diagnosis and development of a comprehensive approach. *J Perinatol* 2015; 35(5): 313-21.
46. Walsh MC, Yao Q, Gettner P, et al. Impact of a physiologic definition on bronchopulmonary dysplasia rates. *Pediatrics* 2004; 114(5): 1305-11.
47. Higgins RD, Jobe AH, Koso-Thomas M, et al. Bronchopulmonary Dysplasia: Executive Summary of a Workshop. *J Pediatr* 2018; 197: 300-8.
48. Zeitlin J, Draper ES, Kollée L, et al. Differences in rates and short-term outcome of live births before 32 weeks of gestation in Europe in 2003: results from the MOSAIC cohort. *Pediatrics* 2008; 121(4): e936-44.
49. Shaw GM, O'Brodovich HM. Progress in understanding the genetics of bronchopulmonary dysplasia. *Semin Perinatol* 2013; 37(2): 85-93.
50. Wang H, St Julien KR, Stevenson DK, et al. A genome-wide association study (GWAS) for bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics* 2013; 132(2): 290-7.
51. Sabatelli D, Milet B, Mena P, Domínguez A. Growth restriction increases the risk of bronchopulmonary dysplasia, death, and sepsis in twins of 30 weeks or less of gestation. *Rev Chil Pediatr* 2019; 90(1): 36-43.
52. Bose C, Van Marter LJ, Laughon M, et al. Fetal growth restriction and chronic lung disease among infants born before the 28th week of gestation. *Pediatrics* 2009; 124(3): e450-8.
53. Sharma D, Shastri S, Sharma P. Intrauterine Growth Restriction: Antenatal and Postnatal Aspects. *Clin Med Insights Pediatr* 2016; 10: 67-83.
54. Hartling L, Liang Y, Lacaze-Masmonteil T. Chorioamnionitis as a risk factor for bronchopulmonary dysplasia: a systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2012; 97(1): F8-f17.
55. Kramer BW, Kallapur S, Newnham J, Jobe AH. Prenatal inflammation and lung development. *Semin Fetal Neonatal Med* 2009; 14(1): 2-7.
56. Alvira CM, Morty RE. Can We Understand the Pathobiology of Bronchopulmonary Dysplasia? *J Pediatr* 2017; 190: 27-37.
57. Antonucci R, Contu P, Porcella A, Atzeni C, Chiappe S. Intrauterine smoke exposure: a new risk factor for bronchopulmonary dysplasia? *J Perinat Med* 2004; 32(3): 272-7.

58. Isayama T, Shah PS, Ye XY, et al. Adverse Impact of Maternal Cigarette Smoking on Preterm Infants: A Population-Based Cohort Study. *Am J Perinatol* 2015; 32(12): 1105-11.
59. Spiegler J, Jensen R, Segerer H, et al. Influence of smoking and alcohol during pregnancy on outcome of VLBW infants. *Z Geburtshilfe Neonatol* 2013; 217(6): 215-9.
60. Singh SP, Gundavarapu S, Smith KR, et al. Gestational exposure of mice to secondhand cigarette smoke causes bronchopulmonary dysplasia blocked by the nicotinic receptor antagonist mecamylamine. *Environ Health Perspect* 2013; 121(8): 957-64.
61. Lambers DS, Clark KE. The maternal and fetal physiologic effects of nicotine. *Semin Perinatol* 1996; 20(2): 115-26.
62. Ko TJ, Tsai LY, Chu LC, et al. Parental smoking during pregnancy and its association with low birth weight, small for gestational age, and preterm birth offspring: a birth cohort study. *Pediatr Neonatol* 2014; 55(1): 20-7.
63. Wai KC, Kohn MA, Ballard RA, et al. Early Cumulative Supplemental Oxygen Predicts Bronchopulmonary Dysplasia in High Risk Extremely Low Gestational Age Newborns. *J Pediatr* 2016; 177: 97-102.e2.
64. Kulkarni AC, Kuppusamy P, Parinandi N. Oxygen, the lead actor in the pathophysiologic drama: enactment of the trinity of normoxia, hypoxia, and hyperoxia in disease and therapy. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9(10): 1717-30.
65. Viña J, Vento M, García-Sala F, et al. L-cysteine and glutathione metabolism are impaired in premature infants due to cystathionase deficiency. *Am J Clin Nutr* 1995; 61(5): 1067-9.
66. Georgeson GD, Szony BJ, Streitman K, et al. Antioxidant enzyme activities are decreased in preterm infants and in neonates born via caesarean section. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002; 103(2): 136-9.
67. Bhandari V, Elias JA. Cytokines in tolerance to hyperoxia-induced injury in the developing and adult lung. *Free Radic Biol Med* 2006; 41(1): 4-18.
68. Keszler M, Sant'Anna G. Mechanical Ventilation and Bronchopulmonary Dysplasia. *Clin Perinatol* 2015; 42(4): 781-96.
69. Marshall DD, Kotelchuck M, Young TE, Bose CL, Kruyer L, O'Shea TM. Risk factors for chronic lung disease in the surfactant era: a North Carolina population-based study of very low birth weight infants. North Carolina Neonatologists Association. *Pediatrics* 1999; 104(6): 1345-50.
70. Slutsky AS, Ranieri VM. Ventilator-induced lung injury. *N Engl J Med* 2013; 369(22): 2126-36.
71. Tremblay LN, Slutsky AS. Ventilator-induced injury: from barotrauma to biotrauma. *Proc Assoc Am Physicians* 1998; 110(6): 482-8.
72. Oh W, Poindexter BB, Perritt R, et al. Association between fluid intake and weight loss during the first ten days of life and risk of bronchopulmonary dysplasia in extremely low birth weight infants. *J Pediatr* 2005; 147(6): 786-90.
73. Lahra MM, Beeby PJ, Jeffery HE. Intrauterine inflammation, neonatal sepsis, and chronic lung disease: a 13-year hospital cohort study. *Pediatrics* 2009; 123(5): 1314-9.
74. Odabasi IO, Bulbul A. Neonatal Sepsis. *Sisli Etfal Hastan Tip Bul* 2020; 54(2): 142-58.
75. Hilgendorff A, O'Reilly MA. Bronchopulmonary dysplasia early changes leading to long-term consequences. *Front Med (Lausanne)* 2015; 2: 2.
76. Willis KA, Weems MF. Hemodynamically significant patent ductus arteriosus and the development of bronchopulmonary dysplasia. *Congenit Heart Dis* 2019; 14(1): 27-32.

