

Aus dem Helmholtz Zentrum München
Institut für Lungenbiologie/Comprehensive Pneumology Center
Vorstand: Dr. Antje Brand

Die Rolle des Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha (PDGF- $R\alpha$) in der Genese pathologischer Veränderungen durch die mechanische Beatmung der neugeborenen Lunge

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Isabella Thiel
aus
Düsseldorf

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatterin: Priv. Doz. Dr. med. Anne Hilgendorff

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Orsolya Genzel – Boroviczény
Prof. Dr. Markus Ege

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Dr. Tina Pritzke (Gimm)

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 28.06.2018

Zusammenfassung

Die Bronchopulmonale Dysplasie (BPD) ist die häufigste Form der chronischen Lungenerkrankung des Frühgeborenen und aufgrund ihrer Langzeitfolgen von großer klinischer Relevanz. Die Inzidenz ist trotz der verbesserten Intensivbehandlung von Frühgeborenen nicht zurückgegangen. Die mechanische Beatmung mit sauerstoffreichem Gas (MV-O₂) gilt als Hauptrisikofaktor der BPD. Die wesentlichen histologischen Merkmale der BPD sind die Störung der Alveolo- und Vaskulogenese. Vorangegangene Studien schreiben der Dysregulation von Wachstumsfaktoren wie des Platelet Derived Growth Factor A (PDGF-A) und dessen korrespondierenden Rezeptors PDGF-R α eine Rolle in der Pathophysiologie der BPD zu. Ein kausaler Zusammenhang zwischen einer reduzierten PDGF-R α Signaltransduktion und einer Störung der alveolären Septierung im Rahmen der BPD konnte bisher jedoch nicht schlüssig gezeigt werden. Unsere Studie untersuchte daher die Rolle der reduzierten PDGF-R α Expression als ursächlichen Treiber der Entwicklung BPD-charakteristischer Veränderungen am Modell der neugeborenen Maus in einem etablierten präklinischen, experimentellen Modell der Erkrankung. Hierzu wurden neonatale PDGF-R $\alpha^{+/+}$ und transgene PDGF-R $\alpha^{+/-}$ Mäuse für 8 Stunden (h) mit Sauerstoff (inspiratorische Sauerstofffraktion (FiO₂) 0,4) behandelt oder einer mechanischen Beatmung mit 40% Sauerstoff unterzogen. Die histologische Beurteilung umfasste die Quantifizierung der Alveolengröße und -zahl, sowie Septen- und Mikrogefäßzahl sowie die qualitative und quantitative Erfassung der Elastinfasern und des Vorläuferproteins Tropoelastin. Die Beurteilung der Wachstumsfaktorexpression fokussierte sich auf die PDGF-A und Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A) Signaltransduktion. Darüber hinaus wurden ergänzende Untersuchungen zur Apoptoserate und Inflammation unter MV-O₂ vorgenommen. Unsere Studie zeigte, dass die charakteristischen histopathologischen Merkmale der BPD wie die Störung der Alveolo- und Vaskulogenese unter dem Einfluss einer postnatalen Schädigung durch MV-O₂ durch eine PDGF-R α Haploinsuffizienz induziert werden können. Die Lungen von beatmeten PDGF-R $\alpha^{+/-}$ Mäusen zeigten im Vergleich zu Wildtyp (WT) Mäusen eine reduzierte Zahl und veränderte Lokalisation der PDGF-R α positiven Zellen, eine veränderte Elastinfaseranordnung, eine signifikant geringere Zahl simplifizierter Alveolen oder

ihrer Vorstufen und eine signifikant erhöhte Apoptoserate von Endothelzellen, die mit einer signifikant reduzierten Mikrogefäßzahl und reduzierten pulmonalen Expression des endothelialen Wachstumsfaktors VEGF-A und seines Rezeptors Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (VEGF-R2) in den heterozygoten Tieren assoziiert war. Die Ergebnisse indizieren, dass die Produktion von VEGF-A PDGF-abhängig gesteuert wird und PDGF-R α positive Myofibroblasten (MFB) neben ihrer Rolle im Prozess der sekundären Septierung eine Rolle für die Gefäßentwicklung spielen. Auf experimenteller Ebene werden weitere *in vivo* und *in vitro* Studien die zentrale Rolle der PDGF-R α abhängigen Signaltransduktion und die Rolle des MFB in der Pathogenese der neonatalen chronischen Lungenerkrankung klären und die Interaktion weiterer Signalwege aufdecken.

Um einen Behandlungsansatz für die neonatale Lunge abzuleiten, könnte in Folgestudien untersucht werden, ob die Optimierung der PDGF-R α Signaltransduktion durch die Behandlung neonataler PDGF-R α ^{+/-} Mäuse mit dem Liganden PDGF-A die schädigende Wirkung der MV-O₂ auf die Alveolo- und Vaskulogenese reduziert.

Danksagung

An erster Stelle gilt mein besonderer Dank meiner Betreuerin PD Dr. med. Anne Hilgendorff für ihre unermüdliche Unterstützung und ihr großes persönliches Engagement während der gesamten Bearbeitungsphase meiner Dissertation. Ihre wissenschaftliche Präzision und glasklare Logik haben mich immer wieder in hohem Maße beeindruckt, motiviert und vorangebracht.

Außerdem möchte ich mich sehr bei Markus Koschlig für seine große Unterstützung während der Laborarbeiten bedanken. Ich konnte mich immer auf ihn verlassen und denke gern an diese Zeit, die mit viel Arbeit aber auch viel Spaß verbunden war, zurück. Auch gilt ein großer Dank Dr. Tina Pritzke und Dr. Prajakta Oak für zahlreiche zielführende Ratschläge und die unterstützende Zusammenarbeit im Labor.

Ich möchte diese Arbeit meinem Mann Jan Thiel und meinen Eltern Rafaela und Dr. Wolfgang Thiel widmen, die mir während der gesamten Zeit geduldig zugehört und einen enorm starken Rückhalt gegeben haben.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 | Einleitung und Hintergrund | 8 |
| 1.1 | Definition der BPD | 9 |
| 1.2 | Pathophysiologie | 10 |
| 1.2.1 | Risikofaktoren | 10 |
| 1.2.2 | Klinische und histopathologische Charakteristika | 11 |
| 1.3 | Pathomechanismen | 12 |
| 1.4 | Zielsetzung und methodische Umsetzung | 16 |
| 2 | Materialien und Methoden | 18 |
| 2.1 | Materialliste (siehe Anhang) | 18 |
| 2.2 | Tiermodell | 18 |
| 2.2.1 | Transgene Mäuse | 18 |
| 2.2.2 | Zucht | 19 |
| 2.2.3 | Beatmungsexperiment | 20 |
| 2.3 | Histologie | 25 |
| 2.3.1 | Fixierung, Entwässerung und Einbettung der Lungen | 25 |
| 2.3.2 | Orientator | 26 |
| 2.3.3 | Schneiderverfahren | 27 |
| 2.3.4 | Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung | 27 |
| 2.3.5 | Elastin Färbung nach HART | 27 |
| 2.3.6 | Immunhistochemie | 28 |
| 2.3.7 | Immunfluoreszenzfärbung | 29 |
| 2.3.8 | Histologische Analyse der Gewebeschnitte | 31 |
| 2.4 | Proteinanalyse | 33 |
| 2.4.1 | Proteinextraktion | 33 |
| 2.4.2 | Messung der Proteinkonzentration | 33 |
| 2.4.3 | Immunoblot | 34 |
| 2.5 | Analysen der mRNA Expression | 36 |
| 2.5.1 | RNA-Extraktion | 36 |
| 2.5.2 | Komplementäre DNA (cDNA) Synthese | 37 |
| 2.5.3 | Quantitative Real Time Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 38 |
| 2.6 | Statistische Analyse | 39 |
| 3 | Ergebnisse | 40 |
| 3.1 | Qualitätssicherung | 40 |
| 3.2 | Schädigung der Alveolenstruktur in den Lungen von neonatalen PDGF-R $\alpha^{+/-}$ Mäusen unter dem Einfluss der MV-O ₂ | 41 |

| | | |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.3 | Veränderte Anordnung der pulmonalen Elastinfasern in den Lungen von beatmeten neonatalen PDGF-R α ^{+/-} Mäusen..... | 42 |
| 3.4 | Veränderte Verteilung und reduzierte Zahl PDGF-R α positiver Zellen in den Lungen von PDGF-R α ^{+/-} Mäusen..... | 45 |
| 3.5 | Erhöhte Apoptose in den Lungen von beatmeten neonatalen PDGF-R α ^{+/-} Mäusen..... | 47 |
| 3.6 | Erhöhte Apoptoserate endothelialer Zellen und reduzierte Mikrogefäßzahl in den Lungen von beatmeten neonatalen PDGF-R α ^{+/-} Mäusen..... | 48 |
| 3.7 | Unveränderte Zahl inflammatorischer Zellen in den Lungen von beatmeten WT und PDGF-R α ^{+/-} Mäusen | 52 |
| 4 | Diskussion | 54 |
| 5 | Anhang..... | 63 |
| 5.1 | Chemikalien..... | 63 |
| 5.2 | Lösungen und Puffer | 65 |
| 5.3 | Geräte..... | 66 |
| 5.4 | Primersequenzen..... | 68 |
| 5.5 | Antikörper | 68 |
| 6 | Abkürzungsverzeichnis | 72 |
| 7 | Abbildungsverzeichnis..... | 76 |
| 8 | Literaturverzeichnis | 77 |

1 Einleitung und Hintergrund

Durch die verbesserte Intensivbehandlung von Frühgeborenen, die optimierte Strategien für Beatmung und Sauerstofftherapie, die Einführung der Surfactanttherapie Ende der 1980er Jahre sowie die als internationaler Standard definierte antenatale Steroidgabe bis zu einem Gestationsalter (GA) von 34 Wochen einschließen, konnten die Mortalitätsraten insbesondere sehr unreifer Frühgeborener deutlich gesenkt werden. Ihre steigende Überlebensrate führt jedoch bedingt durch die strukturelle und funktionelle Unreife der Organe sowie den Einfluss notwendiger (intensiv)medizinischer Maßnahmen zu einer Zunahme der Rate von Langzeitkomplikationen.

So entwickeln bis zu 30 Prozent (%) der Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht (GG) unter 1500 Gramm (g) aufgrund akuter Atemstörungen und einer Unreife des Atemzentrums, die die Anwendung invasiver und nicht-invasiver Beatmungsstrategien sowie eine Sauerstofftherapie nötig machen, eine chronische Lungenerkrankung, die sogenannte Bronchopulmonale Dysplasie (1). Die BPD betrifft in erster Linie Frühgeborene mit extremer Unreife, d. h. mit einem GA unter 28 Schwangerschaftswochen (SSW) und einem GG unter 1000 g (2). Sie ist die häufigste Form der chronischen Lungenerkrankung im Säuglingsalter (3) und ist neben einer erhöhten Inzidenz von Infektionen und der Notwendigkeit von Re-Hospitalisationen in den ersten Lebensjahren ebenso ein unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung neurologischer Langzeitkomplikationen (4, 5). Obwohl die Erkrankungsrate der schweren BPD zwischen 1994 und 2002 gesunken ist (6), ist die allgemeine Inzidenz der BPD im postmenstruellen Alter (PMA) von 36 Wochen durch das zunehmende Überleben der extrem kleinen Frühgeborenen nicht signifikant zurückgegangen (1). Die Inzidenz unterscheidet sich zwischen den behandelnden Kliniken in Abhängigkeit von unterschiedlichen Patientenpopulationen und Behandlungsstrategien und schwankt zwischen mehr als 80 % bei Frühgeborenen mit einem GA von 24 SSW und weniger als 5 % bei Neugeborenen mit einem GA über 32 SSW (7-9). Neueste europäische Studien zeigen, dass bis zu 25 % der Frühgeborenen mit einem GA unter 32 SSW betroffen sind (8).

Zum besseren Verständnis pathophysiologisch relevanter Prozesse sowie der Identifikation möglicher therapeutischer Ansätze im Rahmen der Entwicklung einer BPD leisten experimentelle Modelle einen wichtigen Beitrag. Die vorliegende Arbeit untersucht unter Verwendung eines aufwendigen und klinisch relevanten Mausmodells die Rolle des PDGF- α im Kontext der Entstehung der BPD und leitet daraus einen möglichen Behandlungsansatz ab.

1.1 Definition der BPD

In der Erstbeschreibung nach Northway et al. aus dem Jahre 1967 wurde die klassische BPD als Lungenschädigung in der Folge eines schweren Atemnotsyndroms (ANS) in einer Gruppe moderater Frühgeborener beschrieben, die eine längerfristige invasive Beatmung mit hohen Sauerstoffkonzentrationen erhalten hatten (10). Im Jahre 1979 definierte der BPD Workshop des National Institute of Child Health and Human Development (NICHD), des National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI) und des Office of Rare Diseases (ORD) die BPD in der Folge als den Bedarf an einer kontinuierlichen supplementären Sauerstofftherapie in den ersten 28 Tagen und der Präsenz typischer radiologischer Veränderungen (11).

Das Krankheitsbild der „neuen“ BPD ist von der klassischen BPD in der Präsurfactant-Ära bei moderat Frühgeborenen mit schwerem ANS als Folge aggressiver Sauerstoff- und Beatmungsmaßnahmen abzugrenzen, da es von Frühgeborenen mit deutlich geringerem GA und GG, unter Zufuhr von Surfactant, pränataler Lungenreifeinduktion, geringeren Sauerstoffkonzentrationen und oft kürzerer und weniger invasiver Beatmung (12, 13) entwickelt wird. Aktuell wird von der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin die auf der National Institute of Health (NIH) Konsensus Konferenz (2000) formulierte Definition und genauere Einteilung der BPD in Schweregrade empfohlen. Diese Definition fußt auf dem Sauerstoff- und dem invasiven und nicht-invasiven Beatmungsbedarf eines Frühgeborenen mit einem GA unter 32 SSW im PMA von 36 Wochen oder eines Neugeborenen mit einem GA über 32 SSW zum Zeitpunkt der Entlassung oder spätestens am 56. Lebenstag. Man unterscheidet zwischen den folgenden Formen einer BPD: Mild (Sauerstoffbedarf für ≥ 28 Tage, kein erhöhter Sauerstoffbedarf im PMA von 36 Wochen oder bei Entlassung), moderat (Sauerstoffbedarf für ≥ 28 Tage und < 30 % Sauerstoffbedarf im PMA von 36 Wochen oder bei Entlassung) und schwer (Sauerstoffbedarf für ≥ 28 Tage und ≥ 30 % Sauerstoffbedarf und/oder *Continuous Positive Airway Pressure* (CPAP)/Beatmung im PMA von 36 Wochen oder bei Entlassung) (14).

Ehrenkranz et al. konnten zeigen, dass die Einteilung der BPD in Schweregrade als Teil der aktuellen Definition eine gezieltere Prognoseeinschätzung über die Langzeitfolgen der BPD im Vergleich zu vorangegangenen Definitionen erlaubt. So steigt mit dem Schweregrad der BPD bei Frühgeborenen die Inzidenz der neurologischen Langzeitkomplikationen, der Re-Hospitalisationen und des Einsatzes respiratorischer Medikamente (14-16).

1.2 Pathophysiologie

1.2.1 Risikofaktoren

Frühgeborene mit extremer Unreife, das heißt mit einem GA unter 28 SSW und einem GG unter 1000 g, zeigen durch die strukturelle und funktionelle Unreife ihrer Lunge auf dem Boden eines primären Surfactantmangels und einer reduzierten pulmonalen Gasaustauschoberfläche direkt nach der Geburt ein akutes ANS. Radiologisch wird das ANS in 4 charakteristische Grade nach Couchard eingeteilt, die sich an der verminderten Strahlentransparenz der Lunge mit bilateralem retikulogranulären Muster und einem positiven Aerobronchogramm orientieren (17). Klinisch zeichnet sich das ANS durch einen Sauerstoffbedarf in Kombination mit dem Vorliegen einer Tachydyspnoe mit interkostalen Einziehungen, Nasenflügeln und Zyanose aus (18). Die Akuttherapie des ANS umfasst zur Sicherung eines adäquaten Gasaustauschs die exogene Surfactantzufuhr, den respiratorischen Support mit invasiven und nicht-invasiven Beatmungsstrategien sowie die Sauerstoffsupplementation. Der Einsatz der MV-O₂ ist trotz optimierter Beatmungsstrategien wie der Förderung nicht-invasiver Beatmungsformen mit dem Ziel der Reduktion des Baro- und Volutraumas, der breiten Anwendung der pränatalen Steroidprophylaxe zur Lungenreifeinduktion, der exogenen Surfactantsubstitution oder der Einführung der Hochfrequenzoszillation (19) unverändert ein Hauptrisikofaktor für die Entstehung der BPD (20). Auch Kinder ohne vorangegangenes ANS haben nach initialem Sauerstoffbedarf und/oder Atemunterstützung ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer BPD (21). Der Zusammenhang zwischen der schädigenden Wirkung der kontinuierlichen MV-O₂ durch die Induktion von Baro-, Volutrauma und oxidativem Stress und den pathologischen BPD-charakteristischen Veränderungen der unreifen Lunge ist vielfältig am Tiermodell nachgewiesen (22-28). Das Vermeiden der invasiven Beatmung reduziert die Inzidenz der BPD signifikant bei Frühgeborenen mit einem GA unter 30 SSW (29). Neben dem Hauptrisikofaktor MV-O₂ gilt ein prädisponierender genetischer Einfluss als unabhängiger Risikofaktor der BPD (30, 31). Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss einer genetisch veränderten pathophysiologisch wesentlichen Signalkaskade auf die Entwicklung BPD-charakteristischer Veränderungen in der neonatalen Lunge unter dem Einfluss der MV-O₂.

Für die Entstehung der BPD sind darüber hinaus die folgenden weiteren Risikofaktoren relevant:

Eine intrauterine Wachstumsretardierung erhöht durch den Einfluss auf die Lungenentwicklung das Risiko für die Entwicklung einer BPD um das 3-4-fache (32, 33).

Weitere Risikofaktoren sind eine exzessive Flüssigkeits- und Salzzufuhr (34), ein persistierender Ductus Arteriosus (PDA) mit der Gefahr der Entwicklung eines Lungenödems (35) und eine Atemwegskolonisierung mit *Ureaplasma urealyticum* (36, 37). Außerdem spielen eine mangelhafte Ernährung (38), ein Vitamin-A-Mangel (39) und eine insuffiziente Nebennieren- und Schilddrüsenhormonproduktion (40) in der Entstehung der BPD eine Rolle. Das durch Ureaplasmen oder andere Erreger verursachte Amnioninfektionssyndrom (AIS) mit dem histologischen Bild einer Chorioamnionitis wird als pränataler Risikofaktor für die Entwicklung einer BPD kontrovers diskutiert (41-43). Entscheidend für die Auswirkung des AIS auf die unreife Lunge ist der Schweregrad der Infektion. Eine schwere Inflammation trägt bei unreifen Frühgeborenen sekundär durch Surfactantinaktivierung zur Entstehung eines schweren ANS bei, durch den Einfluss supportiver Maßnahmen wie MV-O₂ steigt in Folge das Risiko für die Entwicklung einer BPD. Eine geringgradige Inflammation kann in-utero jedoch durch ein mögliches Zusammenspiel mit der pränatalen Gabe von Kortison die Reifung des Surfactantsystems fördern und sich protektiv auf die Entwicklung eines moderaten bis schweren ANS auswirken (44, 45). Postnatal sind konnatale und sekundäre (nosokomiale) systemische oder pulmonale Infektionen wichtige Risikofaktoren für die Entstehung einer BPD (46). Eine Inflammationsreaktion wird neben einer prä- oder postnatalen pulmonalen oder systemischen Infektion mit ANS auch durch einen beatmungsassoziierten Lungenschaden durch Volu- und Barotrauma sowie oxidativen Stress ausgelöst (47).