77. Coalson JJ. Pathology of new bronchopulmonary dysplasia. *Semin Neonatol* 2003; 8(1): 73-81.
78. Ahlfeld SK, Gao Y, Conway SJ, Tepper RS. Relationship of structural to functional impairment during alveolar-capillary membrane development. *Am J Pathol* 2015; 185(4): 913-9.
79. Balinotti JE, Chakr VC, Tiller C, et al. Growth of lung parenchyma in infants and toddlers with chronic lung disease of infancy. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181(10): 1093-7.
80. Jakkula M, Le Cras TD, Gebb S, et al. Inhibition of angiogenesis decreases alveolarization in the developing rat lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279(3): L600-7.
81. Abman SH. Bronchopulmonary dysplasia: "a vascular hypothesis". *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164(10 Pt 1): 1755-6.
82. Mourani PM, Abman SH. Pulmonary vascular disease in bronchopulmonary dysplasia: pulmonary hypertension and beyond. *Curr Opin Pediatr* 2013; 25(3): 329-37.
83. Thébaud B, Abman SH. Bronchopulmonary dysplasia: where have all the vessels gone? Roles of angiogenic growth factors in chronic lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175(10): 978-85.
84. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18(1): 4-25.
85. Pelosi P, Rocco PR, Negrini D, Passi A. The extracellular matrix of the lung and its role in edema formation. *An Acad Bras Cienc* 2007; 79(2): 285-97.
86. Mižíková I, Morty RE. The Extracellular Matrix in Bronchopulmonary Dysplasia: Target and Source. *Front Med (Lausanne)* 2015; 2: 91.
87. Thibeault DW, Mabry SM, Ekekezie, II, Truog WE. Lung elastic tissue maturation and perturbations during the evolution of chronic lung disease. *Pediatrics* 2000; 106(6): 1452-9.
88. Thibeault DW, Mabry SM, Ekekezie, II, Zhang X, Truog WE. Collagen scaffolding during development and its deformation with chronic lung disease. *Pediatrics* 2003; 111(4 Pt 1): 766-76.
89. Mižíková I, Ruiz-Camp J, Steenbock H, et al. Collagen and elastin cross-linking is altered during aberrant late lung development associated with hyperoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2015; 308(11): L1145-58.
90. Aly H, Mansi Y, Ez El Din Z, Gabr Metwally H, Sabry A. Mesenchymal stromal cells and TGF- β 1 in tracheal aspirate of premature infants: early predictors for bronchopulmonary dysplasia? *J Perinat Med* 2019; 47(4): 470-7.
91. Kunzmann S, Speer CP, Jobe AH, Kramer BW. Antenatal inflammation induced TGF- β 1 but suppressed CTGF in preterm lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 292(1): L223-31.
92. Toti P, Buonocore G, Tanganelli P, et al. Bronchopulmonary dysplasia of the premature baby: an immunohistochemical study. *Pediatr Pulmonol* 1997; 24(1): 22-8.
93. Habel DM, Hogaboam CM. Heterogeneity of Fibroblasts and Myofibroblasts in Pulmonary Fibrosis. *Curr Pathobiol Rep* 2017; 5(2): 101-10.
94. Torday JS, Torres E, Rehan VK. The role of fibroblast transdifferentiation in lung epithelial cell proliferation, differentiation, and repair in vitro. *Pediatr Pathol Mol Med* 2003; 22(3): 189-207.
95. Xie T, Wang Y, Deng N, et al. Single-Cell Deconvolution of Fibroblast Heterogeneity in Mouse Pulmonary Fibrosis. *Cell Rep* 2018; 22(13): 3625-40.

96. Hinz B. Myofibroblasts. *Exp Eye Res* 2016; 142: 56-70.
97. Pakshir P, Noskovicova N, Lodyga M, et al. The myofibroblast at a glance. *J Cell Sci* 2020; 133(13).
98. Lecarpentier Y, Gourrier E, Gobert V, Vallée A. Bronchopulmonary Dysplasia: Crosstalk Between PPAR γ , WNT/ β -Catenin and TGF- β Pathways; The Potential Therapeutic Role of PPAR γ Agonists. *Front Pediatr* 2019; 7: 176.
99. Park JW, Hwang SR, Yoon IS. Advanced Growth Factor Delivery Systems in Wound Management and Skin Regeneration. *Molecules* 2017; 22(8).
100. Morty RE. Recent advances in the pathogenesis of BPD. *Semin Perinatol* 2018; 42(7): 404-12.
101. Vicencio AG, Eickelberg O, Stankewich MC, Kashgarian M, Haddad GG. Regulation of TGF-beta ligand and receptor expression in neonatal rat lungs exposed to chronic hypoxia. *J Appl Physiol (1985)* 2002; 93(3): 1123-30.
102. Clark DA, Coker R. Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30(3): 293-8.
103. Vicencio AG, Lee CG, Cho SJ, et al. Conditional overexpression of bioactive transforming growth factor-beta1 in neonatal mouse lung: a new model for bronchopulmonary dysplasia? *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 31(6): 650-6.
104. Oak P, Hilgendorff A. The BPD trio? Interaction of dysregulated PDGF, VEGF, and TGF signaling in neonatal chronic lung disease. *Mol Cell Pediatr* 2017; 4(1): 11.
105. Popova AP, Bentley JK, Cui TX, et al. Reduced platelet-derived growth factor receptor expression is a primary feature of human bronchopulmonary dysplasia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2014; 307(3): L231-9.
106. Osornio-Vargas AR, Lindroos PM, Coin PG, Badgett A, Hernandez-Rodriguez NA, Bonner JC. Maximal PDGF-induced lung fibroblast chemotaxis requires PDGF receptor-alpha. *Am J Physiol* 1996; 271(1 Pt 1): L93-9.
107. Chao CM, Chong L, Chu X, et al. Targeting Bronchopulmonary Dysplasia-Associated Pulmonary Hypertension (BPD-PH): Potential Role of the FGF Signaling Pathway in the Development of the Pulmonary Vascular System. *Cells* 2020; 9(8).
108. McGrath-Morrow SA, Stahl J. Apoptosis in neonatal murine lung exposed to hyperoxia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 25(2): 150-5.
109. Bland RD, Ertsey R, Mokres LM, et al. Mechanical ventilation uncouples synthesis and assembly of elastin and increases apoptosis in lungs of newborn mice. Prelude to defective alveolar septation during lung development? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; 294(1): L3-14.
110. De Paepe ME, Mao Q, Chao Y, Powell JL, Rubin LP, Sharma S. Hyperoxia-induced apoptosis and Fas/FasL expression in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 289(4): L647-59.
111. Shahzad T, Radajewski S, Chao CM, Bellusci S, Ehrhardt H. Pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia: when inflammation meets organ development. *Mol Cell Pediatr* 2016; 3(1): 23.
112. Speer CP. Inflammation and bronchopulmonary dysplasia. *Semin Neonatol* 2003; 8(1): 29-38.
113. Madurga A, Mizíková I, Ruiz-Camp J, Morty RE. Recent advances in late lung development and the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2013; 305(12): L893-905.

114. Hakulinen AL, Heinonen K, Länsimies E, Kiekara O. Pulmonary function and respiratory morbidity in school-age children born prematurely and ventilated for neonatal respiratory insufficiency. *Pediatr Pulmonol* 1990; 8(4): 226-32.
115. Koumbourlis AC, Motoyama EK, Mutich RL, Mallory GB, Walczak SA, Fernald K. Longitudinal follow-up of lung function from childhood to adolescence in prematurely born patients with neonatal chronic lung disease. *Pediatr Pulmonol* 1996; 21(1): 28-34.
116. Lopez E, Mathlouthi J, Lescure S, Krauss B, Jarreau PH, Moriette G. Capnography in spontaneously breathing preterm infants with bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Pulmonol* 2011; 46(9): 896-902.
117. Greenough A, Alexander J, Burgess S, et al. Preschool healthcare utilisation related to home oxygen status. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2006; 91(5): F337-41.
118. Hilgendorff A, Reiss I, Gortner L, Schüler D, Weber K, Lindemann H. Impact of airway obstruction on lung function in very preterm infants at term. *Pediatr Crit Care Med* 2008; 9(6): 629-35.
119. Kinsella JP, Greenough A, Abman SH. Bronchopulmonary dysplasia. *Lancet* 2006; 367(9520): 1421-31.
120. Niedermaier S, Hilgendorff A. Bronchopulmonary dysplasia - an overview about pathophysiological concepts. *Mol Cell Pediatr* 2015; 2(1): 2.
121. Greenough A, Cox S, Alexander J, et al. Health care utilisation of infants with chronic lung disease, related to hospitalisation for RSV infection. *Arch Dis Child* 2001; 85(6): 463-8.
122. Lewis BA, Singer LT, Fulton S, et al. Speech and language outcomes of children with bronchopulmonary dysplasia. *J Commun Disord* 2002; 35(5): 393-406.
123. Short EJ, Klein NK, Lewis BA, et al. Cognitive and academic consequences of bronchopulmonary dysplasia and very low birth weight: 8-year-old outcomes. *Pediatrics* 2003; 112(5): e359.
124. Bahadue FL, Soll R. Early versus delayed selective surfactant treatment for neonatal respiratory distress syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 11(11): Cd001456.
125. Herting E, Härtel C, Göpel W. Less invasive surfactant administration (LISA): chances and limitations. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2019; 104(6): F655-f9.
126. Kribs A, Pillekamp F, Hünseler C, Vierzig A, Roth B. Early administration of surfactant in spontaneous breathing with nCPAP: feasibility and outcome in extremely premature infants (postmenstrual age \leq 27 weeks). *Paediatr Anaesth* 2007; 17(4): 364-9.
127. Klingenberg C, Wheeler KI, McCallion N, Morley CJ, Davis PG. Volume-targeted versus pressure-limited ventilation in neonates. *Cochrane Database Syst Rev* 2017; 10(10): Cd003666.
128. Doyle LW, Ehrenkranz RA, Halliday HL. Late (> 7 days) postnatal corticosteroids for chronic lung disease in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2014; (5): Cd001145.
129. Halliday HL, Ehrenkranz RA, Doyle LW. Early (< 8 days) postnatal corticosteroids for preventing chronic lung disease in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; (1): Cd001146.
130. Bassler D, Plavka R, Shinwell ES, et al. Early Inhaled Budesonide for the Prevention of Bronchopulmonary Dysplasia. *N Engl J Med* 2015; 373(16): 1497-506.
131. Shinwell ES, Portnov I, Meerpohl JJ, Karen T, Bassler D. Inhaled Corticosteroids for Bronchopulmonary Dysplasia: A Meta-analysis. *Pediatrics* 2016; 138(6).

132. Taha D, Kirkby S, Nawab U, et al. Early caffeine therapy for prevention of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2014; 27(16): 1698-702.
133. Ambalavanan N, Tyson JE, Kennedy KA, et al. Vitamin A supplementation for extremely low birth weight infants: outcome at 18 to 22 months. *Pediatrics* 2005; 115(3): e249-54.
134. Bose CL, Laughon MM. Patent ductus arteriosus: lack of evidence for common treatments. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2007; 92(6): F498-502.
135. Greenough A, Alexander J, Burgess S, et al. Home oxygen status and rehospitalisation and primary care requirements of infants with chronic lung disease. *Arch Dis Child* 2002; 86(1): 40-3.
136. Williams E, Greenough A. Advances in treating bronchopulmonary dysplasia. *Expert Rev Respir Med* 2019; 13(8): 727-35.
137. Han W, Li X, Zhang H, Yu B, Guo C, Deng C. Recombinant human elafin promotes alveologenesis in newborn mice exposed to chronic hyperoxia. *Int J Biochem Cell Biol* 2017; 92: 173-82.
138. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 2008; 454(7203): 428-35.
139. Domingo-Gonzalez R, Zanini F, Che X, et al. Diverse homeostatic and immunomodulatory roles of immune cells in the developing mouse lung at single cell resolution. *Elife* 2020; 9.
140. Pierce MR, Bancalari E. The role of inflammation in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Pulmonol* 1995; 19(6): 371-8.
141. Nold MF, Mangan NE, Rudloff I, et al. Interleukin-1 receptor antagonist prevents murine bronchopulmonary dysplasia induced by perinatal inflammation and hyperoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110(35): 14384-9.
142. Rudloff I, Cho SX, Bui CB, et al. Refining anti-inflammatory therapy strategies for bronchopulmonary dysplasia. *J Cell Mol Med* 2017; 21(6): 1128-38.
143. Hirani D, Alvira CM, Danopoulos S, et al. Macrophage-derived IL-6 trans-signaling as a novel target in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Eur Respir J* 2021.
144. Speer CP. Pulmonary inflammation and bronchopulmonary dysplasia. *J Perinatol* 2006; 26 Suppl 1: S57-62; discussion S3-4.
145. Speer CP. Inflammation and bronchopulmonary dysplasia: a continuing story. *Semin Fetal Neonatal Med* 2006; 11(5): 354-62.
146. Kotecha S, Wilson L, Wangoo A, Silverman M, Shaw RJ. Increase in interleukin (IL)-1 beta and IL-6 in bronchoalveolar lavage fluid obtained from infants with chronic lung disease of prematurity. *Pediatr Res* 1996; 40(2): 250-6.
147. Kotecha S, Chan B, Azam N, Silverman M, Shaw RJ. Increase in interleukin-8 and soluble intercellular adhesion molecule-1 in bronchoalveolar lavage fluid from premature infants who develop chronic lung disease. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1995; 72(2): F90-6.
148. Groneck P, Götze-Speer B, Oppermann M, Eiffert H, Speer CP. Association of pulmonary inflammation and increased microvascular permeability during the development of bronchopulmonary dysplasia: a sequential analysis of inflammatory mediators in respiratory fluids of high-risk preterm neonates. *Pediatrics* 1994; 93(5): 712-8.