1.2.2 Klinische und histopathologische Charakteristika

Klinisch zeigen die Patienten mit einer BPD in der Mehrzahl postnatal eine milde Atemnotsymptomatik und entwickeln in der Folge eine zunehmende Abhängigkeit von Sauerstoff und Beatmung (48). Der Grund liegt in den charakteristischen histopathologischen Veränderungen. Frühgeborene mit BPD weisen eine histologisch nachweisbare Verzögerung der Alveologenese und der distalen Gefäßentwicklung auf, die sich in Form vereinfachter distaler Lungenazini, einer verminderten Anzahl vergrößerter Alveolen und sekundärer Septen (49) sowie eines verminderten Wachstums kleiner Gefäße (50) darstellt. Es zeigen sich wenig schwere Gefäß- und Atemwegsepithelläsionen, eine variable Hyperplasie glatter Muskelzellen, eine interstitielle Fibrose, eine veränderte Elastinablage in den Alveolarwänden sowie die Entwicklung eines pulmonalen Ödems (51). Die unzureichend fortgeschrittene Alveolarisierung und Vaskularisierung sowie das strukturelle Remodelling führt bei der schweren BPD zu einer Störung des Gasaustauschs mit insuffizienter Oxygenierung und zur

Entwicklung eines pulmonalen Hypertonus mit der Folge einer Rechtsherzbelastung, die zur Mortalität und Morbidität der betroffenen Frühgeborenen beiträgt (52). Die Folgen der BPD mit einer leicht, mittelgradig oder schwer eingeschränkten Lungenfunktion und einem erhöhten Risiko für Atemwegserkrankungen (53) führen zu einer erhöhten Rate von Re-Hospitalisierungen (54). Bis zu 70 % der Kinder mit BPD werden mindestens einmal und 30 % mindestens dreimal in den ersten zwei Lebensjahren re-hospitalisiert (55). Neben dem pulmonalen Outcome sind die neurologischen Langzeitfolgen der BPD von großer klinischer und sozioökonomischer Bedeutung. So zeigen ca. 40 % der sehr kleinen Frühgeborenen mit BPD eine verzögerte neurokognitive Entwicklung (56).

1.3 Pathomechanismen

Die MV-O₂ beeinflusst im Kontext weiterer, oben genannter Risikofaktoren die Lungenentwicklung Frühgeborener in einer vulnerablen Phase während des Übergangs zwischen später kanalikulärer und sakkulärer Phase, die zwischen der 24. und 28. SSW durchlaufen wird (52). Physiologisch bildet das Parenchym in diesem Zeitraum in den Sacculi alveolares die primären Septen, aus denen durch die Bildung der sekundären Septen die definitiven Alveolen hervorgehen (57, 58). Im Bereich der sekundären Septen fusioniert die doppelläufige Gefäßschicht während der Formation der Alveolen zu einer singulären Schicht (59). Eine wichtige Rolle in diesem Prozess der Alveologenese spielen die Myofibroblasten (MFB). MFB sind Zellen mesenchymalen Ursprungs, die, eingebettet in Elastinfasern, am Prozess der sekundären Septierung teilnehmen. Kapanci et al haben postuliert, dass sie die alveolären Ringmuskeln an der Öffnungsstelle zwischen Alveolus und Ductus alveolaris aufbauen (60). Entscheidend für die Funktion der MFB, das heißt die distale Migration und Proliferation sowie die Produktion von Elastin im Bereich der sekundären Septen, ist die Signaltransduktion durch den Oberflächenrezeptor PDGF-R α (61). Der Ligand des Rezeptors, PDGF-A, wird von alveolären Epithelzellen produziert (62). Abbildung (Abb.) 1 stellt den Prozess der primären und sekundären Septierung schematisch dar, während Abb. 2 die Funktionen des MFB im Rahmen der Alveologenese zusammenfasst.

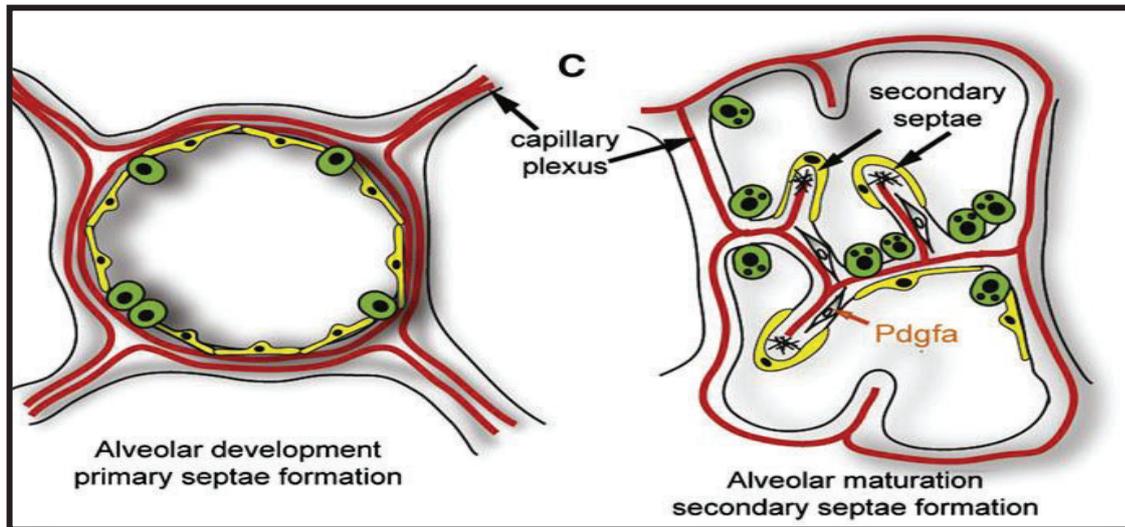


Abb. 1: Ausbildung der primären und sekundären Septen (63).

In der linken Grafik ist ein Sakkulus dargestellt, der von alveolären Epithelzellen (gelb = Pneumozyten Typ I und grün = Pneumozyten Typ II) ausgekleidet wird. Die Pneumozyten Typ I sind dünnwandige, nicht mehr teilungsfähige Zellen, die etwa 95% der Alveolaroberfläche bilden (64). Sie spielen eine wichtige Rolle für den Gasaustausch. Die Pneumozyten Typ II sind essenziell für die Produktion des Surfactants. Die Septen (primären Septen) zwischen den Sakkuli enthalten eine doppelte Gefäßschicht (rote Strukturen). Die Blut-Luft-Schranke besteht neben den Pneumozyten Typ I aus der darunter liegenden Basalmembran und dem Kapillarendothel (64). In der rechten Grafik gehen aus den primären Septen die sekundären Septen hervor. Im Bereich der sekundären Septen findet die Produktion des Elastins (schwarze Strukturen) durch die MFB (spindelförmige weiße Zellen) statt. MFB exprimieren den Oberflächenrezeptor PDGF-R α , dessen Ligand PDGF-A von den alveolären Epithelzellen produziert wird. Die sekundären Septen enthalten nur noch eine singuläre Gefäßschicht (rote Strukturen).

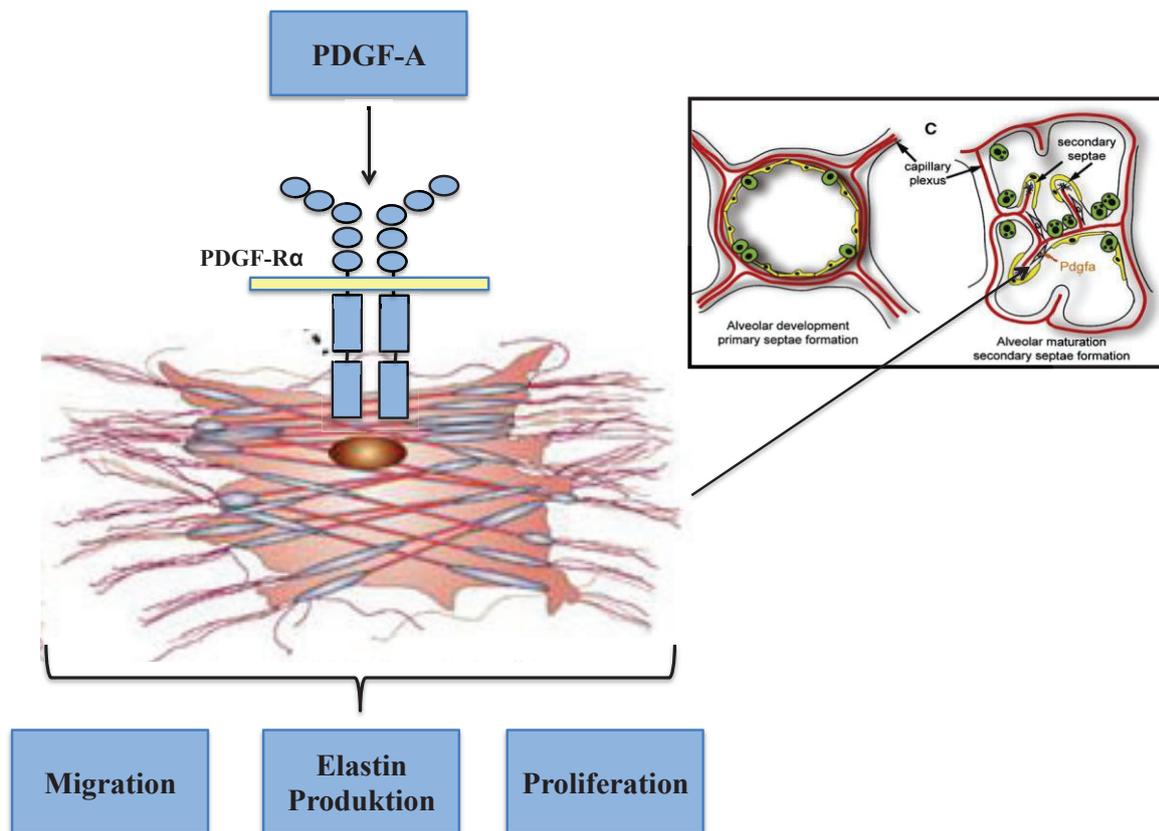


Abb. 2: Wirkung der PDGF-R α /PDGF-A Signaltransduktion auf den MFB.

Der MFB exprimiert den Rezeptor PDGF-R α an seiner Oberfläche. Die wichtigen Funktionen des MFB im Rahmen der Alveologenese sind die Migration, Elastin Produktion und Proliferation an den Spitzen der sekundären Septen (61, 65).

Im Krankheitsbild der BPD werden die charakteristische Verzögerung der Alveologenese und Vaskulogenese mit einer gesteigerten Apoptoserate und Inflammationsreaktion assoziiert. Dabei gilt die Dysregulation von zentralen Wachstumsfaktoren als entscheidend für verschiedene pathogenetische Veränderungen im Rahmen der BPD. Dazu zählen neben dem PDGF-A der VEGF und der Transforming Growth Factor Beta (TGF- β) (66). VEGF gilt als Überlebensfaktor für Endothelzellen (67) und Mediator der Gefäßentwicklung. TGF- β spielt eine entscheidende Rolle für Apoptose- und Inflammationsreaktionen (68, 69).

Die wichtige Rolle des PDGF-R α /PDGF-A Signalwegs im Prozess der Alveologenese sowie in der Regulation der pränatalen Lungenentwicklung wurde durch die Studien von Bostrom et al. (1996), Soriano et al. (1997) und Sun et al. (2000) an transgenen Mäusen etabliert (70). Mäuse mit einer homozygoten Deletion des PDGF-A starben in diesen Studien in der Mehrzahl unmittelbar postnatal im Rahmen eines respiratorischen Versagens, das sich auf dem Boden eines generalisierten Lungenemphysems entwickelt hatte. Die Entwicklung der

primär angelegten terminalen Sakkuli schritt in diesen Tieren postnatal nicht weiter fort, so dass die Entwicklung funktionsfähiger Alveolen ausblieb (62, 71) (Abb. 3).

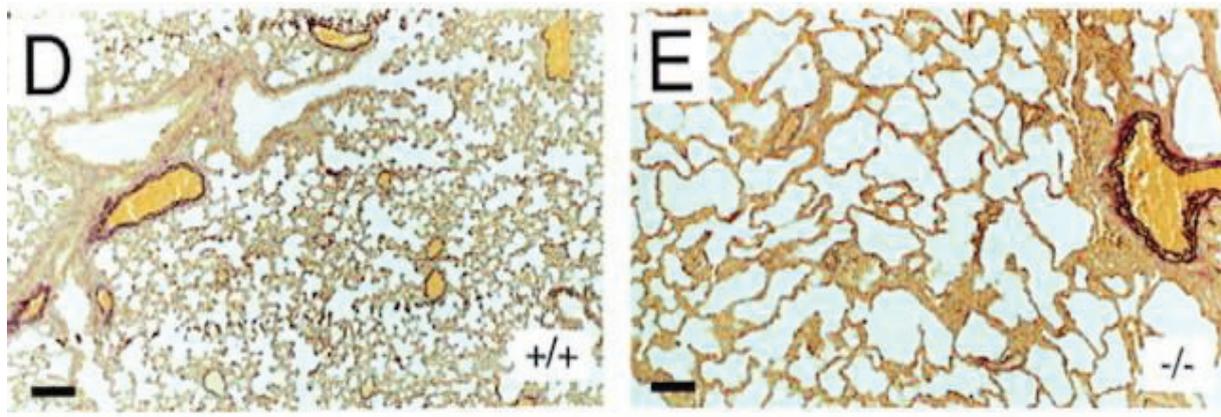


Abb. 3: Vergleich eines histologischen Lungenausschnittes einer WT (+/+) Maus und einer Maus mit homozygoter Deletion des PDGF-A (-/-) im Alter von 3 Wochen.

D = Wildtyp (+/+) Maus, E = Maus mit homozygoter Deletion des PDGF-A (-/-). Der Lungenschnitt der WT Maus (D) zeigt eine regelrechte Lungenstruktur mit ausgebildeten Alveolen. Der Lungenschnitt der Maus mit homozygoter Deletion des PDGF-A (E) zeigt das Bild eines generalisierten Lungenemphysems (62).

Die homozygote Deletion des Rezeptors (PDGF-R α) führte in der Maus pränatal um den embryonalen Tag (E) 16 zum Tod (72). Die Verwendung künstlicher Hefechromosomen konnte in den transgenen Mäusen mit einer homozygoten Deletion des PDGF-R α die Entwicklung schwerwiegender kraniofazialer Anomalien sowie Fehlbildungen des Neuralrohrs verhindern und ermöglichte so ein verlängertes Überleben der Tiere. In der Folge erlaubte dies die Untersuchung des Lungenphänotyps nach Vollendung der Lungenentwicklung. In diesen Tieren zeigte sich eine verzögerte Lungenentwicklung und eine erheblich reduzierte Zahl der PDGF-R α positiven MFB in der Lungenperipherie (70). Darüber hinaus konnten in Tiermodellen der neonatalen chronischen Lungenerkrankung in 4-6 Tage alten Mäusen nach 24-stündiger Beatmung mit 40 % Sauerstoff die Assoziation von BPD typischen histologischen Veränderungen mit einer reduzierten Expression des PDGF-A Proteins nachgewiesen werden. Die in Trachealsekreten von Frühgeborenen mit BPD isolierten mesenchymalen Zellen zeigten eine reduzierte PDGF-R α Expression (73).

Der Wachstumsfaktor VEGF ist entscheidend für die Gefäßentwicklung in der Lunge und fördert das Gefäßremodelling und Endothelzellüberleben (74). Die Haploinsuffizienz für VEGF (VEGF^(+/-)) führt in der Maus pränatal zu einer Störung der Gefäßformation und zum Zeitpunkt der mittleren Gestationsperiode zum Tod (75). In der neonatalen Maus entwickelt sich auf dem Boden eines Mangels an VEGF ein schweres ANS, welches durch die

intrauterine oder postnatale intratracheale Gabe von VEGF über die Stimulation der Surfactantbildung vermieden werden kann (76). In Trachealsekreten von Frühgeborenen mit BPD ließ sich eine reduzierte Expression von VEGF-A und VEGF-R2 nachweisen (77-79). Im tierexperimentellen Modell der BPD wurden bei 4-6 Tage alten Mäusen nach 24-stündiger Beatmung mit 40 % Sauerstoff BPD typische histologische Veränderungen mit einer reduzierten Expression des VEGF-A und seines Rezeptors VEGF-R2 assoziiert (24, 28). In diesen Tieren wurde auch eine 4-fache Erhöhung des pSmad2 Proteins als Marker der verstärkten Aktivierung des TGF- β nachgewiesen. TGF- β wird vor allem von Entzündungszellen wie Makrophagen (80) oder der Lungenmatrix (81) selbst produziert und wurde in Lungenerkrankungen mit einer erhöhten Apoptoserate (82, 83) und Inflammationsreaktionen (68) assoziiert. Inflammationsreaktionen werden im Kontext der Entwicklung einer BPD als Ursache für die Dysregulation bestimmter Wachstumsfaktoren diskutiert (84). Charakteristisch ist ein Ungleichgewicht proinflammatorischer und antiinflammatorischer Zytokine. Trachealsekrete von Kindern mit BPD weisen einen erhöhten Gehalt von TGF- β (85) auf. Die von Trachealsekreten isolierten Zellen zeigen eine erhöhte *Messenger Ribonucleic Acid* (mRNA) und Proteinexpression proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin (IL) 1 β , Tumornekrosefaktor α (TNF- α), IL-6 und IL-8 (54) und einen erniedrigten Gehalt antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 (86).

1.4 Zielsetzung und methodische Umsetzung

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, das Verständnis der molekularen Mechanismen der BPD zu vertiefen. Ein kausaler Zusammenhang zwischen einer reduzierten PDGF-R α Signaltransduktion und den charakteristischen histopathologischen Veränderungen der BPD konnte bisher nicht schlüssig gezeigt werden. Die Studie untersuchte daher die Rolle der reduzierten PDGF-R α Expression in der Entwicklung BPD-charakteristischer Veränderungen unter dem Einfluss der MV-O₂ am Modell der neugeborenen Maus. In dem präklinischen, experimentellen Modell der Erkrankung wurden neonatale Mäuse einer MV-O₂ unterzogen.

Auf Basis vorhandener Studien zur Rolle der MV-O₂ und PDGF-R α /PDGF-A Signaltransduktion wurden unter Verwendung transgener Tiere die obligat zusammenhängenden Prozesse der Alveolo- und Vaskulogenese anhand histopathologischer pulmonaler Veränderungen und der Expression zentraler Wachstumsfaktoren untersucht.