149. Aghai ZH, Saslow JG, Mody K, et al. IFN- γ and IP-10 in tracheal aspirates from premature infants: relationship with bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Pulmonol* 2013; 48(1): 8-13.
150. Munshi UK, Niu JO, Siddiq MM, Parton LA. Elevation of interleukin-8 and interleukin-6 precedes the influx of neutrophils in tracheal aspirates from preterm infants who develop bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Pulmonol* 1997; 24(5): 331-6.
151. Clement A, Chadelat K, Sardet A, Grimfeld A, Tournier G. Alveolar macrophage status in bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Res* 1988; 23(5): 470-3.
152. Jaarsma AS, Braaksma MA, Geven WB, van Oeveren W, Bambang Oetomo S. Activation of the inflammatory reaction within minutes after birth in ventilated preterm lambs with neonatal respiratory distress syndrome. *Biol Neonate* 2004; 86(1): 1-5.
153. Davies PL, Spiller OB, Beeton ML, Maxwell NC, Remold-O'Donnell E, Kotecha S. Relationship of proteinases and proteinase inhibitors with microbial presence in chronic lung disease of prematurity. *Thorax* 2010; 65(3): 246-51.
154. Arora S, Dev K, Agarwal B, Das P, Syed MA. Macrophages: Their role, activation and polarization in pulmonary diseases. *Immunobiology* 2018; 223(4-5): 383-96.
155. Strauss O, Dunbar PR, Bartlett A, Phillips A. The immunophenotype of antigen presenting cells of the mononuclear phagocyte system in normal human liver--a systematic review. *J Hepatol* 2015; 62(2): 458-68.
156. Das A, Sinha M, Datta S, et al. Monocyte and macrophage plasticity in tissue repair and regeneration. *Am J Pathol* 2015; 185(10): 2596-606.
157. Kalymbetova TV, Selvakumar B, Rodríguez-Castillo JA, et al. Resident alveolar macrophages are master regulators of arrested alveolarization in experimental bronchopulmonary dysplasia. *J Pathol* 2018; 245(2): 153-9.
158. Mantovani A, Sica A, Locati M. Macrophage polarization comes of age. *Immunity* 2005; 23(4): 344-6.
159. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* 2014; 6: 13.
160. NCBI GenBank database. C-X-C motif chemokine ligand 10 [Homo sapiens (human)]. 2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3627> (zuletzt abgerufen am 04.09.2021).
161. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000; 12(2): 121-7.
162. Arenberg DA, Polverini PJ, Kunkel SL, et al. The role of CXC chemokines in the regulation of angiogenesis in non-small cell lung cancer. *J Leukoc Biol* 1997; 62(5): 554-62.
163. Gotsch F, Romero R, Friel L, et al. CXCL10/IP-10: a missing link between inflammation and anti-angiogenesis in preeclampsia? *J Matern Fetal Neonatal Med* 2007; 20(11): 777-92.
164. Rotondi M, Lazzeri E, Romagnani P, Serio M. Role for interferon-gamma inducible chemokines in endocrine autoimmunity: an expanding field. *J Endocrinol Invest* 2003; 26(2): 177-80.
165. Neville LF, Mathiak G, Bagasra O. The immunobiology of interferon-gamma inducible protein 10 kD (IP-10): a novel, pleiotropic member of the C-X-C chemokine superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997; 8(3): 207-19.
166. Kazemi Fard T, Tavakoli S, Ahmadi R, et al. Evaluation of IP10 and miRNA 296-a Expression Levels in Peripheral Blood Mononuclear Cell of Coronary Artery Disease Patients and Controls. *DNA Cell Biol* 2020; 39(9): 1678-84.

167. Xuan W, Qu Q, Zheng B, Xiong S, Fan GH. The chemotaxis of M1 and M2 macrophages is regulated by different chemokines. *J Leukoc Biol* 2015; 97(1): 61-9.
168. Angiolillo AL, Sgadari C, Taub DD, et al. Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J Exp Med* 1995; 182(1): 155-62.
169. Sgadari C, Angiolillo AL, Tosato G. Inhibition of angiogenesis by interleukin-12 is mediated by the interferon-inducible protein 10. *Blood* 1996; 87(9): 3877-82.
170. Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, et al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *The Journal of biological chemistry* 1995; 270(45): 27348-57.
171. Wang Y, Zhou Q, Dong L, et al. The effects of CXCL10 polymorphisms on COPD susceptibility. *Mol Genet Genomics* 2018; 293(3): 649-55.
172. Alvarez-Fuente M, Moreno L, Lopez-Ortego P, et al. Exploring clinical, echocardiographic and molecular biomarkers to predict bronchopulmonary dysplasia. *PLoS One* 2019; 14(3): e0213210.
173. Harijith A, Choo-Wing R, Cataltepe S, et al. A role for matrix metalloproteinase 9 in IFN γ -mediated injury in developing lungs: relevance to bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011; 44(5): 621-30.
174. Will JP, Hirani DV, Thielen F, et al. Strain-dependent effects on lung structure, matrix remodeling and Stat3/Smad2 signaling in C57BL/6N and C57BL/6J mice after neonatal hyperoxia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2019.
175. Al-Tubuly AA. SDS-PAGE and Western Blotting. *Methods Mol Med* 2000; 40: 391-405.
176. Alejandro Alcazar MA, Ostreicher I, Appel S, et al. Developmental regulation of inflammatory cytokine-mediated Stat3 signaling: the missing link between intrauterine growth restriction and pulmonary dysfunction? *J Mol Med (Berl)* 2012; 90(8): 945-57.
177. Blutke A, Wanke R. Sampling Strategies and Processing of Biobank Tissue Samples from Porcine Biomedical Models. *J Vis Exp* 2018; (133).
178. Mattfeldt T, Mall G, Gharehbaghi H, Moller P. Estimation of surface area and length with the orientator. *J Microsc* 1990; 159(Pt 3): 301-17.
179. Ochs M, Muhlfield C. Quantitative microscopy of the lung: a problem-based approach. Part 1: basic principles of lung stereology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2013; 305(1): L15-22.
180. Nawabi J, Vohlen C, Dinger K, et al. Novel functional role of GH/IGF-I in neonatal lung myofibroblasts and in rat lung growth after intrauterine growth restriction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2018; 315(5): L623-I37.
181. Rydell-Tormanen K, Andreasson K, Hesselstrand R, et al. Extracellular matrix alterations and acute inflammation; developing in parallel during early induction of pulmonary fibrosis. *Lab Invest* 2012; 92(6): 917-25.
182. Cooney TP, Thurlbeck WM. The radial alveolar count method of Emery and Mithal: a reappraisal 1--postnatal lung growth. *Thorax* 1982; 37(8): 572-9.
183. Cooney TP, Thurlbeck WM. The radial alveolar count method of Emery and Mithal: a reappraisal 2--intrauterine and early postnatal lung growth. *Thorax* 1982; 37(8): 580-3.
184. Emery JL, Mithal A. The number of alveoli in the terminal respiratory unit of man during late intrauterine life and childhood. *Arch Dis Child* 1960; 35: 544-7.
185. Muhlfield C, Ochs M. Quantitative microscopy of the lung: a problem-based approach. Part 2: stereological parameters and study designs in various diseases of the respiratory tract. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2013; 305(3): L205-21.