Die histologische Beurteilung umfasste die Quantifizierung der Alveolengröße und -zahl, sowie Septen- und Mikrogefäßzahl und die qualitative und quantitative Erfassung der

Elastinfasern und des Vorläuferproteins Tropoelastin. Die Beurteilung der Wachstumsfaktorexpression fokussierte sich auf die PDGF-R α /PDGF-A und VEGF-R2/VEGF-A Signaltransduktion. Darüber hinaus wurden ergänzende Untersuchungen zur Apoptoserate und Inflammation unter MV-O₂ vorgenommen.

Im dieser Arbeit zugrunde liegenden murinen Beatmungsmodell wurden 5-7 Tage alte WT und PDGF-R α haploinsuffiziente (PDGF-R α ^{+/-}) Mäuse mit 40 % Sauerstoff und 180 Atemzügen pro Minute (min) für 8 h beatmet. Dieses murine Beatmungsmodell ist im besonderen Maße für die Erforschung der Pathogenese der BPD geeignet, da die MV-O₂ klinisch angewendete Beatmungsstrategien für Frühgeborene imitiert unter der Verwendung moderater Sauerstoffkonzentrationen, geringen Tidalvolumina und niedrigen inspiratorischen Drücken. Bei spontaner Entbindung der neugeborenen Maus zum Zeitpunkt des physiologischen Geburtstermins erlaubt die im Wesentlichen postnatal fortschreitende Alveologenese die Untersuchung des Effekts der MV-O₂ auf die sich entwickelnde Lunge (57). Das Modell bietet darüber hinaus die einzigartige Möglichkeit der Verwendung transgener Versuchstiere zur Untersuchung spezifischer Signalkaskaden. Während Studien mit homozygoter Deletion von Genen oft zum embryonalen oder neonatalen Tod führen und weiterführende Untersuchungen verhindern, erlaubt die Heterozygotie die Untersuchung des Effektes genetisch nicht-letaler Mutationen auf die Lungenentwicklung unter Verwendung des murinen BPD-Modells. Zusätzlich bietet das Modell die Möglichkeit der interventionellen Behandlung, welche eindrucksvoll mit der intratrachealen Behandlung neonataler Mäusen mit dem Serin Elastaseinhibitor Elafin vor Beginn einer 24-stündigen Beatmung demonstriert wurde (87). Die großen Anforderungen an die technische Umsetzbarkeit und die Durchführung der MV-O₂ einschließlich der umfassenden Überwachung der neugeborenen Mäuse im Rahmen der Beatmungsversuche erklären die reduzierte Verfügbarkeit des Modells, das nur an zwei Standorten weltweit etabliert ist.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialliste (siehe Anhang)

2.2 Tiermodell

2.2.1 Transgene Mäuse

Die in der Studie verwendeten PDGF-R α haploinsuffizienten (PDGF-R $\alpha^{+/-}$) Mäuse (B6.129S4-PDGF-R^{tm11(EGFP)Sor/J}) wurden von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Sie sind heterozygot für das PDGF-R α im zweiten Allel des endogenen PDGF-R α Genlokus ein Histon2B- *enhanced Green Fluorescent Protein* (eGFP) (Abb. 4). Die Mäuse wurden nach dem folgenden Verfahren hergestellt. Unter Verwendung eines Zielvektors mit einem Fusionsgen, bestehend aus einem humanen Histon 2B Protein und einem GFP, H2B-GFP oder H2B-eGFP, sowie einer geflochtenen PGKneo Selektionskassette, wurde die Sequenz des PDGF-R α Gens so verändert, dass der endogene PDGF-R α -Promotor die Expression des H2B-eGFP Fusionsgens kontrolliert. Dieses Konstrukt wurde in die von 129S4/SvJaeSor abgeleiteten AK7 embryologischen Stammzellen elektroporiert. Erfolgreich elektroporierte embryologische Stammzellen wurden in Empfänger Blastozysten injiziert. Die daraus entstandenen chimerischen Tiere wurden mit C57/Bl6 Mäusen in siebzehn Generationen gekreuzt. Fluoreszenz war in den polaren trophoektodermen Zellen jeweils am E 4,5 und im extraembryonalen Ektoderm am E 6,5 detektierbar. Die Expression von H2B - GFP ahmt das Expressionsmuster des endogenen PDGF-R α Gens nach.

Mäuse mit einer homozygoten Deletion des PDGF-R α weisen eine abnormale Entwicklung der Plazenta mit einem veränderten Gefäßsystem auf. Adulte heterozygote Mäuse haben nach ersten Einschätzungen eine normale Lungenentwicklung (72, 88). Sie gelten als klinisch gesund und fertil.

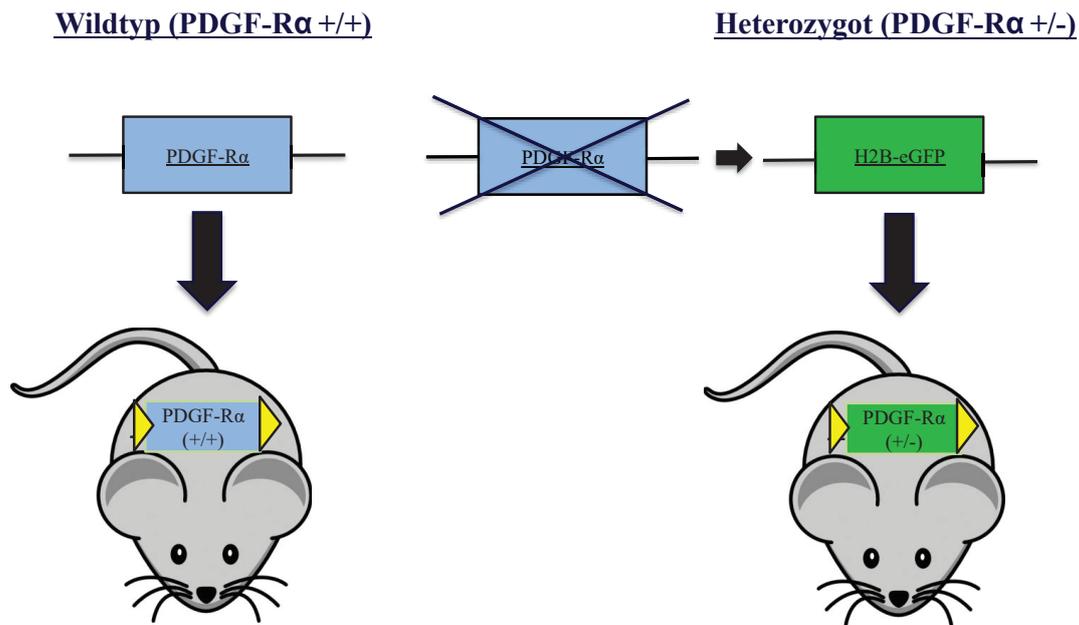


Abb. 4: Transgenes Mausmodell.

Die WT Maus exprimiert 2 Allele des PDGF-R α Gens, während in der heterozygoten Maus auf der zweiten Allele des endogenen PDGF-R α Genlokus ein Histon2B-eGFP exprimiert wird.

2.2.2 Zucht

In Vorbereitung der Beatmungsexperimente wurden C57/Bl6 WT Mäuse und Bl6/PDGF-R α ^{+/-} Mäuse miteinander verpaart. Die nach klinischen Kriterien ausgewählten gesunden Mäuse wurden im Alter von drei Wochen jeweils in sechs Makrolonkäfigen vom Typ II untergebracht (gemäß der Richtlinie der Europäischen Union (EU)). In zwei Käfigen wurden jeweils ein Weibchen und ein Männchen der WT Bl6/C57 Mäuse zusammengesetzt, während in den anderen vier Käfigen jeweils ein WT Bl6/C57 Weibchen und ein Bl6/PDGF-R α ^{+/-} Männchen miteinander verpaart wurden.

Die Tiere befanden sich in einem überdruckbelüfteten Raum mit einer Luftfeuchtigkeit von 50 - 60 % und einer Lufttemperatur von 22 \pm 2 Grad Celsius ($^{\circ}$ C). Die Beleuchtung erfolgte im 12 h Tag-Nacht-Zyklus mit einer gedimmten Ein- und Ausschaltphase. Die Fütterung erfolgte ad libitum mit einem standardisierten Alleinfutter (Altromin 1314). Kontaminationsfreies Wasser stand ständig über eine Plastikflasche mit Nippel zur Verfügung. Zur Verbesserung der Haltungsverhältnisse wurden die Käfige mit Materialien wie Nestlets, Kunststoffröhrchen und Holzspateln ausgestattet. Die Tiere erhielten eine mindestens zweiwöchige Adaptationsphase an ihre neue Umgebung und den Umgang durch

das neue Pflegepersonal, bevor sie zur Paarung eingesetzt wurden. Die Haltung der Tiere erfolgte unter der strengen Aufsicht der Tierversordnungslinien des Helmholtz Zentrum München. Die Versuchstiere wurden zweimal wöchentlich tierärztlich kontrolliert. Zusätzlich erfolgten regelmäßige Kontrollen durch den Tierschutzbeauftragten. Alle chirurgischen und konservativen Tierbehandlungsmethoden, Prozeduren und experimentellen Protokolle wurden überprüft und unter der Tierversuchsgenehmigungsnummer GZ:55.2-1-54-2531-117-10 von der Regierung Oberbayerns genehmigt. Die antragstellende Einrichtung war das Helmholtz Zentrum München, Institute of Lung Biology and Disease (iLBD), Ingolstädter Landstraße 1, 85764 Neuherberg, München. Der Tierversuchsantrag wurde unter der Bezeichnung einer Orientierungsstudie zur Untersuchung des PDGF- α -R α d

Nach spontaner vaginaler Geburt und zeitgerechter Gestation wurden die neonatalen Mäuse im Alter von fünf bis sieben Tagen den Käfigen entnommen und gewogen. Die Mäuse wurden anhand ihrer Bewegung, Hautfarbe und Hautfeuchtigkeit beurteilt. Nur klinisch gesund erscheinende Mäuse mit einem Körpergewicht (KG) von 3-5 g wurden in die Versuche eingeschlossen. So konnten vergleichbare Konditionen und optimale Voraussetzungen für ein 8 h Experiment geschaffen werden. Das durchschnittliche KG der Versuchstiere lag in der WT Kontrollgruppe bei 3,9 (\pm 0,5 g), in der PDGF- α ^{+/-} Kontrollgruppe bei 4,0 (\pm 0,8 g), in der WT Beatmungsgruppe bei 4,0 (\pm 0,4 g) und in der PDGF- α ^{+/-} Beatmungsgruppe bei 4,1 (\pm 0,6 g). Das durchschnittliche KG aller Mäuse lag bei 4,0 (\pm 0,05 g), jeweils Mittelwert und Standardabweichung (*Standard Deviation*, SD).

2.2.3 Beatmungsexperiment

Die Beatmung der neonatalen Mäuse erfolgte in dieser Studie über einen Zeitraum von 8 h, um den frühen Effekt der PDGF- α Haploinsuffizienz auf die neugeborene Lunge unter dem Einfluss der MV-O₂ zu untersuchen (Abb. 5). Dabei wurden pro Experiment fünf Mäuse beatmet und zwei bis vier Mäuse für die Kontrollgruppen vorgesehen. Insgesamt wurden 14 - 16 Mäuse pro Gruppe in das Experiment eingeschlossen (n = 16 / WT Beatmungsgruppe, n =

16 / WT Kontrollgruppe, n = 14 / PDGF-R α ^{+/-} Beatmungsgruppe, n = 15 / PDGF-R α ^{+/-} Kontrollgruppe). Abb. 6 zeigt die Verteilung der Versuchstiere auf die verschiedenen Untergruppen.

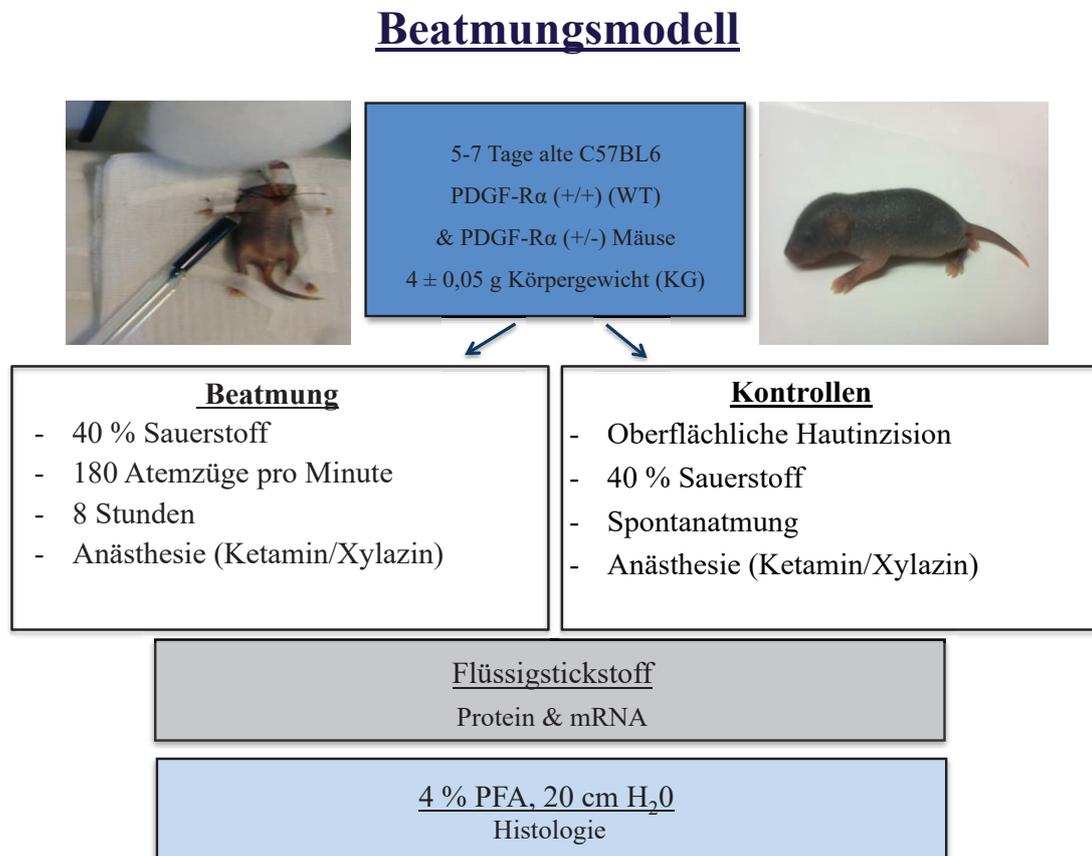


Abb. 5: Beatmungsmodell der Studie.

Eingeschlossen wurden 5-7 Tage alte C57BL6 PDGF-R α ^(+/+) (WT) und PDGF-R α ^(+/-) Mäuse. In der Beatmungsgruppe wurden die neonatalen Mäuse mit 40 % Sauerstoff bei 180 Atemzügen pro min für 8 h beatmet. Die Kontrollen bekamen eine oberflächliche Inzision in den ventralen Halsbereich und 40 % Sauerstoff zugeführt. Beide Gruppen bekamen eine Anästhesie mit Ketamin/Xylazin. Im Anschluss wurden die Lungen für die Histologie oder Protein- und mRNA-Analysen verwendet. Paraformaldehyd = PFA, cmH₂O = Zentimeter Wassersäule.

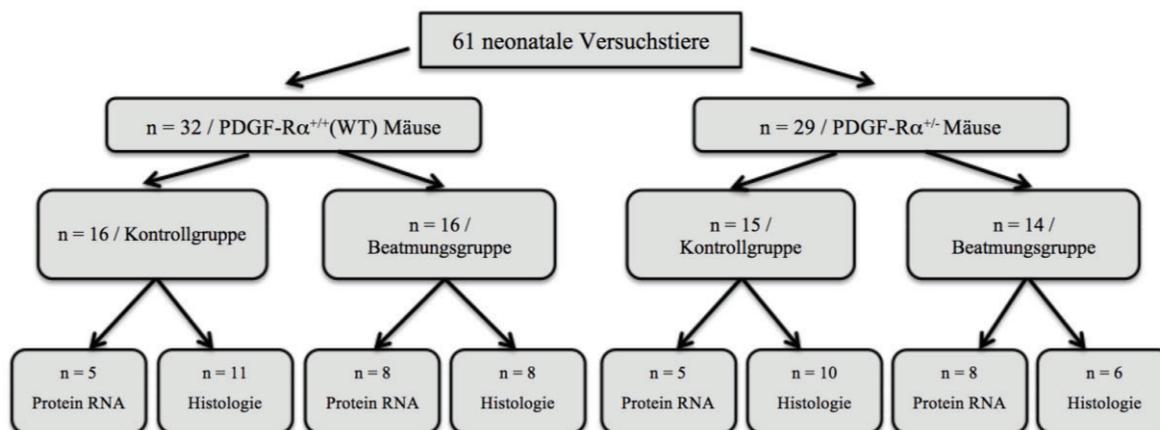


Abb. 6: Übersicht der einzelnen Versuchsgruppen.

32 PDGF-R $\alpha^{+/-}$ Mäuse und 29 WT Mäuse der 61 neonatalen Versuchstiere wurden zu gleichen Teilen in die Kontroll- und Beatmungsgruppen aufgeteilt. Die Lungen wurden anschließend für histologische bzw. Protein- und RNA-Analysen verwendet.

Die subkutan applizierte Anästhesie der Mäuse der Beatmungsgruppen erfolgte gewichtsadaptiert mit Ketamin (~ 60 Mikrogramm (μg)/g KG) und Xylazin (~ 12 μg /g KG). Die ebenfalls subkutan applizierte Anästhesie der Mäuse der Kontrollgruppen bestand aus einer einmaligen Gabe von Ketamin (75 μg /g KG) und Xylazin (15 μg /g KG). Bis zum vollständigen Wirkungseintritt der Anästhesie wurden die Mäuse beider Gruppen auf einem elektrischen Wärmekissen warm gehalten. Durch die prolongierte Aufnahme der Anästhetika waren die Mäuse unter Minimierung der kardiovaskulären Nebeneffekte tief und lang sediert. Die Mäuse der Kontrollgruppen bekamen anschließend eine kleine oberflächliche Inzision in den ventralen Halsbereich. Die Mäuse der Beatmungsgruppen wurden in Vorbereitung der MV-O₂ tracheotomiert. Die Tracheostomie wurde unter einem Seziernmikroskop (Stereomikroskop M80, Leica Mikrosysteme GmbH, 10450155, Wetzlar, Deutschland) durchgeführt. Es erfolgte eine mittige Halsinzision. Die Trachea wurde mit einem kleinen Spalt versehen und ein speziell angefertigter Polyvinyl Katheter (intratracheales Segment: innerer Durchmesser (ID) 0,28 Millimeter (mm), äußerer Durchmesser (OD) 0,61 mm, Länge 1-2 mm) eingebracht und fest in die Trachea genäht. Die Tracheostomie wurde über ein kleines Röhrchen, das an den in der Trachea platzierten Katheter gesteckt wurde, über ein weiteres Röhrchen mit dem Anschluss der Beatmungsmaschine verbunden.