186. Silva DM, Nardiello C, Pozarska A, Morty RE. Recent advances in the mechanisms of lung alveolarization and the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2015; 309(11): L1239-72.
187. Chao CM, Moiseenko A, Zimmer KP, Bellusci S. Alveologenesis: key cellular players and fibroblast growth factor 10 signaling. *Mol Cell Pediatr* 2016; 3(1): 17.
188. Foster JJ, Goss KL, George CL, Bangsund PJ, Snyder JM. Galectin-1 in secondary alveolar septae of neonatal mouse lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 291(6): L1142-9.
189. Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev YV. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Lab Invest* 2017; 97(1): 4-13.
190. Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 2006; 54(4): 385-95.
191. Eminaga S, Teekakirikul P, Seidman CE, Seidman JG. Detection of Cell Proliferation Markers by Immunofluorescence Staining and Microscopy Imaging in Paraffin-Embedded Tissue Sections. *Curr Protoc Mol Biol* 2016; 115: 14.25.1-14.25.14.
192. Kyrylkova K, Kyryachenko S, Leid M, Kioussi C. Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Methods Mol Biol* 2012; 887: 41-7.
193. Loo DT. In situ detection of apoptosis by the TUNEL assay: an overview of techniques. *Methods Mol Biol* 2011; 682: 3-13.
194. Navarro E, Serrano-Heras G, Castano MJ, Solera J. Real-time PCR detection chemistry. *Clin Chim Acta* 2015; 439: 231-50.
195. Tajadini M, Panjehpour M, Javanmard SH. Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. *Adv Biomed Res* 2014; 3: 85.
196. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods* 2001; 25(4): 402-8.
197. Hnasko TS, Hnasko RM. The Western Blot. *Methods Mol Biol* 2015; 1318: 87-96.
198. Kurien BT, Scofield RH. Western blotting. *Methods* 2006; 38(4): 283-93.
199. Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci* 2012; 4(9): 429-34.
200. Kim B. Western Blot Techniques. *Methods Mol Biol* 2017; 1606: 133-9.
201. Leber TM, Balkwill FR. Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. *Anal Biochem* 1997; 249(1): 24-8.
202. Vandooren J, Geurts N, Martens E, Van den Steen PE, Opdenakker G. Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes. *Nat Methods* 2013; 10(3): 211-20.
203. Toth M, Sohail A, Fridman R. Assessment of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by gelatin zymography. *Methods Mol Biol* 2012; 878: 121-35.
204. Pan D, Wilson KA, Tan-Wilson A. Transfer Zymography. *Methods Mol Biol* 2017; 1626: 253-69.
205. Zhang Z, Chen Z, Song Y, Zhang P, Hu J, Bai C. Expression of aquaporin 5 increases proliferation and metastasis potential of lung cancer. *J Pathol* 2010; 221(2): 210-20.
206. Nureki SI, Tomer Y, Venosa A, et al. Expression of mutant Sftpc in murine alveolar epithelia drives spontaneous lung fibrosis. *J Clin Invest* 2018; 128(9): 4008-24.

207. Massagué J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 753-91.
208. Derynck R, Gelbart WM, Harland RM, et al. Nomenclature: vertebrate mediators of TGFbeta family signals. *Cell* 1996; 87(2): 173.
209. Chakrabarti S, Patel KD. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology. *Exp Lung Res* 2005; 31(6): 599-621.
210. Cederqvist K, Sorsa T, Tervahartiala T, et al. Matrix metalloproteinases-2, -8, and -9 and TIMP-2 in tracheal aspirates from preterm infants with respiratory distress. *Pediatrics* 2001; 108(3): 686-92.
211. Schock BC, Sweet DG, Ennis M, Warner JA, Young IS, Halliday HL. Oxidative stress and increased type-IV collagenase levels in bronchoalveolar lavage fluid from newborn babies. *Pediatr Res* 2001; 50(1): 29-33.
212. Pan T, Xiao ZH. [Expression of P38 MAPK and MMP-2 mRNA in neonatal rats with hyperoxia-induced lung injury]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi* 2013; 15(5): 383-6.
213. Balany J, Bhandari V. Understanding the Impact of Infection, Inflammation, and Their Persistence in the Pathogenesis of Bronchopulmonary Dysplasia. *Front Med (Lausanne)* 2015; 2: 90.
214. Hilgendorff A, Reiss I, Ehrhardt H, Eickelberg O, Alvira CM. Chronic lung disease in the preterm infant. Lessons learned from animal models. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014; 50(2): 233-45.
215. Vazquez-Armendariz AI, Heiner M, El Agha E, et al. Multilineage murine stem cells generate complex organoids to model distal lung development and disease. *Embo j* 2020; 39(21): e103476.
216. Greco F, Wiegert S, Baumann P, Wellmann S, Pellegrini G, Cannizzaro V. Hyperoxia-induced lung structure-function relation, vessel rarefaction, and cardiac hypertrophy in an infant rat model. *J Transl Med* 2019; 17(1): 91.
217. Menon RT, Shrestha AK, Reynolds CL, Barrios R, Caron KM, Shivanna B. Adrenomedullin Is Necessary to Resolve Hyperoxia-Induced Experimental Bronchopulmonary Dysplasia and Pulmonary Hypertension in Mice. *Am J Pathol* 2020; 190(3): 711-22.
218. James ML, Ross AC, Nicola T, Steele C, Ambalavanan N. VARA attenuates hyperoxia-induced impaired alveolar development and lung function in newborn mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2013; 304(11): L803-12.
219. Chen X, Zhang X, Pan J. Effect of Montelukast on Bronchopulmonary Dysplasia (BPD) and Related Mechanisms. *Med Sci Monit* 2019; 25: 1886-93.
220. Dumpa V, Nielsen L, Wang H, Kumar VHS. Caffeine is associated with improved alveolarization and angiogenesis in male mice following hyperoxia induced lung injury. *BMC Pulm Med* 2019; 19(1): 138.
221. Warner BB, Stuart LA, Papes RA, Wispé JR. Functional and pathological effects of prolonged hyperoxia in neonatal mice. *Am J Physiol* 1998; 275(1): L110-7.
222. Willis GR, Fernandez-Gonzalez A, Reis M, et al. Mesenchymal stromal cell-derived small extracellular vesicles restore lung architecture and improve exercise capacity in a model of neonatal hyperoxia-induced lung injury. *J Extracell Vesicles* 2020; 9(1): 1790874.
223. Bonikos DS, Bensch KG, Ludwin SK, Northway WH, Jr. Oxygen toxicity in the newborn. The effect of prolonged 100 per cent O₂ exposure on the lungs of newborn mice. *Lab Invest* 1975; 32(5): 619-35.

224. Kramer EL, Deutsch GH, Sartor MA, et al. Perinatal increases in TGF- α disrupt the sacular phase of lung morphogenesis and cause remodeling: microarray analysis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293(2): L314-27.
225. Coalson JJ, Winter VT, Siler-Khodr T, Yoder BA. Neonatal chronic lung disease in extremely immature baboons. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160(4): 1333-46.
226. Awasthi S, Coalson JJ, Yoder BA, Crouch E, King RJ. Deficiencies in lung surfactant proteins A and D are associated with lung infection in very premature neonatal baboons. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163(2): 389-97.
227. Yoder BA, Siler-Khodr T, Winter VT, Coalson JJ. High-frequency oscillatory ventilation: effects on lung function, mechanics, and airway cytokines in the immature baboon model for neonatal chronic lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162(5): 1867-76.
228. Pierce RA, Albertine KH, Starcher BC, Bohnsack JF, Carlton DP, Bland RD. Chronic lung injury in preterm lambs: disordered pulmonary elastin deposition. *Am J Physiol* 1997; 272(3 Pt 1): L452-60.
229. Albertine KH, Jones GP, Starcher BC, et al. Chronic lung injury in preterm lambs. Disordered respiratory tract development. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159(3): 945-58.
230. Nardiello C, Mižiková I, Silva DM, et al. Standardisation of oxygen exposure in the development of mouse models for bronchopulmonary dysplasia. *Dis Model Mech* 2017; 10(2): 185-96.
231. Escobedo MB, Hilliard JL, Smith F, et al. A baboon model of bronchopulmonary dysplasia. I. Clinical features. *Exp Mol Pathol* 1982; 37(3): 323-34.
232. Ueda K, Cho K, Matsuda T, et al. A rat model for arrest of alveolarization induced by antenatal endotoxin administration. *Pediatr Res* 2006; 59(3): 396-400.
233. Cooke JP. Inflammation and Its Role in Regeneration and Repair. *Circ Res* 2019; 124(8): 1166-8.
234. Oishi Y, Manabe I. Macrophages in inflammation, repair and regeneration. *Int Immunol* 2018; 30(11): 511-28.
235. Wynn TA, Vannella KM. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity* 2016; 44(3): 450-62.
236. Brandes ME, Finkelstein JN. The production of alveolar macrophage-derived growth-regulating proteins in response to lung injury. *Toxicol Lett* 1990; 54(1): 3-22; discussion 1-2.
237. Zhang MZ, Yao B, Yang S, et al. CSF-1 signaling mediates recovery from acute kidney injury. *J Clin Invest* 2012; 122(12): 4519-32.
238. Iosef C, Alastalo TP, Hou Y, et al. Inhibiting NF- κ B in the developing lung disrupts angiogenesis and alveolarization. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012; 302(10): L1023-36.
239. Speer CP. New insights into the pathogenesis of pulmonary inflammation in preterm infants. *Biol Neonate* 2001; 79(3-4): 205-9.
240. Chua RL, Lukassen S, Trump S, et al. COVID-19 severity correlates with airway epithelium-immune cell interactions identified by single-cell analysis. *Nat Biotechnol* 2020; 38(8): 970-9.
241. Misharin AV, Morales-Nebreda L, Reyfman PA, et al. Monocyte-derived alveolar macrophages drive lung fibrosis and persist in the lung over the life span. *J Exp Med* 2017; 214(8): 2387-404.

242. Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet* 2020; 395(10229): 1033-4.
243. Tager AM, Kradin RL, LaCamera P, et al. Inhibition of pulmonary fibrosis by the chemokine IP-10/CXCL10. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 31(4): 395-404.
244. Nakaya I, Wada T, Furuichi K, et al. Blockade of IP-10/CXCR3 promotes progressive renal fibrosis. *Nephron Exp Nephrol* 2007; 107(1): e12-21.
245. Hintermann E, Bayer M, Pfeilschifter JM, Luster AD, Christen U. CXCL10 promotes liver fibrosis by prevention of NK cell mediated hepatic stellate cell inactivation. *J Autoimmun* 2010; 35(4): 424-35.
246. Busse W, Chupp G, Nagase H, et al. Anti-IL-5 treatments in patients with severe asthma by blood eosinophil thresholds: Indirect treatment comparison. *J Allergy Clin Immunol* 2019; 143(1): 190-200.e20.
247. Farne HA, Wilson A, Powell C, Bax L, Milan SJ. Anti-IL5 therapies for asthma. *Cochrane Database Syst Rev* 2017; 9(9): Cd010834.
248. Walsh GM. Anti-IL-5 monoclonal antibodies for the treatment of asthma: an update. *Expert Opin Biol Ther* 2020; 20(10): 1237-44.
249. Berardicurti O, Ruscitti P, Ursini F, et al. Mortality in tocilizumab-treated patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Clin Exp Rheumatol* 2020; 38(6): 1247-54.
250. Xu X, Han M, Li T, et al. Effective treatment of severe COVID-19 patients with tocilizumab. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020; 117(20): 10970-5.
251. Mayer L, Sandborn WJ, Stepanov Y, et al. Anti-IP-10 antibody (BMS-936557) for ulcerative colitis: a phase II randomised study. *Gut* 2014; 63(3): 442-50.
252. Yellin M, Paliienko I, Balanescu A, et al. A phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled study evaluating the efficacy and safety of MDX-1100, a fully human anti-CXCL10 monoclonal antibody, in combination with methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2012; 64(6): 1730-9.
253. Lasch S, Müller P, Bayer M, et al. Anti-CD3/Anti-CXCL10 Antibody Combination Therapy Induces a Persistent Remission of Type 1 Diabetes in Two Mouse Models. *Diabetes* 2015; 64(12): 4198-211.
254. Delano MJ, Moldawer LL. CXCR3 blockade: a novel anti-sepsis approach? *Crit Care* 2012; 16(6): 176.
255. El-Brolosy MA, Stainier DYR. Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. *PLoS Genet* 2017; 13(7): e1006780.
256. Vestweber D. VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28(2): 223-32.
257. Lugli E, Zanon V, Mavilio D, Roberto A. FACS Analysis of Memory T Lymphocytes. *Methods Mol Biol* 2017; 1514: 31-47.
258. Olsen TK, Baryawno N. Introduction to Single-Cell RNA Sequencing. *Curr Protoc Mol Biol* 2018; 122(1): e57.
259. Bonanni V, Antonangeli F, Santoni A, Bernardini G. Targeting of CXCR3 improves anti-myeloma efficacy of adoptively transferred activated natural killer cells. *J Immunother Cancer* 2019; 7(1): 290.
260. Van Raemdonck K, Van den Steen PE, Liekens S, Van Damme J, Struyf S. CXCR3 ligands in disease and therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2015; 26(3): 311-27.

7 Anhang

Appendix 1: Färbeprotokoll Hämatoxylin-Eosin (HE).

Reagenz	Inkubationszeit
Neo-Clear I	10 min
Neo-Clear II	10 min
Neo-Clear III	10 min
100% (Vol./Vol.) EtOH	1 min
96% (Vol./Vol.) EtOH	1 min
80% (Vol./Vol.) EtOH	1 min
70% (Vol./Vol.) EtOH	1 min
dH ₂ O	1 min
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	4 min
dH ₂ O	10 s (kurzes Waschen)
Leitungswasser	6 min
dH ₂ O	10 s (kurzes Waschen)
Eosin G-Lösung 0,5% wässrig	2 min
dH ₂ O	10 s (kurzes Waschen)
70% (Vol./Vol.) EtOH	1 min
80% (Vol./Vol.) EtOH	1 min
96% (Vol./Vol.) EtOH	1 min
100% (Vol./Vol.) EtOH	1 min
Neo-Clear IV	10 min
Neo-Clear V	10 min

Appendix 2: Färbeprotokoll Picro Sirius-Red.

Reagenz	Inkubationszeit
Neo-Clear I	10 min
Neo-Clear II	10 min
Neo-Clear III	10 min
100% (Vol./Vol.) EtOH	1 min
96% (Vol./Vol.) EtOH	1 min
80% (Vol./Vol.) EtOH	1 min
70% (Vol./Vol.) EtOH	1 min
dH ₂ O	1 min
Phosphormolybdänsäurelösung 0,2%	4 min
Picro Sirius-Red-Lösung	75 min
0,5% (Vol./Vol.) Essigsäure I	10 s (kurzes Waschen)
0,5% (Vol./Vol.) Essigsäure II	10 s (kurzes Waschen)
100% (Vol./Vol.) EtOH I	30 s
100% (Vol./Vol.) EtOH II	30 s
Neo-Clear IV	30 s
Neo-Clear V	30 s

Appendix 3: Protokoll Elastika-Färbung nach Hart.

Reagenz	Inkubationszeit
Neo-Clear I	10 min
Neo-Clear II	10 min
Neo-Clear III	10 min

100% (Vol./Vol.) EtOH	1 min
96% (Vol./Vol.) EtOH	1 min
80% (Vol./Vol.) EtOH	1 min
70% (Vol./Vol.) EtOH	1 min
dH ₂ O	1 min
Hart's Lösung: 1 Volumenanteil Resorcin-Fuchsin nach Weigert; 9 Volumenanteile 1% (Vol./Vol.) HCl in 70% (Vol./Vol.) EtOH	über Nacht
96% (Vol./Vol.) EtOH	10 s (kurzes Waschen)
1% (Vol./Vol.) HCl	30 s
Leitungswasser	10 s (kurzes Waschen)
dH ₂ O	10 s (kurzes Waschen)
0,5% (Vol./Vol.) Tartrazine + 0,25% (Vol./Vol.) Essigsäure	30 min
96% (Vol./Vol.) EtOH I	10 s (kurzes Waschen)
96% (Vol./Vol.) EtOH II	1 min
100% (Vol./Vol.) EtOH	2 min

Appendix 4: Liste der Primer und TaqMan-Sonden.

Zielgen	Bezeichnung	Sequenz
<i>Acta1</i> (TaqMan)	Forward-Primer Reverse Primer TaqMan-Sonde („FAM“)	ACATCAGGGAGTAATGGTTGGAAT GGTGCCAGATCTTTTCCATGTC CGATAGAACACGGGCATCATCACCAACTG
<i>Actb</i> (TaqMan)	Forward-Primer Reverse Primer TaqMan-Sonde („FAM“)	TGACAGGATGCAGAAGGAGATTACT GCCACCGATCCACACAGAGT ATCAAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGC
<i>Actb</i> (SYBR)	Forward-Primer Reverse Primer	TGACAGGATGCAGAAGGAGATTACT GCCACCGATCCACACAGAGT
<i>Aqp5</i> (TaqMan)	Forward-Primer Reverse Primer TaqMan-Sonde („FAM“)	TCACTGGGTCTTCTGGGTAGGA CTGGCTCATATGTGCCCTTTGAC TACTTCTACTTGCTTTTCCCCTCCTCGCTG
<i>Arg1</i> (TaqMan)	Forward-Primer Reverse Primer TaqMan-Sonde („FAM“)	ACCCTGACCTATGTGTCATTTGG TGGTACATCTGGGAACCTTTCCTT ATGCTCACACTGACATCAACACTCCCCTG
<i>Ccn2</i> (TaqMan)	Forward-Primer Reverse Primer TaqMan-Sonde („FAM“)	CATTAAGAAGGGCAAAAAGTGCAT TGCAGCCAGAAAGCTCAAAC CGGACACCTAAAATCGCCAAGCCTG
<i>Col1a1</i> (SYBR)	Forward-Primer Reverse Primer	GCAGTGCTGTTGCGATCTTG CAGAGGGACAGAGCACAGCTT
<i>Col3a1</i> (SYBR)	Forward-Primer Reverse Primer	GGTGGTTTTTCAGTTCAGCTATGG TTTTTGAGTGGTATGTAATGTTCTG
<i>Col4a4</i> (TaqMan)	Forward-Primer Reverse Primer TaqMan-Sonde („FAM“)	GAAGGCGCACAAATCAAGATCT CACACTTGGTGGATGTTGCAGTA CTTCTGTGTTTAGCACTCTGCCCTTTGC
<i>Gapdh</i> (TaqMan)	Forward-Primer Reverse Primer TaqMan-Sonde („FAM“)	ATGTGTCCGTCGTGGATCTGA TGCCTGCTTACCACCTTCT CCGCCTGGAGAAACCTGCCAAGTATG
<i>Gapdh</i> (SYBR)	Forward-Primer Reverse Primer	ATGTGTCCGTCGTGGATCTGA TGCCTGCTTACCACCTTCT
<i>Il10</i> (SYBR)	Forward-Primer Reverse Primer	GGCGCTGTCATCGATTTCTC CACCTTGGTCTTGGAGCTTATTTAA

<i>Il1β</i> (TaqMan)	Forward-Primer Reverse Primer TaqMan-Sonde („FAM“)	TGACAGTGATGAGAATGACCTGTTC GGACAGCCCAGGTCAAAGG ACCCCAAAGATGAAGGGCTGCTTCC
<i>Il4</i> (SYBR)	Forward-Primer Reverse Primer	GGAGATGGATGTGCCAAACG GCACCTTGGAAGCCCTACAG
<i>Il6</i> (TaqMan)	Forward-Primer Reverse Primer TaqMan-Sonde („FAM“)	ACAAGTCGGAGGCTTAATTACACAT AATCAGAATTGCCATTGCACAA TCTTTTCTCATTTCACGATTTCCCAGAGAA
<i>Mcp1</i> (TaqMan)	Forward-Primer Reverse Primer TaqMan-Sonde („FAM“)	GGCTCAGCCAGATGCAGTTAAC CTTGGTGACAAAACTACAGCTTCTT CCCCACTCACCTGCTGCTACTCATTCA
<i>Mmp12</i> (TaqMan)	Forward-Primer Reverse Primer TaqMan-Sonde („FAM“)	GCAGCAGTTCTTTGGGCTAGA GTACATCGGGCACTCCACATC CTGGGCAACTGGACAACCTCAACTCTGG
<i>Rna18sn5</i> (SYBR)	Forward-Primer Reverse Primer	AGATCCCAGACTGGTTCCTG TTGTTGTCTAGACCGTTGGC
<i>Rna18sn5</i> (TaqMan)	Forward-Primer Reverse Primer TaqMan-Sonde („FAM“)	AGATCCCAGACTGGTTCCTG TTGTTGTCTAGACCGTTGGC CAGAACCTGGCTGTACTTCCCATCC
<i>Serpine1</i> (TaqMan)	Forward-Primer Reverse Primer TaqMan-Sonde („FAM“)	GCTGGCTATGCTGCAGATGAC TGCCCTTCTCATTGACTTTGAA AAAACCCGGCGGCAGATCCA
<i>Sftpa</i> (SYBR)	Forward-Primer Reverse Primer	TCAAACATCAGATTCTGCAAACAA TGACTGCCCATTTGGTGGAA
<i>Sftpb</i> (SYBR)	Forward-Primer Reverse Primer	CTGCTGGCTTTGCAGAACTCT GAGGACAAGGCCACAGACTAGCT
<i>Sftpc</i> (SYBR)	Forward-Primer Reverse Primer	CCTCGTTGTCGTGGTGATTGTA GCTCATCTCAAGGACCATCTCAGT
<i>Sftpd</i> (SYBR)	Forward-Primer Reverse Primer	CAGCAGATGGAGGCCTTAAAA GGGAACAATGCAGCTTTCTGA
<i>Socs3</i> (TaqMan)	Forward-Primer Reverse Primer TaqMan-Sonde („FAM“)	CCACCCTCCAGCATCTTTGT TCCAGGAACTCCCGAATGG ACTGTCAACGGCCACCTGGACTCCT
<i>Tgfb</i> (TaqMan)	Forward-Primer Reverse Primer TaqMan-Sonde („FAM“)	CTGAACCAAGGAGACGGAATACA CACGTGGAGTTTGTATCTTTGCT CTTTCGATTGAGCGCTCACTGCTCTTG
<i>Tnfa</i> (SYBR)	Forward-Primer Reverse Primer	AGGGATGAGAAGTTCCCAAATG GCTTGTCACTCGAATTTTGAGAAG

Appendix 5: Verwendete Antikörper und Verdünnungen für die Immunoblot-Analysen.