Die MV-O₂ erfolgte über speziell angefertigte Beatmungsstationen (MicroVent Model 848 Ventilator; Hugo Sachs Elektronik/Harvard Apparatus, Holliston, MA) für eine Zeitdauer von 8 h bei einer Atemfrequenz von 180 Atemzügen pro min unter positivem Druck mit einer FiO₂ von 0,40. Das Beatmungsprotokoll mit einer applizierten Sauerstoffkonzentration von

40 %, niedrigen Tidalvolumina und geringen Beatmungsdrücken wurde entsprechend der über Jahrzehnte modifizierten Beatmung des Frühgeborenen der klinischen Situation angepasst.

Das durchschnittliche Tidalvolumen der WT Mäuse lag bei $8,3 \pm 0,5$ Mikroliter (μl)/g KG und der PDGF-R α^{\pm} Mäuse bei $7,9 \pm 0,3$ μl /g KG. Zur optimalen Einstellung der MV-O₂ wurde die Beatmung zu Beginn des Experiments mit höheren Tidalvolumina bis maximal 10 μl /g KG begonnen. Sobald eine regelrechte Tubusanlage anhand von sichtbaren gleichmäßigen Thoraxexkursionen der Mäuse bei Inspiration und Expiration sichergestellt werden konnte, wurde das Tidalvolumen stufenweise erniedrigt, bis ein Tidalvolumen von 7-8 μl /g KG erreicht wurde.

Die Messungen der inspiratorischen Beatmungsdrücke erfolgten zu Beginn eines Experiments an jeder Beatmungsmaschine für die eingestellten Tidalvolumina mithilfe eines Druckmonitors. Abbildung 7 zeigt den mittleren Beatmungsdruck (*Mean Airway Pressure*, MAP) und den maximalen Beatmungsdruck (*Maximal Inspiratory Pressure*, MIP) für die Mäuse der verschiedenen Gruppen.

| | MAP | MIP |
|-----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Alle Versuchstiere | $11 \pm 3,7$ cmH ₂ O | $13 \pm 4,5$ cmH ₂ O |
| PDGF-R α^{\pm} Mäuse | $10 \pm 1,7$ cmH ₂ O | $11 \pm 2,2$ cmH ₂ O |
| WT Mäuse | $11 \pm 1,7$ cmH ₂ O | $12 \pm 2,3$ cmH ₂ O |

Abb. 7: Mittlerer und maximaler Beatmungsdruck in den Versuchsgruppen.

Die Zuteilung der Mäuse an die fünf Beatmungsstationen erfolgte nach dem Zufallsprinzip. Während der MV-O₂ lagen die beatmeten Mäuse in Rückenlage auf einer Unterlage. Diese bestand aus einer Komresse und wurde auf einem elektrischen Wärmekissen positioniert (Abb. 8).



Abb. 8: Position einer Maus an einer Beatmungsstation während der 8-stündigen MV-O₂.

Das elektrische Wärmekissen und eine zusätzlich aufgestellte Wärmelampe sorgten für die Sicherstellung der physiologischen Körpertemperatur der Mäuse, die alle 30 min kontrolliert wurde. Die Messung der Körpertemperatur erfolgte mithilfe eines Temperaturmessgeräts. Je nach gemessener Körpertemperatur konnte die Temperatur der Wärmekissen durch ein Dreistufentemperatursystem kontinuierlich reguliert werden. So wurden die Versuchstiere vor Auskühlung bzw. Überwärmung optimal geschützt. Die Mäuse wurden mit einer dünnen Klarsichtfolie bedeckt, um den kutanen Flüssigkeitsverlust und Temperaturverlust während der Beatmung zu minimieren.

Alle 30 min erfolgte die Beurteilung der Hautfarbe, der Temperatur, der Schwanzfarbe, der Größe und Farbe der Leber und der Herzgröße der Versuchstiere. Der Inflationsstatus der Lunge wurde anhand der Thoraxexkursionen überprüft und die Tiefe der Sedierung anhand der Antwort der Tiere auf taktile Stimulation eingeschätzt. Nach jeder Beurteilung wurde ein zusammenfassender Status dokumentiert. Sobald eine vermehrte Körperaktivität oder eine verstärkte Antwort auf taktile Stimulation der Mäuse beobachtet wurden, erfolgte die nochmalige Anästhesie mit 0,01 Milliliter (ml) Dosis der Ketamin/Xylazin Lösung.

Die Haltung der Mäuse aus der Kontrollgruppe erfolgte in einer warmen gepolsterten Plastikbox auf einem Wärmekissen, in die angefeuchtetes, erwärmtes, 40 % sauerstoffreiches Gas zugeführt wurde. Das Entweichen von Kohlenstoffdioxid (CO₂) wurde durch kleine Luftlöcher gewährleistet. Eine Anästhesie wurde zu Beginn der Studie vor der oberflächlichen Hautinzision durchgeführt. Die Mäuse der Kontrollgruppen wurden kontinuierlich überwacht. Am Ende jedes Beatmungsexperiments erfolgte die Euthanisierung der Mäuse durch Phenobarbital (150 µg/g KG). Die für die RNA- und Protein-Extraktionen vorgesehenen

Lungen wurden nach der Thoraxeröffnung sofort entnommen und tiefgefroren. Die Mäuse, deren Lungen für die histologische Nachbearbeitung vorgesehen waren, wurden über die Trachealkanüle mit 4%iger PFA Lösung fixiert. Die Mäuse der Kontrollgruppen wurden für die Fixierung in 4%iger PFA Lösung am Ende des Experiments vor der Euthanisierung tracheotomiert.

Da in vorangegangenen Beatmungsstudien des gleichen Tiermodells gezeigt werden konnte, dass die neonatalen Mäuse bei einer Beatmungsdauer von 8 h keinen Gewichtsverlust aufweisen, wurde auf die Anlage einer Magensonde zur oralen Ernährung verzichtet (23, 24, 28, 87).

In früheren Beatmungsstudien konnten in einem Versuchsaufbau unter Verwendung der gleichen Beatmungsparameter in Blutgasanalysen am Ende der Versuche ausgeglichene Blutgasparameter nachgewiesen werden. Herzfrequenz- und Blutdruckwerte lagen in dieser Studie ebenso im Normbereich (24).

2.3 Histologie

2.3.1 Fixierung, Entwässerung und Einbettung der Lungen

Pro Versuchsgruppe wurden die Lungen von 6 - 11 Mäusen für die Analysen der Histologie verwendet: n = 11 / WT Kontrollgruppe, n = 8 / WT Beatmungsgruppe, n = 10 / PDGF-R α ^{+/-} Kontrollgruppe, n = 6 / PDGF-R α ^{+/-} Beatmungsgruppe. In Vorbereitung für die histologische Beurteilung erfolgten die folgenden Schritte der Fixierung, der Entwässerung und der Einbettung der Lungen.

Die Fixierung der Lungen in 4%iger PFA Lösung hatte zum Ziel, das Lungengewebe strukturell zu konservieren. Nach Abschluss der MV-O₂ und Euthanisierung der Mäuse mit Phenobarbital wurde hierzu zunächst das Abdomen eröffnet und das Zwerchfell punktiert, um die Ausweitung der Lungen nach der Füllung mit der Fixierlösung zu ermöglichen. Die Tracheostomie wurde über einen passenden Plastikkatheter mit einer Säule verbunden, die mit frisch hergestellter Fixierlösung gefüllt war. Die Lungen wurden mit einem standardisierten Druck von 20 cmH₂O über Nacht für 24 h bei 4 °C im Kühlschrank fixiert. Das Lungenvolumen wurde anschließend mithilfe der Differenzmethode gemessen. Dabei wird die Lunge in einem mit Wasser gefüllten Messzylinder vollständig untergetaucht und das Lungenvolumen als Differenz der sich ergebenden Volumina vor und nach dem Untertauchen bestimmt. Die Lungen der Mäuse wurden anschließend in Einbettungskassetten gebracht und für kurze Zeit in 70 % Ethanol inkubiert.

Anschließend erfolgte der Prozess der Entwässerung, bei dem den Lungen über mehrere Schritte durch Alkohol in steigender Konzentration langsam Wasser entzogen wurde. Der Alkohol wurde durch das Intermedium Xylol ersetzt, welches abschließend durch Paraffin ersetzt wurde. Dieser Prozess wurde stufenweise durchlaufen, um Schrumpfungen und Zerreißen des Lungengewebes zu vermeiden: In 18 h wurden in maschineller Unterstützung 12 Stationen (1 h 70 % Ethanol, 1 h 80 % Ethanol, 1 h 96 % Ethanol, 2x2 h 96 % Ethanol, 1 h 100 % Ethanol, 2x2 h 100 % Ethanol, 1 h Xylol, 1 h Paraffin, 2 h Paraffin) durchlaufen.

Nach der Entwässerung wurden die Lungen in Paraffin eingebettet. Die Gießform aus Edelstahl wurde hierzu mit flüssigem Paraffin gefüllt, die Lunge am Stück zügig mittig darin platziert und die Einbettungskassette mit dem Boden nach unten aufgelegt. Der Paraffinblock wurde dann vorsichtig aus der Gießform gelöst, nachdem er für 10 min auf einer Kälteplatte aushärten konnte.

2.3.2 Orientator

Vor dem Schneiden der Lungen am Mikrotom wurden alle Lungenblöcke nach der Methode der randomisierten Orientierung (*Isotropic Uniform Random, IUR*) positioniert, um die histologische Beurteilung der Lunge aus einer zufälligen, wechselnden Perspektive und die Betrachtung des größtmöglichen Lungenanteils zu ermöglichen.

Der Paraffinblock wurde hierzu mit seiner longitudinalen Achse auf dem Orientator anhand eines von einer Zahlenliste willkürlich ausgewählten Winkels platziert und anschließend entlang der 0°-Achse mithilfe eines Skalpellts angeschnitten. Die neu entstandene Fläche des Paraffinblocks wurde auf einen zweiten Orientator platziert, die longitudinale Achse des Blocks entlang eines weiteren willkürlich ausgewählten Winkels ausgerichtet und der Block erneut entlang der 0°-Achse geschnitten. Die entstandene neue Oberfläche des Blocks bildete die Kontaktfläche für einen Holzblock, der später am Mikrotom für das eigentliche Schneidverfahren befestigt wurde. Der Holzblock wurde vorher in einem Ofen leicht erhitzt, um die Befestigung des Paraffinblocks zu erleichtern. Ebenfalls wurde ein Metallspatel durch eine Heißluftpistole erhitzt und der geschnittene Paraffinblock kurz mit der zuletzt entstandenen neuen Oberfläche darauf platziert, um mit der angeschmolzenen Oberfläche die Befestigung auf dem Holzblock zu erleichtern.

2.3.3 Schneiderverfahren

Die so willkürlich orientierte Lunge wurde mit Hilfe des Zeiss Hyrax M55 Microtome in 4 Mikrometer (μm) dicke Schnitte geschnitten. Es wurden immer zwölf Schnitte in Serie angefertigt. Die Abstände zwischen den Serienschnitten wurden anhand einer willkürlichen Zahlenliste festgelegt. Die Gewebeschnitte wurden nach der Fixierung im Wasserbad bei 50 °C auf die Objektträger übertragen, die Objektträger auf einer Herdplatte getrocknet und in Plastikboxen vor der anschließenden Färbung trocken gelagert. Die Auswahl der Gewebeschnitte für die Färbungen erfolgte ebenso randomisiert.

2.3.4 Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung

Durch die Färbemethode mit HE werden feingewebliche Lungenstrukturen angefärbt. Die zufällig ausgewählten Gewebeschnitte wurden dafür in einer absteigenden Alkoholreihe (Xylol, 100 %, 96 %, 90 %, 80 %, 70 %) entparaffiniert und anschließend für 5 min in Mayer's Hämalaun inkubiert. Das Hämalaun sorgt für die charakteristische blauviolette Kernfärbung, in dem es durch seine positive Ladung an die negativ geladene Desoxyribonukleinsäure (*Deoxyribonucleid Acid*, DNA) bindet. Nach der Inkubation in Hämalaun wurde eine kurze Spülung der Schnitte in Leitungswasser durchgeführt. Anschließend wurden die Schnitte kurz in 0,1%iger *Hydrochloric Acid* (HCl) - Alkohol-Lösung geschwenkt, um eine starke Dunkelfärbung der Schnitte zu vermeiden. Es erfolgte ein erneuter 15 minütiger Spülschritt und nach kurzer Inkubation in destilliertem Wasser erfolgte die Inkubation in Eosin (8 min). Nach Durchlaufen einer aufsteigenden Alkoholreihe mit zweimaligem kurzen Schwenken in 70 % Ethanol, 80 % Ethanol, 90 % Ethanol, 96 % Ethanol und zwei aufeinander folgenden Inkubationen in 100 % Ethanol für 1 min erfolgte eine zweimalige 5 minütige Inkubation in Xylol. Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit Deckplättchen bedeckt und fixiert.

2.3.5 Elastin Färbung nach HART

Die Elastin Färbung nach HART wurde zur Bestimmung der Anordnung und Form der Elastinfasern durchgeführt. Anhand der Färbung wurde der Anteil des Elastins am interstitiellen Gewebe der Lunge für die Mäuse aus den verschiedenen Gruppen quantifiziert. Diese Quantifizierung wurde durch Analysen der Tropoelastinexpression ergänzt.

Die randomisiert ausgewählten Gewebeschnitte wurden in Xylol (2 x 15 min) entparaffiniert und mittels einer absteigenden Alkoholreihe entwässert (siehe 2.3.4.). Nach zwei Spülschritten in destilliertem Wasser wurden die Schnitte in frischer 0,25%iger

Kaliumpermanganat-Lösung inkubiert. Bei Farbumschlag (lila nach braun) wurden die Schnitte gespült und in eine frische 0,25%ige Kaliumpermanganat-Lösung gestellt. Nach mehrfachen Spülschritten mit destilliertem Wasser wurden die Schnitte in 5 % Oxalsäure für 5-10 Sekunden (sek) inkubiert. Dies führte zu einer Entfärbung. Nach kurzen Spülschritten in Leitungswasser und destilliertem Wasser wurden die Gewebeschnitte in 0,25%iger Tartrazin-Lösung für 1,5 min inkubiert. Das Tartrazin erzeugt eine gelbe Hintergrundfarbe. Schließlich wurden die Gewebeschnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70 % - 96 %) dehydriert und 5 min in 100 % Ethanol und Xylol (2 x 5 min) inkubiert. Die Gewebeschnitte wurden anschließend mit Mounting Media (Dako, #S3023, North America Inc, Kalifornien, USA) eingedeckt.

2.3.6 Immunhistochemie

Mithilfe der Methode der Immunhistochemie können bestimmte Proteine durch Antigen-Antikörperreaktionen auf Gewebeschnitten angefärbt und so genau lokalisiert werden.

Durch die immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper F4/80 erfolgte die Färbung des auf Makrophagen und Monozyten exprimierten Oberflächenantigens in den Lungenschnitten. Darüber hinaus wurden neutrophile Granulozyten durch die Färbung des Oberflächenantigens Lymphocyte antigen 6 complex-Locus G (Ly6G) detektiert. Für beide Färbungen wurden die randomisiert ausgewählten Gewebeschnitte in Xylol entparaffiniert (3 x 5 min), durch eine absteigende Alkoholreihe rehydriert (siehe 2.3.4.) und mit destilliertem Wasser gespült. Die Prozesse der Einbettung und Fixierung können zur Bildung von Quervernetzungen zwischen Proteinen führen und in Folge eine Antigen-Antikörperreaktion verhindern und die Immunreaktivität der Proteine herabsetzen. Zur Lösung dieser Quervernetzungen wurde der Prozess der Antigendemaskierung, das *Antigen-Retrieval*, angewandt. Hierzu wurden die Lungenschnitte in einer *Retrieval*-Lösung in einem Dampfkochtopf für 30 - 60 min inkubiert, anschließend in Waschpulver (3 x 2 min) gewaschen und 15 min in Dual Endogenous Enzyme-Blocking Reagent inkubiert, um unspezifische Bindungen des primären oder sekundären Antikörpers zu minimalisieren. Anschließend erfolgte die Inkubation der Lungenschnitte in 10%igem Ziegenerum für 30 min und die Inkubation mit dem entsprechenden primären Antikörper über Nacht bei 4 °C. Der primäre Antikörper für Makrophagen/Monozyten (rat anti-F4/80, Abcam, ab6640, Cambridge, USA) wurde in einer 1:200-fachen Verdünnung angewendet, während der primäre Antikörper für Neutrophile (rat anti-Ly-6G, Gr-1, eBioscience, #14-5931-85, San Diego, USA) in einer 1:100-fachen Verdünnung angewendet wurde. Danach erfolgte ein erneuter Waschschrift in Waschpuffer (3

x 2 min). Nach Inkubation der Lungenschnitte mit dem streptavidin- *Horseradish Peroxidase* (HRP)-konjugierten Sekundärantikörper (Vector Laboratories, #SA-5704, Burlingame, USA) erfolgte nach erneuten Waschschritten (3 x 2 min) die Inkubation in Diaminobenzidine (+) vor einem erneuten Waschschriff. Der Waschschriff wurde nach der Hintergrundfärbung der Schnitte mit Hematoxylin 1 für 45 sek wiederholt. Danach wurden die Schnitte einer aufsteigenden Alkoholreihe unterzogen und anschließend mit Cytoseal 60 (Thermo Scientific, #8310-16, Waltham, USA) bedeckt.

Zur Quantifizierung der Neutrophilen Granulozyten wurde pro Lunge die Zahl der Ly6G positiven Zellen und die Zahl der Alveolen bei 200-facher Vergrößerung in mindestens zehn Gesichtsfeldern eines Gewebeschnitts gezählt. Daraus wurde die Zahl der Ly6G positiven Neutrophilen pro 100 Alveolen berechnet. Die Quantifizierung der F4/80 positiven Monozyten und Makrophagen erfolgte entsprechend.

2.3.7 Immunfluoreszenzfärbung

Bei der Immunfluoreszenzfärbung werden Antikörper, die an einen fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt sind, zum Nachweis und zur Lokalisierung ihres spezifischen Antigens verwendet.

2.3.7.1 CD31/Aktivierte Caspase-3/4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) Färbung

Cluster of Differentiation 31 (CD31) wird neben anderen Zellen von Endothelzellen exprimiert. Caspasen sind Proteasen, die in einer Kettenreaktion die Apoptose einleiten. Die aktivierte Caspase-3 gilt als spezifischer Marker für apoptotische Zellen. Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI lagert sich insbesondere im Bereich der A-T Regionen von doppelsträngiger DNA an und wird zur Anfärbung von Zellkernen eingesetzt.

Um die Zahl der aktivierten Caspase-3 und CD31 positiven Zellen zu quantifizieren, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit CD31/Aktivierte Caspase-3/DAPI durchgeführt. Dazu wurden die randomisiert ausgewählten Lungenschnitte in phosphatgepufferter Salzlösung (*Phosphate Buffer Saline*, PBS) gewaschen (2 x 2 min) und in kaltem 100%igen Ethanol für 15 min auf Eis fixiert. Die Fixierung diente der Konservierung der Zellstruktur und der Proteinkomponenten. Danach erfolgte die Trocknung der Lungenschnitte auf Eis für weitere 30 min und die Inkubation mit kaltem PBS bei Raumtemperatur für 30 min zur Rehydrierung des Gewebes. Anschließend erfolgte die Inkubation der Lungenschnitte mit 0,1%iger Triton 100X Lösung in PBS für 15-30 min bei Raumtemperatur zur Permeabilisierung der Zellmembranen. Nach weiteren Inkubationsschritten mit PBS (3 x 5 min) erfolgte die einstündige Inkubation mit dem Proteinblockierreagenz Background Sniper/Serum-5 % v/v,

um die Bildung unspezifischer Bindungen primärer und sekundärer Antikörper und dadurch eine ausgeprägte Hintergrundfärbung zu vermeiden. Dann wurden die Schnitte mit dem primären Antikörper (CD31, #DIA-310, Dianova; Caspase-3, #9662, Cell Signaling) in einer 1:200-fachen Verdünnung 2-4 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in PBS gewaschen (3 x 5 min). Zur Überprüfung unspezifischer Bindungen erfolgten anschließend die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (AlexaFluor 568, #A11057, Invitrogen; AlexaFluor 647, #A21247, Invitrogen; Alexa Fluor 568, #A11004, Invitrogen; Alexa Fluor 568, #A11011, Invitrogen) in 1:250-facher Verdünnung bei Raumtemperatur für 30-45 min, mehrere Waschschrte in PBS (3 x 5 min) und die Anfärbung des Kernchromatins mit DAPI (blau) (1:10000) für 10-15 min. Nach weiteren Waschschrten (3 x 5 min) erfolgte die Beschichtung der Gewebeschnitte mit 70%iger Glycerol-Lösung (in PBS) und die Eindeckung und Abdichtung der Gewebeschnitte unter Verwendung eines transparenten Nagellacks.

Die aktivierten Caspase-3 und CD31 positiven Zellen wurden in acht Gesichtsfeldern pro Mauslunge bei 400-facher Vergrößerung mit Hilfe der Imaris Software (Imaris Software, Zurich, Switzerland) quantifiziert.

2.3.7.2. PDGF-R α α -Smooth Muscle Actin (α -SMA) (89), während Galectin-3 inflammatorische Zellen wie Monozyten (90) und Makrophagen markiert. Die Immunfluoreszenzfärbung der PDGF-R α α -SMA-positiven Zellen und Galectin-3 positiven Zellen wurde nach demselben Verfahren durchgeführt. Randomisiert ausgewählte Gewebeschnitte wurden für 30 min bei 60 °C inkubiert und entparaffiniert. Anschließend wurden die Schnitte in einem Druckkochtopf in Zitratpuffer (pH 6,0) 30 sek bei 125 °C und danach 10 sek bei 90 °C inkubiert, langsam abgekühlt und in 1x Trishydroxymethylaminomethan (TRIS) Puffer gewaschen (3x). Um die endogene Peroxidase zu blocken, wurden die Lungenschnitte anschließend für 15 min in Wasserstoffperoxid (H₂O₂) (3 ml 30 % H₂O₂ in 50 ml destilliertem Wasser) inkubiert und nach weiteren Waschschrten in 1x TRIS Puffer getrocknet, bevor sie mit dem primären Antikörper für Monozyten (Galectin-3 H160, #sc-20157, Santa Cruz) und MFB (PDGF-R α (C-20), #sc-338, Santa Cruz; α -SMA, #A5228, SigmaAldrich) mit entsprechender Verdünnung mit Antibody Diluent (100 μ l pro Objektträger) für eine Stunde inkubiert wurden. Nach einem erneuten dreifachen Waschschrte in 1x TRIS Puffer wurden die Schnitte mit dem sekundären Antikörper (AlexaFluor 568, #A11057, Invitrogen; AlexaFluor 647, #A21247, Invitrogen;

Alexa Fluor 568, #A11004, Invitrogen; Alexa Fluor 568, #A11011, Invitrogen) in einer 1:250-fachen Verdünnung für 30 min in einem lichtgeschützten Gefäß inkubiert. Nach weiteren Waschschritten mit 1x TRIS Puffer (3x) erfolgte die Inkubation der Lungenschnitte mit DAPI (1:2500) für 1 min zur Färbung der Nuklei. Nach einem weiteren dreifachen Waschschriff der Lungenschnitte in 1x TRIS Puffer wurden diese mit Fluorescence Mounting Medium bedeckt und im Dunkeln bei 4 °C gelagert.

2.3.8 Histologische Analyse der Gewebeschnitte

Für die Analyse der Histologie der Mäuse der WT Kontroll- und Beatmungsgruppe und PDGF-R $\alpha^{+/-}$ Kontroll- und Beatmungsgruppe wurden pro Mauslunge drei oder vier HE gefärbte Gewebeschnitte randomisiert ausgewählt. Folgende Parameter der histologischen Analyse wurden mithilfe eines Olympus BX51 Lichtmikroskops und eines Computerbasierten Zählsystems (CAST-Grid 2.1.5; Olympus, Ballerup, Dänemark) quantifiziert:

1. Alveolenfläche
2. Alveolenzahl (*Radial Alveolar Count* = Maß für die Zahl der Alveolen)
3. Septenzahl
4. Anteil der Elastinfasern am interstitiellen Gewebe
5. Mikrogefäßzahl (20 – 100 μm)
6. Anteil atelektatischer Lungenbezirke

2.3.8.1. Quantifizierung der Alveolenfläche

Zur Quantifizierung der Alveolenfläche wurde die Fläche aller vollständig ausgebildeten Alveolen in vier Gesichtsfeldern pro Gewebeschnitt einer Maus bei 200-facher Vergrößerung gemessen. Pro Lunge wurden mindestens zwölf Gesichtsfelder in drei bis vier Gewebeschnitten analysiert. Jede bereits quantifizierte Alveole wurde markiert, um doppelte Auswertungen zu vermeiden. Die Messungen der Alveolenfläche wurden zusammengefasst und der Durchschnittswert sowie die Standardabweichung pro Lunge berechnet.

2.3.8.2. Radial Alveolar Count (RAC)

Der *Radial Alveolar Count* (RAC) ist ein Maß für die Zahl der Alveolen pro terminale respiratorische Einheit. Die Messung des RAC wurde nach der Methode von Emery und Mithal durchgeführt (91). Dabei wird von einer ausgewählten terminalen respiratorischen Einheit eine Linie senkrecht zum nächstliegenden Abschnitt der viszeralen Pleura gezogen. Alle Alveolen, die von dieser Linie gekreuzt werden, werden gezählt. In drei oder vier

Gewebeschnitten pro Lunge wurde die Zahl der Alveolen in mindestens dreißig Gesichtsfeldern bei einer 200-fachen Vergrößerung gezählt. Die Messungen der Alveolenzahl wurden zusammengefasst und der Durchschnittswert sowie die Standardabweichung pro Lunge berechnet.

2.3.8.3. Septenzahl

Zusätzlich zur Messung der Alveolenfläche und -zahl wurde die Zahl der Septen quantifiziert. Die Zahl der Septen wurde bei 200-facher Vergrößerung in je zwei Gewebeschnitten pro Lunge in mindestens dreißig Gesichtsfeldern mit Hilfe eines Linienrasters des Computerbasierten Zählsystems (CAST-Grid 2.1.5; Olympus, Ballerup, Dänemark) quantifiziert. Die durchschnittliche Septenzahl pro Lunge wurde für die Tiere der Beatmungsgruppe auf die durchschnittliche Septenzahl in den Lungen der Kontrollgruppe normalisiert.

2.3.8.4. Quantifizierung der Elastinfasern

Der Anteil des Elastins am interstitiellen Lungengewebe wurde auch mithilfe des CAST Programms mit Gewebeschnitten nach Elastin Färbung bestimmt. Dabei wurde ein Linienraster auf ein Gesichtsfeld eines Gewebeschnittes projiziert und bei 400-facher Vergrößerung gezählt, wie viele Bereiche mit Elastinfasern oder interstitiellem Lungengewebe von den Linien des Rasters durchzogen wurden. Anschließend wurde der Anteil der Bereiche auf Elastin zum Anteil der Bereiche auf interstitiellem Lungengewebe pro Gesichtsfeld berechnet. Pro Lunge wurden mindestens vierzig Gesichtsfelder auf diese Weise quantifiziert. Die Messungen des Anteils des Elastins am interstitiellen Lungengewebe wurden zusammengefasst und der Durchschnittswert sowie die Standardabweichung pro Lunge berechnet.

2.3.8.5. Quantifizierung der Mikrogefäßzahl

Die Quantifizierung der Mikrogefäße (zwischen 20 μm und 100 μm) erfolgte pro Lunge in mindestens dreißig Gesichtsfeldern bei 400-facher Vergrößerung. Die Messungen wurden zusammengefasst und die durchschnittliche Gefäßzahl pro Gesichtsfeld normalisiert auf 100 Alveolen berechnet.

2.3.8.6. Anteil der atelektatischen Lungenbezirke

Der Anteil der atelektatischen Lungenbezirke an der Gesamtfläche der Lunge wurde in drei Gewebeschnitten pro Maus von jeder Gruppe quantifiziert. Hierzu wurde der Bereich der

atelektatischen Lungenbezirke markiert und als Anteil der Gesamtfläche der Lunge eines Lungenschnitts berechnet. Die Messungen wurden zusammengefasst und der durchschnittliche Anteil atelektatischer Lungenbezirke in allen Lungen sowie die Standardabweichung berechnet.

2.4 Proteinanalyse

Am Ende der achtstündigen Beatmungsexperimente wurden den Mäusen die für die Protein- und RNA-Analysen vorgesehenen Lungen (5 - 8 pro Gruppe) entnommen, das Lungenvolumen ermittelt und das Gewebe anschließend sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Von jeder Lunge wurde je ein Teil für die Protein- und RNA-Analysen verwendet, um repräsentative Analysen von beiden Lungenflügeln, sowie Ober- und Unterlappen, durchführen zu können. Die Proben wurden vor der anschließenden Weiterbearbeitung bei -80 °C im Gefrierschrank gelagert.

2.4.1 Proteinextraktion

Das Gewebe wurde für die Proteinextraktion in ein Reaktionsgefäß mit einer darin enthaltenen Metallkugel mit 9 mm Durchmesser überführt und unter Verwendung des Mikro-Dismembrator S (Sartorius Stedim Biotech, BBI-8531609, Göttingen, Deutschland) für 30 sek bei 3000 Umdrehungen pro min (*revolutions per minute*, rpm) homogenisiert.

Danach wurde dem Gewebehomogenisat 600 µl Extraktionspuffer zugesetzt. Der kühl gelagerte Harnstoffpuffer mit einem pH von ca. 7,7 bestand aus 0,139 g K₂HPO₄, 12 g Harnstoff und 85 ml deionisiertem Wasser. Der beigefügte Halt Protease Inhibitor Single-Use Cocktail EDTA-Free diente zur Vermeidung des endogenen Proteinabbaus durch Proteasen. Die Reaktionsgefäße wurden für eine Stunde bei 4 °C im Kühlschrank auf einem Orbitalshaker leicht rotiert. Danach wurde das Homogenisat erneut gemischt, in frische 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und anschließend für 30 min bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde nach der Zentrifugierung in ein weiteres 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, auf Eis gekühlt, aliquotiert und die Aliquote von 140-150 µl anschließend bei -80 °C im Gefrierschrank aufbewahrt.

2.4.2 Messung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration jeder Probe wurde mittels der Bicinchoninsäure (*Bicinchoninic Acid*, BCA) Methode unter Verwendung des Kit BCA Protein Standards nach Angaben des Herstellers gemessen. Die Messung der Absorption der BCA Standardreihe sowie der Proteinaliquote der Mäuse erfolgte bei 562 Nanometer (nm) mithilfe des TECAN sunrise™

plate readers. Die Proteinproben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Die Proteinquantifizierung der Aliquote erfolgte in einem Ansatz. Es wurden Proben mit ähnlicher Proteinkonzentration zur Proteinbestimmung eingesetzt.

2.4.3 Immunoblot

Im Immunoblotverfahren wird die Proteinexpression eines bestimmten Proteins im Lungenhomogenisat semiquantitativ bestimmt. Hierzu wurden 20 Mikrogramm (μg) Protein in einem Gesamtvolumen von 30 μl auf ein Gel aufgetragen. Dabei wurden pro Ansatz die Proteinextrakte mit 3 μl NuPAGE Sample Reducing Agent 10x, 7,5 μl NuPAGE LDS Sample Buffer 4x und entsprechend destilliertem Wasser versetzt und für 10 min bei 70 °C in einem Heizblock denaturiert. Zur Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Größe wurden die denaturierenden Polyacrylamid Gele, 4-12 % Bis-Tris (1,0 mm x 10-well) (Invitrogen, NPO 0321Box, Kalifornien, USA) und 3-8 % Tris-Acetate (Invitrogen, EA0375Box, Kalifornien, USA) verwendet. Der Ladepuffer wurde mit 760 ml destilliertem Wasser und 40 ml MES Sodiumdodecylsulfat (SDS) Running Buffer 20x für Bis-Tris Gele oder 40 ml Tris-Acetate SDS Running Buffer 20x (Invitrogen, LA0041, Kalifornien, USA) für Tris-Acetate Gele hergestellt. Die Mitte der Immunoblotkammer (XCell SureLock Mini-Cell Electrophoresis System, ThermoFisher Scientific, EI0001, Waltham, MA, USA) wurde mit dem Puffer gefüllt und 500 μl NuPAGE Antioxidant hinzugefügt.

Nach dem Denaturierungsschritt wurden die Proteinextrakte zentrifugiert und zusammen mit einem Protein Standard MagicMark XP Western Protein Standard 20-220 Kilo-Dalton (kDa) (Invitrogen, LC5603, Kalifornien, USA) auf das Gel aufgetragen. An die Immunoblotkammern wurde eine Spannung von 200 Volt (V) (Bis-Tris Gele) für 45 min und eine Spannung von 150 V (Tris-Acetate Gele) für 60 min angelegt.

Der Proteintransfer auf einer Nitrozellulose Membran erfolgte in Transferpuffer bestehend aus 850 ml destilliertem Wasser, 50 ml NuPAGE Transfer Buffer 20x und 100 ml Methanol. Nach Beendigung der Laufzeit der Gele wurde in Transferpuffer getränktes Filterpapier auf die obere Seite des Gels platziert, das Gel umgedreht und auf das Filterpapier aufgetragen. Anschließend wurde das Gel mit einer in Puffer getränkten Nitrozellulose Membran (8,5 cm x 13,5 cm) und einem zweiten Filterpapier bedeckt. Der Filterpapier-Membran-Gel Sandwich wurde umgeben von in Puffer getränkten Schwämmen und zwei Immunoblotplatten in die gereinigte Immunoblotkammer befördert. Der mittlere Teil der Kammer wurde mit dem restlichen Transferpuffer und der äußere Bereich mit kaltem destilliertem Wasser gefüllt, bevor an die Kammer eine Spannung von 30 V für 60 min angelegt wurde.

Nach dem Transfer wurde die Nitrozellulose Membran auf dem Orbitalshaker bei 4 °C im Kühlschrank für eine Stunde mit einem Puffer bestehend aus 5%iger Milchlösung (Skim Milk Powder, Sigma-Aldrich, 70166-500G, Perth, Australien) in 0,1 % Tris-Buffered Saline-Tween (TBS-T) inkubiert. Dieser Puffer blockiert auf der Membran freie Stellen für eine Proteinbindung mit einem für die Antikörper nicht erkennbaren Protein und verhindert somit unspezifische Bindungen.

Die Proteinbande eines bestimmten Proteins kann auf der Membran durch einen spezifischen primären Antikörper, der an das passende Antigen des Proteins bindet, identifiziert werden. Die folgenden primären Antikörper wurden in der angegebenen Verdünnung eingesetzt:

- PDGF-R- α , #sc-13097, Santa Cruz Bio, 1:800
- PDGF-A (E-10), #sc-9974, Santa Cruz Bio, 1:200
- Mouse tropoelastin, Robert P. Mecham, custom-made, 1:1500
- Fibulin-5 (S20), #sc-23062, Santa Cruz Bio, 1:200
- VEGF-A (147), #sc-507, Santa Cruz Bio, 1:200
- Mouse VEGF-R2/KDR-Flk-1, AF644, R&D, 1:200
- Vascular Endothelial (VE)-Cadherin (H-72), #sc-28644, Santa Cruz Bio, 1:200
- Caspase-3 Rabbit, #9662P, Cell Signaling, 1:500
- Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) (FL-261), #sc-7907, Santa Cruz Bio, 1:500
- β -tubulin, #96125, Cell Signaling, 1:5000

Für jeden eingesetzten primären Antikörper wurde die Membran mit etwa 7 ml verdünnter Antikörperlösung bei 4 °C über Nacht inkubiert. Danach wurde die Membran mit 0,1%iger TBS-T Pufferlösung gewaschen (2 x 15 min, 3 x 5 min).

Der primäre Antikörper wird von einem sekundären Antikörper gebunden, welcher gekoppelt an ein Enzym (z.B. HRP) eine Farb- oder Chemilumineszenzreaktion katalysiert und die Proteinbande sichtbar macht. Die folgenden sekundären Antikörper wurden in 1:5000-facher Verdünnung eingesetzt:

- Goat anti-mouse (Immunglobulin) (Ig) G-HRP, #sc-2060, Santa Cruz Bio
- Goat anti-rabbit IgG-HRP, #sc-2301, Santa Cruz Bio
- Donkey anti-goat IgG HRP, #sc-2020, Santa Cruz Bio
- Goat anti-rabbit IgG-HRP, #7074P2, Cell Signaling

Für jeden eingesetzten sekundären Antikörper wurde die Membran für 1-2 h bei 4 °C mit der Antikörperlösung inkubiert und anschließend in TBS-T Pufferlösung (2 x 15 min, 3 x 5 min) gewaschen.

Um die gesuchte Proteinbande sichtbar zu machen, wurde die Membran mit 2 ml Detektionsreagenz der Enhanced Chemiluminescence (ECL) Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, RPN 2109, München, Deutschland) oder des Kit SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific, #34095, Bonn, Deutschland) mit folgender Verdünnung und Einwirkzeit benetzt:

- ECL (1:1 aus Reagenz 1 und Reagenz 2), 5-10 min
- ECL plus (1:40 aus Reagenz 1 und 2), 1-5 min
- Femto (1:1 aus Reagenz 1 und 2), 1 min

Die Lumineszenz der Proteinbande wurde anschließend durch den BioRad ChemiDoc XRS (BioRad Laboratories, 170-8265, Kalifornien, USA) detektiert und die Quantifizierung der Proteinbande mit Hilfe der in den BioRad ChemiDoc XRS integrierten Software ImageLab 5.0 durchgeführt.

Um die Antigen-Antikörper-Bindungen zu lösen, wurde die Membran mit 4 ml *Stripping* Puffer (Restore Western Blot Stripping Buffer, Thermo Scientific, #21059, Bonn, Deutschland) inkubiert (4 min) und in TBS-T gewaschen (3 x 10 min). Als interne Ladekontrolle diente β -Actin.