Primärer Antikörper	Verdünnung	Sekundärer Antikörper	Verdünnung
Aquaporin 5 (#A4979-50L; Sigma Aldrich)	1:1000 in 5% BSA in TBST	Anti-rabbit IgG, HRP- linked (#7074; Cell Signaling)	1:1000 in 5% Milch in TBST
Caspase 3 (#9662; Cell Signaling)	1:1000 in 5% Milch in TBST	Anti-rabbit IgG, HRP- linked (#7074; Cell Signaling)	1:2000 in 5% Milch in TBST
CD31 (#DIA-310; Dianova)	1:5000 in 5% BSA in TBST	Anti-rat IgG HRP-linked (#7077; Cell Signaling)	1:5000 in 5% Milch in TBST
CTGF (#PA5-32193; Thermo Fisher Scientific)	1:2000 in 5% BSA in TBST	Anti-rabbit IgG, HRP- linked (#7074; Cell Signaling)	1:2000 in 5% Milch in TBST

MMP-12 (#ab66157; Abcam)	1:1000 in 5% BSA in TBST	Anti-rabbit IgG, HRP-linked (#7074; Cell Signaling)	1:1000 in 5% Milch in TBST
PAI-1 (#11907; Cell Signaling)	1:1000 in 5% Milch in TBST	Anti-rabbit IgG, HRP-linked (#7074; Cell Signaling)	1:2000 in 5% Milch in TBST
PCNA (#M0879; Dako)	1:10000 in 5% Milch in TBST	Anti-mouse IgG, HRP-linked (#7076; Cell Signaling)	1:20000 in 5% Milch in TBST
proSFTPC (#AB3789; Merck Millipore)	1:2000 in 5% BSA in TBST	Anti-rabbit IgG, HRP-linked (#7074; Cell Signaling)	1:3000 in 5% Milch in TBST
pSmad1/Smad5/Smad9 (#13820; Cell Signaling)	1:1000 in 5% BSA in TBST	Anti-rabbit IgG, HRP-linked (#7074; Cell Signaling)	1:1000 in 5% Milch in TBST
pSmad2 (#3108; Cell Signaling)	1:1000 in 5% BSA in TBST	Anti-rabbit IgG, HRP-linked (#7074; Cell Signaling)	1:1000 in 5% Milch in TBST
pStat3 (#9145; Cell Signaling)	1:1000 in 5% BSA in TBST	Anti-rabbit IgG, HRP-linked (#7074; Cell Signaling)	1:1000 in 5% Milch in TBST
SMA (sc-53142; Santa Cruz Biotechnology, Inc.)	1:200 in 5% Milch in TBST	Anti-mouse IgG, HRP-linked (#7076; Cell Signaling)	1:2000 in 5% Milch in TBST
Smad1 (#9743; Cell Signaling)	1:1000 in 5% BSA in TBST	Anti-rabbit IgG, HRP-linked (#7074; Cell Signaling)	1:2000 in 5% Milch in TBST
Smad2/3 (#3102; Cell Signaling)	1:1000 in 5% BSA in TBST	Anti-rabbit IgG, HRP-linked (#7074; Cell Signaling)	1:2000 in 5% Milch in TBST
Stat3 (#9139; Cell Signaling)	1:3000 in 5% Milch in TBST	Anti-mouse IgG, HRP-linked (#7076; Cell Signaling)	1:2000 in 5% Milch in TBST
TGF- β (#3709; Cell Signaling)	1:500 in 5% BSA in TBST	Anti-rabbit IgG, HRP-linked (#7074; Cell Signaling)	1:1000 in 5% Milch in TBST
VE-Cadherin (#ab33168; Abcam)	1:1000 in 5% Milch in TBST	Anti-rabbit IgG, HRP-linked (#7074; Cell Signaling)	1:2000 in 5% Milch in TBST
β -Actin (#3700; Cell Signaling)	1:20000 in 5% Milch in TBST	Anti-mouse IgG, HRP-linked (#7076; Cell Signaling)	1:10000 in 5% Milch in TBST

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phasen der Lungenentwicklung.....	16
Abbildung 2: Definition und Schweregrade der bronchopulmonalen Dysplasie	19
Abbildung 3: Zusammenhang zwischen Gestationsalter und Inzidenz der bronchopulmonalen Dysplasie	20
Abbildung 4: Zusammenfassung von Ätiologie und Pathophysiologie der bronchopulmonalen Dysplasie	26
Abbildung 5: Hypothese zur funktionellen Rolle von CXCL10.....	35
Abbildung 6: Schematische Darstellung des interventionellen Tiermodells zur Überprüfung der Forschungsfragen	36
Abbildung 7: Detaillierte Übersicht über das experimentelle Setup der Tierstudie.....	45
Abbildung 8: Beispielhafte Bestimmung von MLI und RAC.....	49
Abbildung 9: Verbesserte Alveolarisierung unter Hyperoxie bei CXCL10-Defizienz.....	63
Abbildung 10: CXCL10-Defizienz schützt vor Apoptose unter Hyperoxie	65
Abbildung 11: Gesteigerte Zellproliferation bei Hyperoxie-Exposition.....	66
Abbildung 12: CXCL10 beeinflusst die mRNA-Expression alveolarepithelialer Marker in der Lunge	67
Abbildung 13: CXCL10-Defizienz verändert Expression von pro-Surfactant-Protein-C unter Hyperoxie	68
Abbildung 14: Erhöhte pulmonale Gefäßanzahl unter Hyperoxie bei CXCL10-Defizienz.....	69
Abbildung 15: CXCL10-Defizienz aggraviert Verlust von Endothelmarkern unter Hyperoxie	70
Abbildung 16: Schutz vor Hyperoxie-induzierter Fibrose bei CXCL10-Defizienz.....	71
Abbildung 17: Verlust elastischer Fasern bei Hyperoxie-Exposition	72
Abbildung 18: Hyperoxie fördert Expansion von Myofibroblasten in der Lunge.....	73
Abbildung 19: Kollagenexpression in der murinen Lunge	74
Abbildung 20: Aktivierung des TGF- β -Signalwegs unter Hyperoxie	75
Abbildung 21: Erhöhte pulmonale Protease-Aktivität unter Hyperoxie bei CXCL10-Defizienz ..	76
Abbildung 22: CXCL10-Defizienz blockt pulmonale Makrophageninvasion unter Hyperoxie	78
Abbildung 23: Hyperoxie fördert M1-ähnliche Makrophagenpolarisierung.....	79
Abbildung 24: Alveoläres Aufholwachstum nach beendeter Hyperoxie-Exposition	81
Abbildung 25: Verlust der Alveolarepithelmarker in der Regenerationsphase bei CXCL10-Defizienz	82
Abbildung 26: CXCL10 – Ein biphasischer Mechanismus	84

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gradierung von Frühgeburtlichkeit anhand des Gestationsalters und des Geburtsgewichts.....	13
Tabelle 2: Inkubationsprogramm des Gewebeeinfiltrationsautomaten zur Dehydrierung und Paraffinierung der in PFA fixierten Lungen	46
Tabelle 3: Protokoll zur Synthese von cDNA.....	55
Tabelle 4: RT-PCR Proben-Zusammensetzung	56

Tabelle 5: Voreinstellungen 7500 Real time PCR System.....	56
Tabelle 6: RT-PCR Thermocycler-Programm.....	57

7.3 Formeln

Formel 1: Oberfläche einer Kugel	50
Formel 2: $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode zur Berechnung des relativen Unterschieds in der mRNA-Expression	58