2.5 Analysen der mRNA Expression

2.5.1 RNA-Extraktion

Entsprechend der Methode der Proteinextraktion wurde für die RNA-Analyse mit Hilfe des Mikrodismembrators S ein Lungenhomogenisat generiert. Die RNA-Extraktion wurde zunächst nach den Herstellerangaben unter Verwendung des Roti-Quick-Kits (Carl Roth GmbH, #A979.1, Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt. Hierzu wurde das Homogenisat mit 1 ml der Lösung A gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Lysat im Mikrodismembrator ein weiteres Mal bei einer Frequenz von 3000 rpm für 10 sek inkubiert. Danach wurde dem Lysat 1 ml der vorgekühlten Lösung B (Phenol-Chloroform) hinzugefügt und eine homogene Mischung hergestellt. Nach einer Inkubation für 10 min auf Eis wurde das Lysat bei einer Frequenz von 13.000 rpm für 15 min bei 4 °C zentrifugiert, um eine Phasentrennung zu erhalten. Der die Gesamt-RNA enthaltende klare Überstand wurde ohne die Interphase in ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß überführt.

Anschließend wurde das Protokoll des peqlab-Gold Total RNA-Kit (Peqlab, #12-6834-01, Erlangen, Deutschland) nach Angaben des Herstellers zur Auftrennung der RNA verwendet. Diese Methode beruht auf der Verwendung von Säulen, deren adsorptive Membran die RNA bindet. Der klare Überstand wurde zu gleichen Volumenanteilen mit 70 % Ethanol gemischt, die Säule mit 750 µl beladen und bei 10000 rpm für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen und die Säule in ein frisches Sammelgefäß gesetzt, mit 500 µl Waschpuffer 1 gewaschen und für 30 sek zentrifugiert. Der Rest des Volumens (aus Überstand und 70 % Ethanol) wurde hintereinander auf die Säule geladen und der Überstand nach Wasch- und Zentrifugationsschritten erneut verworfen.

Für die Desoxyribonuklease (DNase) Verdauung wurde ein DNase 1 Digestion Reaction Mix bestehend aus 73,5 µl DNA Digestion Buffer und 1,5 µl DNase 1 des peqGOLD DNase Digest Kit (peqlab, #12-1091-01, Erlangen, Deutschland) vorbereitet. Die vorbereitete Lösung wurde direkt auf die Membran der Säule pipettiert und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Auf die Säule wurde 400 µl Waschpuffer 1 gegeben, 5 min inkubiert und bei 10000 rpm für 5 min zentrifugiert. Danach wurde 600 µl Waschpuffer 2 hinzugefügt, bei 10000 rpm für 30 sek zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschschrift wurde wiederholt. Die Säule wurde anschließend in ein neues Sammelgefäß überführt und bei 10000 rpm für 2 min zentrifugiert, um die Säulenmatrix vollständig zu trocknen. Die Säule wurde anschließend in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt, 40 µl Ribonuklease (RNase) - freies destilliertes Wasser direkt auf die Bindungsmatrix pipettiert, 5 min inkubiert und für 1 min bei 5000 rpm zentrifugiert. In diesen Schritten wurde die RNA eluiert und im 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgefangen.

Die RNA Konzentration und Reinheit wurde mithilfe eines Spectrophotometers (NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, I202, Bonn, Deutschland) ermittelt. Die Quantität der isolierten RNA wurde anhand ihrer Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm berechnet. Das Verhältnis der Nukleinsäureabsorption (Absorptionsmaximum 260 nm) und Proteinabsorption (Absorptionsmaximum 280 nm) gibt Auskunft über die Reinheit einer Nukleinsäurelösung. Ein Quotient von $> 1,8$ war Voraussetzung für den Einschluss der Probe.

2.5.2 Komplementäre DNA (cDNA) Synthese

Bei der cDNA Synthese wird die cDNA von der mRNA durch das Enzym Reverse Transkriptase (RT) synthetisiert. Die RT bindet durch einen Primer, einen kurzen komplementären DNA Abschnitt, an die mRNA und synthetisiert einen komplementären DNA Strang bestehend aus Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP). Eine 20 µl (0,5-1 µg)

Verdünnung der RNA Lösung wurde für 10 min bei 70 °C erhitzt, anschließend 5 min auf Eis gestellt und kurz gemischt. Dabei werden Sekundärstrukturen der RNA zerstört. Pro RNA Probe wurde ein Mastermix hergestellt. Der Mastermix bestand aus 4,0 µl 10x Puffer, 8,0 µl MgCl₂ (25 mM), 2,0 µl dNTP's (jeder 10 Millimolar (mM)), 2,0 µl Random Hexamers (50 µM), 1,0 µl RNase-Inhibitor (20 Units (U)/µl), 2,0 µl Reverse Transkriptase (50 U/µl) und 1,0 µl H₂O. Dem Mastermix (20 µl) wurden 20 µl der RNA-Extraktion hinzugefügt. Anschließend erfolgten die folgenden Syntheseschritte der cDNA: 10 min bei 20 °C, 75 min bei 43 °C und 5 min bei 99 °C. Der letzte Schritt dient der Denaturierung der RT. Danach wurde die cDNA auf 4 °C abgekühlt.

2.5.3 Quantitative Real Time Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Real Time PCR ist eine Methode zur relativen Quantifizierung der mRNA Expression spezifischer Gene. Dafür werden nur sehr geringe Mengen RNA benötigt. Für die quantitative Real Time PCR wurden für jede cDNA Reaktion 10 µl Mastermix, 5 µl cDNA (1:5 Verdünnung mit H₂O), 1 µl Primer Mix (0,5 µl Forward Primer, 0,5 µl Reverse Primer, 1:10 Verdünnung) und 4 µl RNase-freies Wasser angesetzt. Um die relative mRNA Expression bestimmter Zielgene zu ermitteln, wurde die PCR Reaktion im 96 "well plate" Format mithilfe des LightCycler 480II (Roche, #28337, Mannheim, Deutschland) und des folgenden Programms durchgeführt: Initiale Aktivierung der Taq-Polymerase für 5 min bei 95 °C und 30 Zyklen, die die Denaturierung für 15 min bei 70 °C, das *Annealing* für 10 min bei 20 °C (variiert je nach Primerpaar), die Elongation für 75 min bei 43 °C und die Deaktivierung der Transkriptase für 5 min bei 99 °C umfassen.

Die verwendeten Primersequenzen sind in der Materialliste im Anhang angegeben. Die Auswertung der Messdaten bzw. der *threshold cycle* (Ct)-Werte erfolgte mit Hilfe der Software des Programms und der im Handbuch gegebenen Analysestandards. Hierbei wurden die Daten nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode ausgewertet, d. h. gegen das „house keeping“-Gen Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) bzw. 18S normalisiert und auf die jeweilige nicht beatmete Kontrolle bezogen.

2.6 Statistische Analyse

Die Ergebnisse sind in dieser Arbeit als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe der Prism 5 Software (Graph Pad, San Diego, Kalifornien) durchgeführt. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz von zwei Gruppen mit Normalverteilung wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt, während bei nicht normaler Verteilung zweier Gruppen der nicht parametrische Mann-Whitney Test angewandt wurde. Um die WT und PDGF-R $\alpha^{+/-}$ Mäuse der Kontroll- und Beatmungsgruppen miteinander zu vergleichen, wurden die zweifaktorielle Varianzanalyse (two-way ANOVA), bei der die Effekte zweier unabhängiger Größen auf eine abhängige Variable untersucht werden, sowie der Bonferroni post-hoc Test durchgeführt. Statistische Unterschiede wurden bei $p < 0,05$ als statistisch signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

Diese Arbeit hatte zum Ziel, das Verständnis zu den molekularen Mechanismen der neonatalen chronischen Lungenerkrankung zu vertiefen. Es wurde untersucht, welchen Effekt eine reduzierte PDGF-R α Expression auf die Entwicklung BPD-charakteristischer Veränderungen in der neonatalen Lunge unter dem Einfluss der MV-O₂ hat. Hierzu wurde ein murines Beatmungsmodell unter Verwendung transgener Tiere mit PDGF-R α Haploinsuffizienz verwendet, in dem 5 - 7 Tage alte neugeborene Mäuse mit 40 % Sauerstoff und 180 Atemzügen pro min über einen Zeitraum von 8 h beatmet wurden.

3.1 Qualitätssicherung

Das durchschnittliche Körpergewicht der Mäuse war in den verschiedenen Gruppen nicht signifikant unterschiedlich (WT Kontrollgruppe $3,9 \pm 0,5$ g KG; WT Beatmungsgruppe $4,0 \pm 0,5$ g KG; PDGF-R $\alpha^{+/-}$ Kontrollgruppe $4,0 \pm 0,8$ g KG; PDGF-R $\alpha^{+/-}$ Beatmungsgruppe $4,1 \pm 0,6$ g KG, jeweils Mittelwert und SD).

Auch die Beatmungskonditionen in dieser Studie wiesen keine signifikanten Unterschiede auf. Die verwendeten Tidalvolumina der mechanischen Beatmung waren in der WT und PDGF-R $\alpha^{+/-}$ Gruppe nicht signifikant unterschiedlich (WT Beatmungsgruppe $9,05 \pm 2,63$ μ l/g; PDGF-R $\alpha^{+/-}$ Beatmungsgruppe $8,32 \pm 0,52$ μ l/g, jeweils Mittelwert und SD). Die Messung des Lungenvolumens ergab für die Mäuse der verschiedenen Gruppen keinen signifikanten Unterschied (WT Kontrollgruppe $55,3 \pm 7,0$ μ l/g KG; WT Beatmungsgruppe $56,2 \pm 14,2$ μ l/g KG; PDGF-R $\alpha^{+/-}$ Kontrollgruppe $59,7 \pm 11,9$ μ l/g KG; PDGF-R $\alpha^{+/-}$ Beatmungsgruppe $57,6 \pm 23,7$ μ l/g KG; jeweils Mittelwert und SD) (Abb. 9A).

Die Quantifizierung des Anteils der atelektatischen Lungenbezirke ergab einen signifikant erhöhten Anteil der atelektatischen Lungenbezirke in den Lungen von Mäusen aus der WT und PDGF-R $\alpha^{+/-}$ Beatmungsgruppe im Vergleich zu Lungen von Mäusen aus der WT und PDGF-R $\alpha^{+/-}$ Kontrollgruppe, aber keinen signifikanten Unterschied zwischen den Mäusen nach MV-O₂ (Abb. 9B).

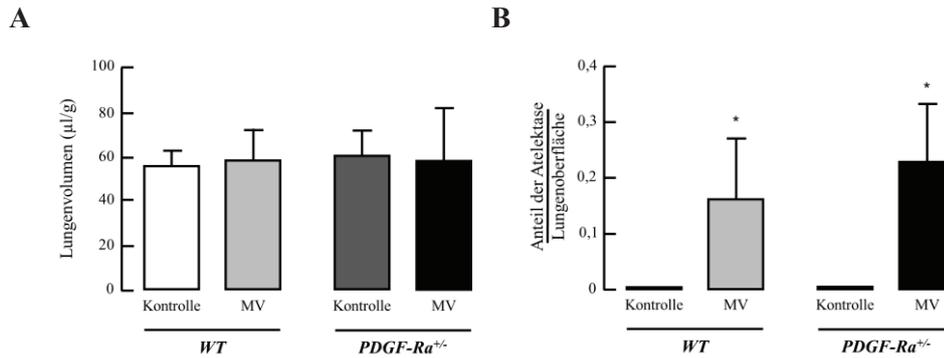


Abb. 9: Lungenvolumen und Anteil der atelektatischen Lungenbezirke in den Lungen der Mäuse aller Gruppen.

(A) Lungenvolumen von Mäusen der WT Kontrollgruppe, WT Beatmungsgruppe, PDGF-Rα^{+/-} Kontrollgruppe und PDGF-Rα^{+/-} Beatmungsgruppe, n.s., n = 6 - 12 / Gruppe, Mittelwert und SD.

(B) Anteil der atelektatischen Lungenbezirke in Lungen von Mäusen aus der WT Kontrollgruppe, WT Beatmungsgruppe, PDGF-Rα^{+/-} Kontrollgruppe und PDGF-Rα^{+/-} Beatmungsgruppe, *p < 0,05, n = 3 - 7 / Gruppe, Mittelwert und SD.

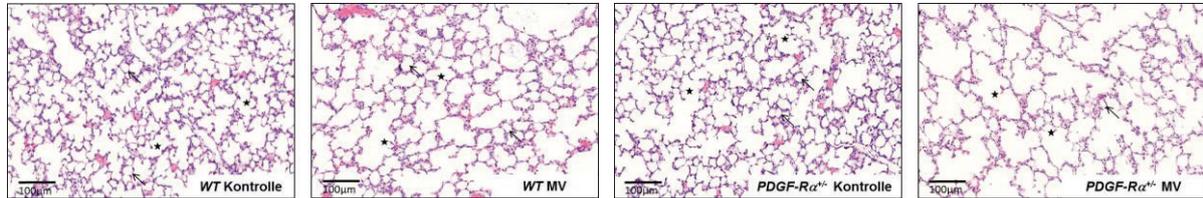
3.2 Schädigung der Alveolenstruktur in den Lungen von neonatalen PDGF-Rα^{+/-} Mäusen unter dem Einfluss der MV-O₂

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zunächst der Effekt der PDGF-Rα Haploinsuffizienz unter dem Einfluss der MV-O₂ auf die strukturellen Veränderungen in der neonatalen Mauslunge untersucht. Die Abbildung 10A zeigt repräsentative Gewebeschnitte der Tiere aller Gruppen nach HE Färbung in 200-facher Vergrößerung. Die Gewebeschnitte der Mäuse aus beiden Kontrollgruppen zeigen die aus den Sacculi alveolares hervorgehenden primären Septen, aus denen erste sekundäre Septen hervorgehen, die die Ausgangsstruktur für die Alveolen bilden. Die sekundären Septen sind in den Gewebeschnitten der Abbildung durch Sterne gekennzeichnet. Die Pfeile markieren einige vollständig ausgebildete Alveolen. Der Vergleich der Gewebeschnitte von Mäusen aus der WT Kontrollgruppe und Mäusen aus der WT Beatmungsgruppe zeigt eine reduzierte Alveolenzahl und eine größere Alveolenfläche in den Gewebeschnitten von Mäusen aus der WT Beatmungsgruppe. Im Vergleich der Gewebeschnitte von Mäusen aus der PDGF-Rα^{+/-} Kontrollgruppe und Mäusen aus der PDGF-Rα^{+/-} Beatmungsgruppe zeigen sich deutlich erweiterte Sacculi alveolares, eine größere Alveolenfläche, ein fast vollständiges Fehlen der Septen sowie eine reduzierte Alveolenzahl in den Gewebeschnitten von Mäusen aus der PDGF-Rα^{+/-} Beatmungsgruppe.

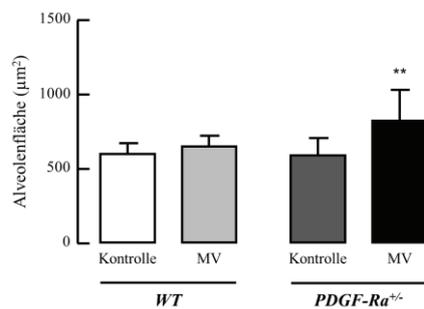
Die Quantifizierung der Alveolenfläche und der Alveolenzahl in vier repräsentativen Gewebeschnitten der Tiere aller Gruppen ergab eine signifikante Zunahme der Alveolenfläche (Abb. 10B), signifikante Abnahme der Alveolenzahl (Abb. 10C) sowie eine

signifikant reduzierte Septenzahl (Abb. 10D) in den Lungen der neonatalen PDGF-R α ^{+/-} Mäuse nach MV-O₂ im Vergleich zu den Lungen der neonatalen WT Mäuse nach MV-O₂.

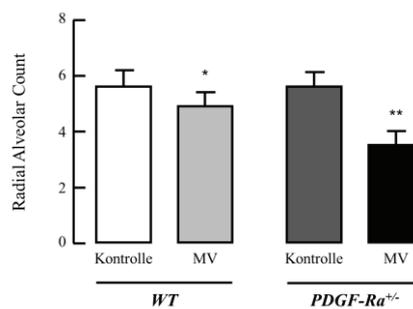
A



B



C



D

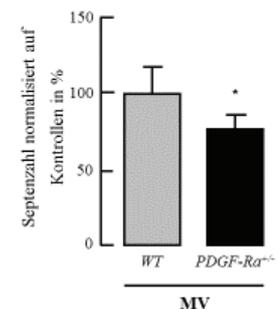


Abb. 10: Lungenstruktur in neonatalen PDGF-R α ^{+/-} Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen nach mechanischer Beatmung.

(A) Repräsentativer Gewebeschnitt einer 5-7 Tage alten Maus aus der WT Kontrollgruppe, WT Beatmungsgruppe, PDGF-R α ^{+/-} Kontrollgruppe und PDGF-R α ^{+/-} Beatmungsgruppe nach HE Färbung in 200-facher Vergrößerung. Die Pfeile markieren die Alveolen. Die Sterne kennzeichnen die sekundären Septen, die die Ausgangsstruktur für die Alveolen bilden.

(B) Alveolenfläche in Gewebeschnitten von Mäusen aus der WT Kontrollgruppe, WT Beatmungsgruppe, PDGF-R α ^{+/-} Kontrollgruppe und PDGF-R α ^{+/-} Beatmungsgruppe, signifikanter Unterschied zwischen Gruppen, **p < 0,01, n = 6 - 11 / Gruppe, Mittelwert und SD.

(C) Alveolenzahl, Radial Alveolar Count, in Gewebeschnitten von Mäusen aus der WT Kontrollgruppe, WT Beatmungsgruppe, PDGF-R α ^{+/-} Kontrollgruppe und PDGF-R α ^{+/-} Beatmungsgruppe, signifikanter Unterschied zwischen Gruppen, *p < 0,05, **p < 0,01, n = 6 - 11 / Gruppe, Mittelwert und SD.

(D) Septenzahl in Gewebeschnitten von Mäusen aus der WT Beatmungsgruppe und PDGF-R α ^{+/-} Beatmungsgruppe, signifikanter Unterschied zwischen Gruppen, *p < 0,05, n = 6 - 10 / Gruppe, Mittelwert und SD.

3.3 Veränderte Anordnung der pulmonalen Elastinfasern in den Lungen von beatmeten neonatalen PDGF-R α ^{+/-} Mäusen

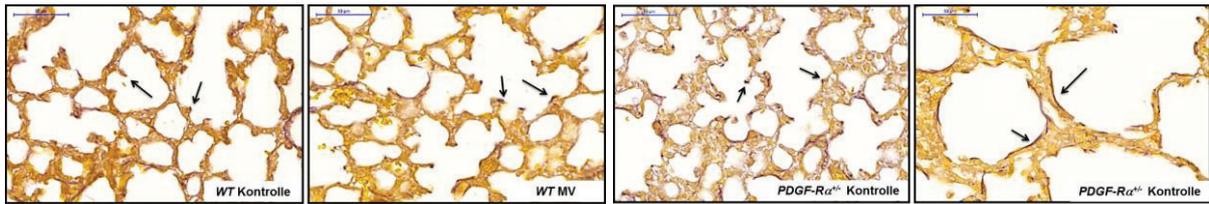
Da Veränderungen der Alveolenstruktur in Studien der BPD mit Veränderungen der Anordnung der Elastinfasern und Elastin Produktion einhergehen (23), wurde die Elastin Färbung nach HART zur Färbung der murenen Elastinfasern an PFA fixierten histologischen Schnitten von Mäusen der Kontroll- und Beatmungsgruppen sowie Immunoblot Analysen zur

Quantifizierung der Tropoelastin und Fibulin-5 Expression durchgeführt. Fibulin-5 ist ein Protein der extrazellulären Matrix und spielt eine wichtige Rolle für die Elastinsynthese.

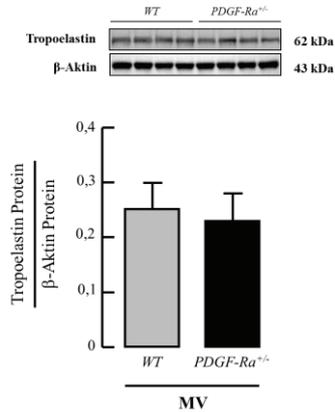
Die vier repräsentativen Gewebeschnitte der Tiere aller Gruppen nach Elastin Färbung (Abb. 11A) zeigen, dass die Elastinfasern in den Lungen der WT und PDGF-R $\alpha^{+/-}$ Kontrollmäuse sowie in den Lungen der WT Mäuse nach MV-O₂ an den Spitzen der sekundären Septen lokalisiert sind, während sie in den Lungen der Mäuse aus der PDGF-R $\alpha^{+/-}$ Beatmungsgruppe eher im Bereich der alveolären Wand identifiziert werden können.

Die Proteinexpression des Tropoelastins sowie der Anteil des Elastins am interstitiellen Gewebe der Lunge war im Vergleich der Lungen von Mäusen aus der WT Beatmungsgruppe und PDGF-R $\alpha^{+/-}$ Beatmungsgruppe, im Vergleich der Lungen von Mäusen aus der WT Kontrollgruppe und WT Beatmungsgruppe und im Vergleich der Lungen von Mäusen aus der PDGF-R $\alpha^{+/-}$ Kontrollgruppe und PDGF-R $\alpha^{+/-}$ Beatmungsgruppe nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 11B-E). Ebenso war die Expression des Fibulin-5 im Vergleich der Lungen von Mäusen aus der WT Beatmungsgruppe und Mäusen aus der PDGF-R $\alpha^{+/-}$ Beatmungsgruppe nicht signifikant verändert (Abb. 11F).

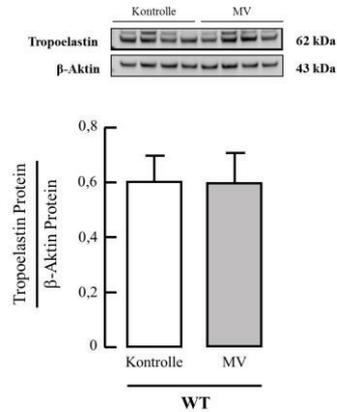
A



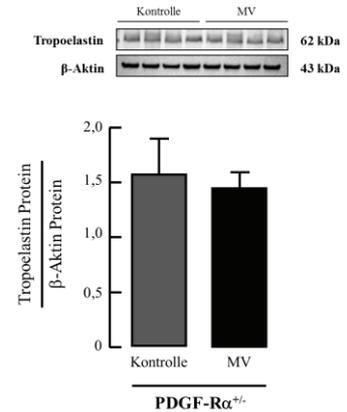
B



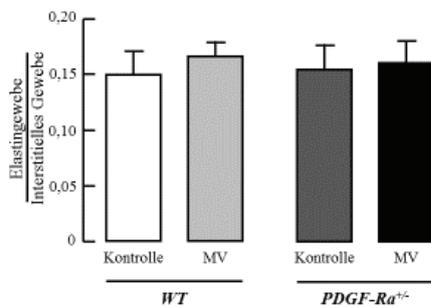
C



D



E



F

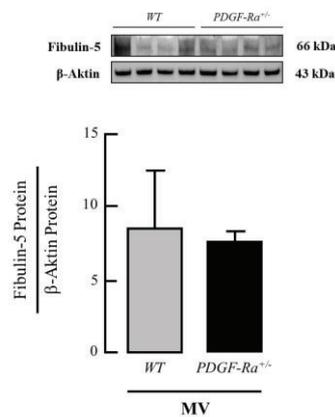


Abb. 11: Untersuchung der Anordnung der pulmonalen Elastinfasern und Elastinproduktion in Lungen von Mäusen der PDGF-Rα^{+/-} Beatmungsgruppe.

(A) Repräsentativer Gewebeschnitt einer Maus aus der WT Kontrollgruppe, WT Beatmungsgruppe, PDGF-Rα^{+/-} Kontrollgruppe und PDGF-Rα^{+/-} Beatmungsgruppe nach Elastin Färbung nach HART in 400-facher Vergrößerung, n = 4 - 8 / Gruppe. Die schwarzen Pfeile markieren die Elastinfasern in den Gewebeschnitten.

(B) Tropoelastin Expression in Lungen von Mäusen aus der WT Beatmungsgruppe im Vergleich zu Lungen von Mäusen aus der PDGF-Rα^{+/-} Beatmungsgruppe, n.s., n = 4 / Gruppe, Mittelwert und SD.

(C) Tropoelastin Expression in Lungen von Mäusen aus der WT Kontrollgruppe im Vergleich zu Lungen von Mäusen aus der WT Beatmungsgruppe, n.s., n = 4 / Gruppe, Mittelwert und SD.

(D) Tropoelastin Expression in Lungen von Mäusen aus der PDGF-Rα^{+/-} Kontrollgruppe im Vergleich zu Lungen von Mäusen aus der PDGF-Rα^{+/-} Beatmungsgruppe, n.s., n = 4 / Gruppe, Mittelwert und SD.

(E) Anteil des Elastins am interstitiellen Gewebe der Lunge in Lungen von Mäusen aus der WT Kontrollgruppe, WT Beatmungsgruppe, PDGF-R α ^{+/-} Kontrollgruppe und PDGF-R α ^{+/-} Beatmungsgruppe, n.s., n = 4 - 8 / Gruppe, Mittelwert und SD.

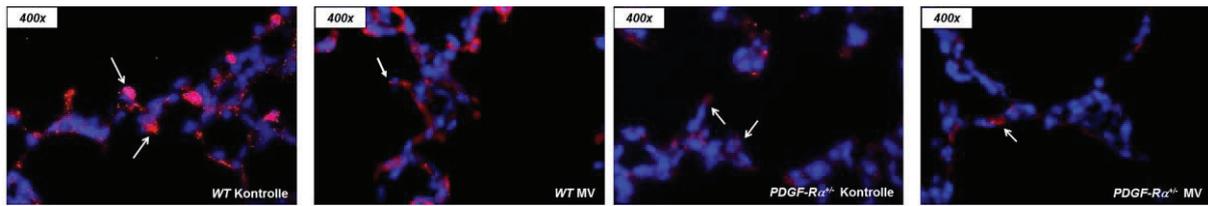
(F) Fibulin-5 Expression in Lungen von Mäusen aus der WT Beatmungsgruppe und PDGF-R α ^{+/-} Beatmungsgruppe, n.s., n = 4 / Gruppe, Mittelwert und SD.

3.4 Veränderte Verteilung und reduzierte Zahl PDGF-R α positiver Zellen in den Lungen von PDGF-R α ^{+/-} Mäusen

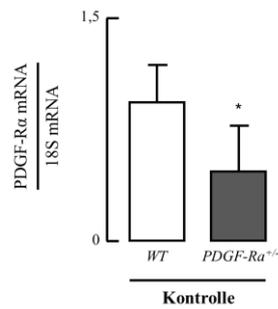
Zur Darstellung der PDGF-R α positiven Zellen, die im Rahmen der Lungenentwicklung an den Spitzen der sekundären Septen sitzen und über PDGF-R α /PDGF-A Signaltransduktionswege die Septenbildung und Elastinproduktion anregen (62, 71, 92), wurde die Immunfluoreszenzfärbung mit PDGF-R α / α -SMA/DAPI durchgeführt. Die Abbildung 12A zeigt repräsentative Gewebeschnitte der Tiere aller Gruppen. Die PDGF-R α positiven Zellen sind in den Gewebeschnitten der Mäuse aus der WT Kontrollgruppe und WT Beatmungsgruppe vor allem an den Spitzen der sekundären Septen lokalisiert, während sie in den Gewebeschnitten der Mäuse aus der PDGF-R α ^{+/-} Kontrollgruppe und PDGF-R α ^{+/-} Beatmungsgruppe in reduzierter Zahl und primär im Interstitium der Alveolarwände dargestellt werden können. Die Expression des PDGF-R α war im Lungengewebe der Mäuse aus der PDGF-R α ^{+/-} Kontrollgruppe in der Analyse der mRNA und Proteinexpression signifikant reduziert (Abb. 12B und 12C).

Die Proteinexpression des PDGF-A war in den Lungen von Mäusen aus der PDGF-R α ^{+/-} Beatmungsgruppe im Vergleich zu Lungen von Mäusen aus der WT Beatmungsgruppe (Abb. 12D), in den Lungen von Mäusen aus der PDGF-R α ^{+/-} Kontrollgruppe im Vergleich zu Lungen von Mäusen aus der WT Kontrollgruppe (Abb. 12E), in den Lungen von Mäusen aus der WT Kontroll- und Beatmungsgruppe (Abb. 12F) sowie im Vergleich der Lungen von Mäusen aus der PDGF-R α ^{+/-} Kontroll- und Beatmungsgruppe nicht signifikant verändert (Abb. 12G).

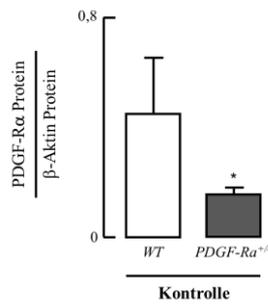
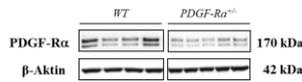
A



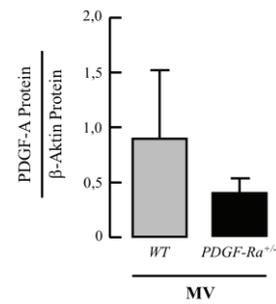
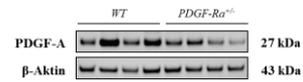
B



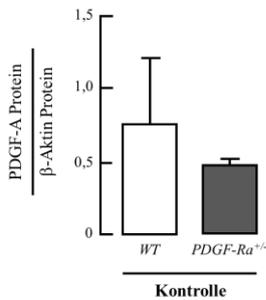
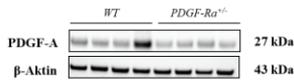
C



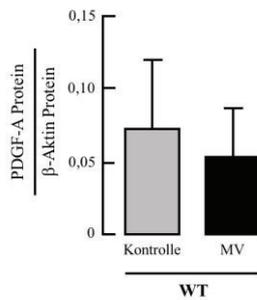
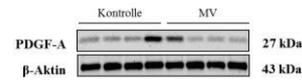
D



E



F



G

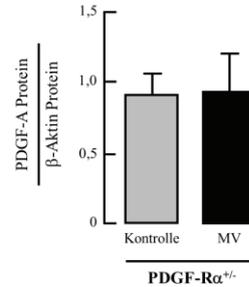
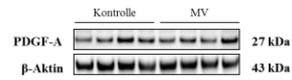


Abb. 12: Verteilung und Zahl PDGF-Rα positiver Zellen sowie PDGF-Rα/PDGF-A Expression in Lungen von PDGF-Rα^{+/-} Mäusen.

(A) Repräsentativer Gewebeschnitt einer Maus aus der WT Kontrollgruppe, WT Beatmungsgruppe, PDGF-Rα^{+/-} Kontrollgruppe und PDGF-Rα^{+/-} Beatmungsgruppe nach Immunfluoreszenzfärbung mit PDGF-Rα (rot) und DAPI (blau) in 400-facher Vergrößerung. Die Pfeile markieren die Lokalisation der PDGF-Rα positiven Zellen, n = 4 - 8 / Gruppe.

(B) mRNA Expression des PDGF-Rα in Lungen von Mäusen aus der WT Kontrollgruppe und Lungen von Mäusen aus der PDGF-Rα^{+/-} Kontrollgruppe, signifikanter Unterschied zwischen Gruppen, *p < 0,05, n = 4 - 5 / Gruppe, Mittelwert und SD.

(C) Proteinexpression des PDGF-Rα in Lungen von Mäusen aus der WT Kontrollgruppe und Lungen von Mäusen aus der PDGF-Rα^{+/-} Kontrollgruppe, signifikanter Unterschied zwischen Gruppen, *p < 0,05, n = 4 - 5 / Gruppe, Mittelwert und SD.

- (D) Proteinexpression des PDGF-A in Lungen von Mäusen aus der WT Beatmungsgruppe im Vergleich zu Lungen von Mäusen aus der PDGF-R $\alpha^{+/-}$ Beatmungsgruppe, n.s, n = 4 / Gruppe, Mittelwert und SD.
- (E) Proteinexpression des PDGF-A in Lungen von Mäusen aus der WT Kontrollgruppe im Vergleich zu Lungen von Mäusen aus der PDGF-R $\alpha^{+/-}$ Kontrollgruppe, n.s, n = 4 / Gruppe, Mittelwert und SD.
- (F) Proteinexpression des PDGF-A in Lungen von Mäusen aus der WT Kontrollgruppe im Vergleich zu Lungen von Mäusen aus der WT Beatmungsgruppe, n.s, n = 4 / Gruppe, Mittelwert und SD.
- (G) Proteinexpression des PDGF-A in Lungen von Mäusen aus der PDGF-R $\alpha^{+/-}$ Kontrollgruppe im Vergleich zu Lungen von Mäusen aus der PDGF-R $\alpha^{+/-}$ Beatmungsgruppe, n.s, n = 4 / Gruppe, Mittelwert und SD.

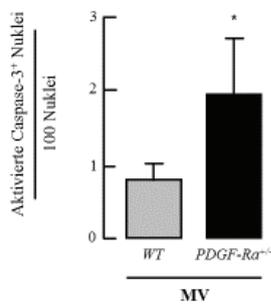
3.5 Erhöhte Apoptose in den Lungen von beatmeten neonatalen PDGF-R $\alpha^{+/-}$ Mäusen

BPD-typische, strukturelle pulmonale Veränderungen wurden in verschiedenen Studien mit einer erhöhten Apoptoserate assoziiert (28). Folglich wurde untersucht, ob die histologischen Veränderungen in beatmeten neonatalen PDGF-R $\alpha^{+/-}$ Mäusen mit einer erhöhten Apoptoserate in der distalen Lunge assoziiert sind. Zur Untersuchung der Apoptose kamen zwei Methoden zur Anwendung: Die Immunfluoreszenzfärbung mit aktivierter Caspase-3 zur Quantifizierung des Anteils der aktivierten Caspase-3 positiven Nuklei an der Gesamtanzahl der Nuklei und die Quantifizierung der Expression der aktivierten Caspase-3 auf Proteinebene.

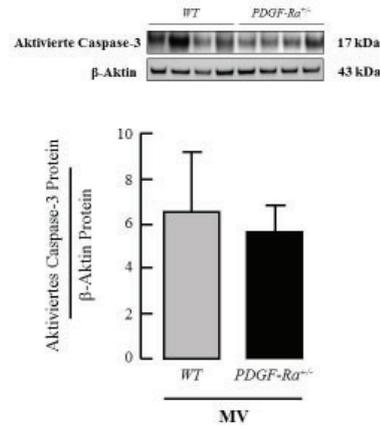
Die Quantifizierung der Immunfluoreszenzfärbung mit aktivierter Caspase-3 ergab einen signifikant höheren Anteil der aktivierten Caspase-3 positiven Nuklei in den Lungen von Mäusen aus der PDGF-R $\alpha^{+/-}$ Beatmungsgruppe im Vergleich zu den Lungen von Mäusen aus der WT Beatmungsgruppe (Abb. 13A). Die Proteinexpression der aktivierten Caspase-3 war im Vergleich zwischen Lungen von Mäusen aus der PDGF-R $\alpha^{+/-}$ Beatmungsgruppe und Lungen von Mäusen aus der WT Beatmungsgruppe nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 13B).

Um zu prüfen, ob größere strukturelle pulmonale Veränderungen in den PDGF-R $\alpha^{+/-}$ Mäusen mit einer veränderten Proliferationsrate von Zellen zusammenhängen, wurde die Proteinexpression des PCNA als Marker der Proliferationsrate in den Lungen der Tiere aller Gruppen untersucht. Die Proteinexpression des PCNA war in den Lungen von Mäusen aus der WT Beatmungsgruppe im Vergleich zu den Lungen von Mäusen aus der PDGF-R $\alpha^{+/-}$ Beatmungsgruppe nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 13C).

A



B



C

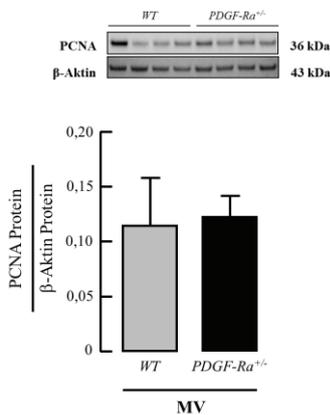


Abb. 13: Untersuchung der Apoptose und Proliferation in den Lungen von beatmeten PDGF-Rα^{+/-} Mäusen.

(A) Anteil der aktivierten Caspase-3 positiven Nuklei pro 100 Nuklei in Lungen von Mäusen der WT Beatmungsgruppe und Lungen von Mäusen der PDGF-Rα^{+/-} Beatmungsgruppe, signifikanter Unterschied zwischen Gruppen, * $p < 0,05$, $n = 4 - 5$ / Gruppe, Mittelwert und SD.

(B) Proteinexpression der aktivierten Caspase-3 in Lungen von beatmeten WT Mäusen und Lungen von beatmeten PDGF-Rα^{+/-} Mäusen, n.s., $n = 4$ / Gruppe, Mittelwert und SD.

(C) Proteinexpression des PCNA in Lungen von Mäusen der WT Beatmungsgruppe und Lungen von Mäusen der PDGF-Rα^{+/-} Beatmungsgruppe, n.s., $n = 4$ / Gruppe, Mittelwert und SD.

3.6 Erhöhte Apoptoserate endothelialer Zellen und reduzierte Mikrogefäßzahl in den Lungen von beatmeten neonatalen PDGF-Rα^{+/-} Mäusen

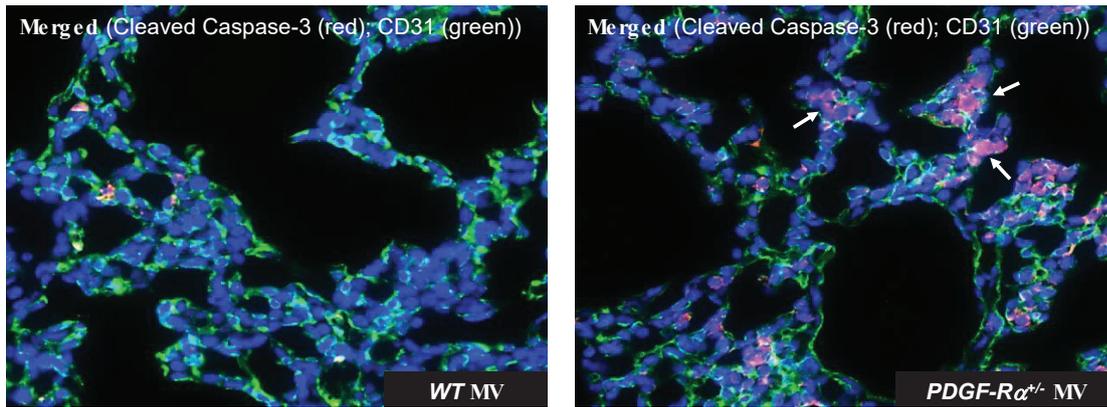
Zur Spezifizierung der Zellart, die in der beatmeten Lunge apoptotischen Prozessen unterliegt, wurde die Immunfluoreszenzfärbung mit aktivierter Caspase-3 und CD31 durchgeführt. Repräsentative Gewebeschnitte der Tiere aus den Beatmungsgruppen sind in Abb. 14A dargestellt. Die Quantifizierung ergab eine signifikant höhere Zahl der aktivierten

Caspase-3 positiven und CD31 positiven Nuklei in den Lungen von beatmeten PDGF-R $\alpha^{+/-}$ Mäusen im Vergleich zu den Lungen von beatmeten WT Mäusen (Abb. 14B). Dieses Ergebnis indiziert eine höhere Apoptose der CD31 positiven Endothelzellen in Lungen von beatmeten PDGF-R $\alpha^{+/-}$ Mäusen im Vergleich zu Lungen von beatmeten WT Mäusen. Im Einklang damit war die signifikant reduzierte Mikrogefäßzahl zwischen 20-100 μ m in Lungen von beatmeten PDGF-R $\alpha^{+/-}$ Mäusen im Vergleich zu Lungen von beatmeten WT Mäusen (Abb. 14C).

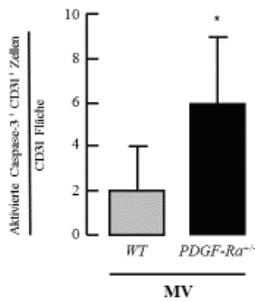
Diese Ergebnisse wurden von Analysen der Protein- und mRNA Expression des Gefäß- und Endothelzellmarkers VE-Cadherin unterstützt, da die Expression des VE-Cadherin in den Lungen von Mäusen aus der PDGF-R $\alpha^{+/-}$ Beatmungsgruppe im Vergleich zu den Lungen von Mäusen aus der WT Beatmungsgruppe signifikant reduziert war (Abb. 14D und 14E).

Da zum einen die pulmonale Gefäßentwicklung wesentlich durch die VEGF-A/VEGF-R2 Signaltransduktion gesteuert wird und zum anderen eine dysregulierte Expression von Wachstumsfaktoren wie VEGF zu den entscheidenden Pathomechanismen der BPD zählt (76, 93), wurde in einem zweiten Schritt die Expression des VEGF-A und VEGF-R2 untersucht. Die Auswertungen ergaben, dass die VEGF-A und VEGF-R2 Expression entsprechend der VE-Cadherin-Expression in den Lungen von Mäusen aus der PDGF-R $\alpha^{+/-}$ Beatmungsgruppe im Vergleich zu den Lungen von Mäusen aus der WT Beatmungsgruppe (Abb. 14F, 14H und 14I) signifikant reduziert war. Die Proteinexpression des VEGF-A war in den Lungen von Mäusen der Kontrollgruppen nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 14G).

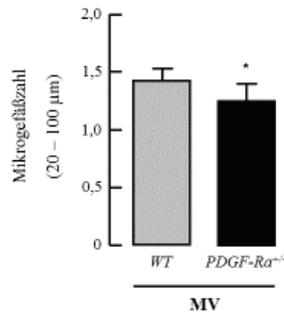
A



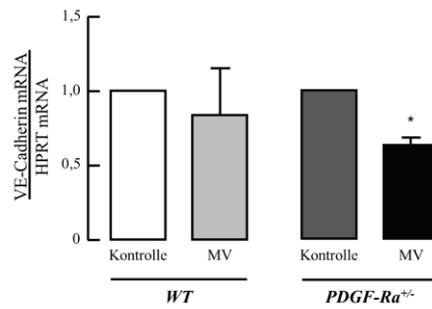
B



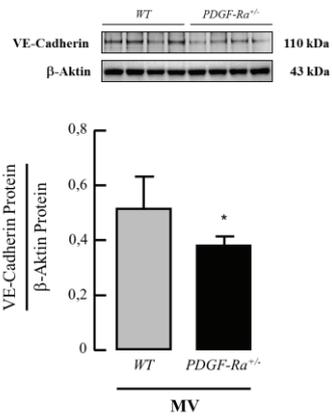
C



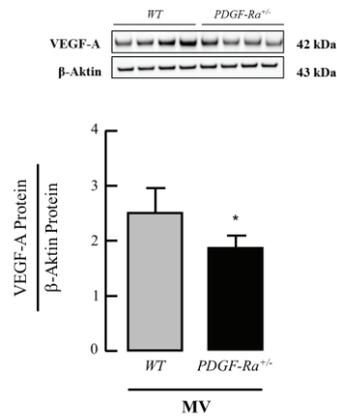
D



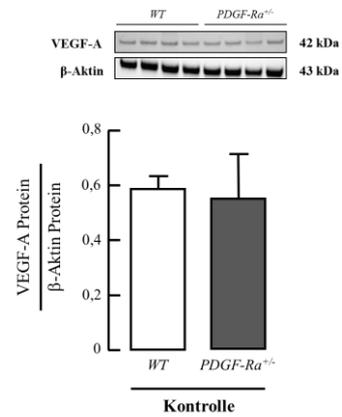
E



F



G



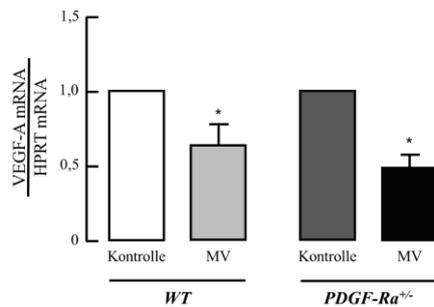
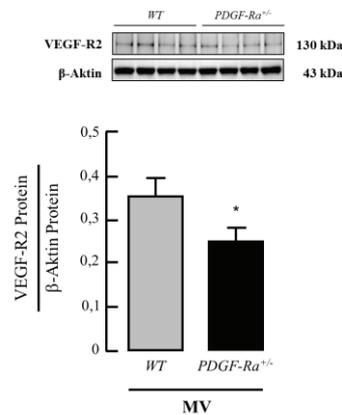
H**I**

Abb. 14: Apoptoserate endothelialer Zellen, Mikrogefäßzahl und Expression von VE-Cadherin, VEGF-A und VEGF-R2 in den Lungen von beatmeten neonatalen PDGF-Rα^{+/-} Mäusen.

(A) Repräsentativer Gewebeschnitt einer Maus aus der WT Beatmungsgruppe und einer Maus aus der PDGF-Rα^{+/-} Beatmungsgruppe nach Immunfluoreszenzfärbung mit aktivierter Caspase-3 (rosa), CD31 (grün), DAPI (blau) in 400-facher Vergrößerung. Die Pfeile markieren die aktivierten Caspase-3 positiven Nuklei, n = 5 / Gruppe.

(B) Aktivierte Caspase-3 positive CD31 positive Nuklei/CD31 Fläche in Lungen von Mäusen aus der WT Beatmungsgruppe im Vergleich zu Lungen von Mäusen der PDGF-Rα^{+/-} Beatmungsgruppe, signifikanter Unterschied zwischen Gruppen, *p < 0,05, n = 4 - 5 / Gruppe, Mittelwert und SD.

(C) Mikrogefäßzahl (20 – 100 μm) in Lungen von Mäusen aus der WT Beatmungsgruppe im Vergleich zu Lungen von Mäusen aus der PDGF-Rα^{+/-} Beatmungsgruppe, signifikanter Unterschied zwischen Gruppen, *p < 0,05, n = 6 - 8 / Gruppe, Mittelwert und SD.

(D) mRNA Expression des VE-Cadherin in Lungen von Mäusen aus der WT Beatmungsgruppe im Vergleich zu Lungen von Mäusen aus der PDGF-Rα^{+/-} Beatmungsgruppe, signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen, *p < 0,05, n = 3 - 4 / Gruppe, Mittelwert und SD.

(E) Proteinexpression des VE-Cadherin in Lungen von Mäusen aus der WT Beatmungsgruppe im Vergleich zu Lungen von Mäusen aus der PDGF-Rα^{+/-} Beatmungsgruppe, signifikanter Unterschied zwischen Gruppen, *p < 0,05, n = 4 / Gruppe, Mittelwert und SD.

(F) Proteinexpression des VEGF-A in Lungen von Mäusen aus der WT Beatmungsgruppe im Vergleich zu Lungen von Mäusen aus der PDGF-Rα^{+/-} Beatmungsgruppe, signifikanter Unterschied zwischen Gruppen, *p < 0,05, n = 4 / Gruppe, Mittelwert und SD.

(G) Proteinexpression des VEGF-A in Lungen von Mäusen aus der WT und PDGF-Rα^{+/-} Kontrollgruppe, n.s., n = 4 / Gruppe, Mittelwert und SD.

(H) mRNA Expression des VEGF-A in Lungen von Mäusen der WT Kontrollgruppe, WT Beatmungsgruppe, PDGF-Rα^{+/-} Kontrollgruppe und PDGF-Rα^{+/-} Beatmungsgruppe, signifikanter Unterschied zwischen Gruppen, *p < 0,05, n = 3 - 4 / Gruppe, Mittelwert und SD.

(I) Proteinexpression des VEGF-R2 in Lungen von Mäusen der WT Beatmungsgruppe im Vergleich zu Lungen von Mäusen der PDGF-Rα^{+/-} Beatmungsgruppe, signifikanter Unterschied zwischen Gruppen, *p < 0,05, n = 3 - 4 / Gruppe, Mittelwert und SD.

3.7 Unveränderte Zahl inflammatorischer Zellen in den Lungen von beatmeten WT und PDGF-R α ^{+/-} Mäusen

Experimentelle und klinische Studien zur Pathogenese der BPD haben gezeigt, dass inflammatorische Prozesse eine wichtige Rolle spielen (86, 94, 95). Somit wurde in unserem Modell untersucht, ob die MV-O₂ zu einem Einstrom inflammatorischer Zellen in die Lungen der WT und PDGF-R α ^{+/-} Mäuse führt.

Durch die immunhistochemische Färbung mit Ly-6G wurden Neutrophile Granulozyten in den Gewebeschnitten angefärbt. Die Quantifizierung dieser Färbung zeigte, dass sich die Zahl der Ly6G positiven Neutrophilen Granulozyten in den Lungen von Mäusen aus der WT Beatmungsgruppe nicht signifikant von der Zahl in den Lungen von Mäusen aus der PDGF-R α ^{+/-} Beatmungsgruppe unterscheidet (Abb. 15A). Durch die immunhistochemische Färbung mit F4/80 wurden Makrophagen und Monozyten in den Lungenschnitten angefärbt. Die Quantifizierung dieser Färbung ergab eine signifikant höhere Zahl von F4/80 positiven Zellen in den Lungen von Mäusen aus der WT Beatmungsgruppe und in den Lungen von Mäusen aus der PDGF-R α ^{+/-} Beatmungsgruppe im Vergleich zu den Lungen der Mäuse aus den Kontrollgruppen. Die Zahl der F4/80 positiven Zellen war in den Lungen der Mäuse aus der WT Beatmungsgruppe im Vergleich zu der Zahl in den Lungen der Mäuse aus der PDGF-R α ^{+/-} Beatmungsgruppe allerdings nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 15B). Die Ly6G positiven Neutrophilen Granulozyten wurden primär in den Gefäßwänden und im Interstitium lokalisiert, während die F4/80 positiven Monozyten primär im Alveolarraum identifiziert werden konnten. Die Quantifizierung der Immunfluoreszenzfärbung mit Galectin-3, welches als Oberflächenmarker für inflammatorische Zellen gilt, war im Vergleich der Tiere aller Gruppen nicht signifikant unterschiedlich (Abb 15C).

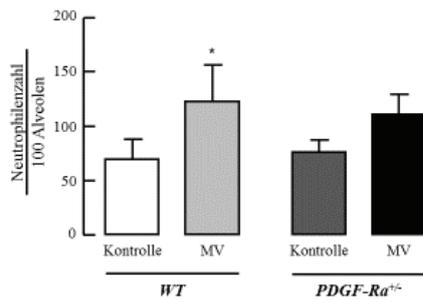
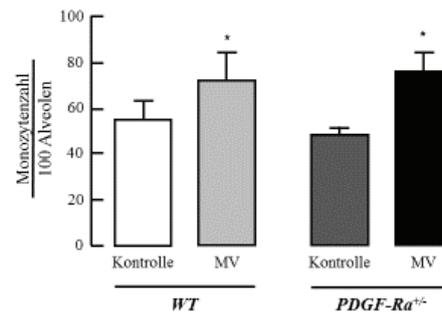
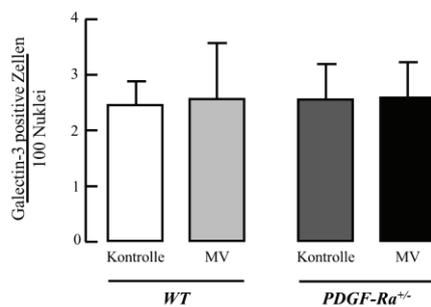
A**B****C**

Abb. 15: Zahl der inflammatorischen Zellen in den Lungen von beatmeten PDGF-Rα^{+/-} Mäusen im Vergleich zu Lungen von beatmeten WT Mäusen.

(A) Zahl der Ly6G positiven Neutrophilen pro 100 Alveolen in Lungen von Mäusen aus der WT Kontrollgruppe, WT Beatmungsgruppe, PDGF-Rα^{+/-} Kontrollgruppe und PDGF-Rα^{+/-} Beatmungsgruppe, signifikanter Unterschied zwischen Gruppen, *p<0,05, n = 3 – 4 / Gruppe, Mittelwert und SD.

(B) Zahl der F4/80 positiven Zellen pro 100 Alveolen in Lungen von Mäusen aus der WT Kontrollgruppe, WT Beatmungsgruppe, PDGF-Rα^{+/-} Kontrollgruppe und PDGF-Rα^{+/-} Beatmungsgruppe, signifikanter Unterschied zwischen Gruppen, *p<0,05, n = 2 – 4 / Gruppe, Mittelwert und SD.

(C) Zahl der Galectin-3 positiven Zellen pro 100 Nuklei in Lungen von Mäusen aus der WT Kontrollgruppe, WT Beatmungsgruppe, PDGF-Rα^{+/-} Kontrollgruppe und PDGF-Rα^{+/-} Beatmungsgruppe, n.s., 4 – 8 / Gruppe, Mittelwert und SD.

4 Diskussion

Die BPD ist die chronische Lungenerkrankung des Früh- und reifen Neugeborenen, die durch die postnatale Applikation von Sauerstoff und mechanischer Beatmung entsteht. Aufgrund ihrer Langzeitfolgen ist die Erkrankung von großer klinischer Relevanz. Wesentliche Merkmale der BPD sind die Störung der Alveolo- und Vaskulogenese.

Durch klinische und experimentelle Studien konnte die kritische Rolle spezifischer Zelltypen und ihrer Signaltransduktionswege für die Entstehung der Alveolo- und Vaskulogenese etabliert werden. So konnte gezeigt werden, dass PDGF-R α exprimierende Zellen an den Spitzen der sekundären Septen (92) entscheidend am Prozess der alveolären Septierung beteiligt sind. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung zeigten Mäuse mit einer homozygoten Deletion des PDGF-A eine Störung der alveolären Septierung (62), die auf die fehlende durch die PDGF-R α /PDGF-A Signaltransduktion gesteuerte Migration und Proliferation der PDGF-R α positiven Zellen zurückgeführt wurde (92). Auch die frühe und kurzzeitige Behandlung mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib schädigte die Entwicklung der Alveolen dauerhaft (96). Die pulmonale Expression von PDGF-R α und PDGF-A war in den Lungen von Tiermodellen der BPD nach mechanischer Beatmung (23, 24, 97), in neonatalen Ratten nach Hyperoxieexposition (98) und in Frühgeborenen mit BPD (73) reduziert. Ein kausaler Zusammenhang zwischen der reduzierten PDGF Signaltransduktion und einer Störung der alveolären Septierung im Rahmen der BPD konnte bisher jedoch nicht schlüssig gezeigt werden. Des Weiteren blieb der Mechanismus, mit dem der PDGF Signalweg in die pathophysiologischen Veränderungen im Rahmen der BPD involviert ist, unbekannt.

Unsere Studie untersuchte daher die Rolle der reduzierten PDGF-R α Expression als ursächlichen Treiber der Entwicklung BPD-charakteristischer Veränderungen am Modell der neugeborenen Maus in einem etablierten präklinischen, experimentellen Modell der Erkrankung. Hierzu wurden neonatale PDGF-R α ^{+/+} und transgene PDGF-R α ^{+/-} Mäuse für 8 h mit 40 % Sauerstoff behandelt oder einer mechanischen Beatmung mit 40 % Sauerstoff (MV-O₂) unterzogen.

Die Studie konnte zeigen, dass charakteristische histopathologische Merkmale der BPD wie die Störung der Alveolo- und Vaskulogenese unter dem Einfluss einer postnatalen Schädigung durch MV-O₂ durch eine PDGF-R α Haploinsuffizienz induziert werden können.

In den Lungen der PDGF-R α ^{+/-} Mäuse war nicht nur die Zahl der PDGF-R α positiven Zellen reduziert, sondern es zeigte sich auch eine Deplatziierung dieser Zellen, die durch die Kapazität dieser Zellen zur Elastinproduktion ursächlich sein kann für die beobachtete Veränderung der Elastinfaseranordnung in den Alveolarwänden. Unter dem Einfluss einer postnatalen Schädigung durch die MV-O₂ zeigten PDGF-R α ^{+/-} Mäuse eine signifikant geringere Zahl simplifizierter Alveolen oder ihrer sakkulären Vorstufen. Diese Veränderung der alveolären Strukturen war mit einer signifikant erhöhten Apoptoserate von Endothelzellen und einer signifikant reduzierten Mikrogefäßzahl assoziiert, die durch eine reduzierte pulmonale Expression des endothelialen Wachstumsfaktors VEGF-A und seines Rezeptors VEGF-R2 in den heterozygoten Tieren erklärbar ist.

Die durch die Reduktion der PDGF Signaltransduktion provozierten pulmonalen Veränderungen in den Lungen beatmeter neugeborener PDGF-R α ^{+/-} Mäuse sind mit den pulmonalen Veränderungen von Frühgeborenen mit BPD (50, 73) vergleichbar und wurden zuvor im Modell der neugeborenen Maus vom WT von Bland et al. erst nach 24-stündiger mechanischer Beatmung beschrieben (24, 28).

Die Lungen der PDGF-R α ^{+/-} Mäuse aus der Kontroll- und Beatmungsgruppe wiesen eine reduzierte Zahl und veränderte Anordnung der pulmonalen PDGF-R α positiven MFB im Interstitium der Alveolarwände auf. Die reduzierte Zahl und veränderte Lokalisation der PDGF-R α positiven Zellen kann im Zusammenhang mit der reduzierten alveolären Septierung in den Lungen der PDGF-R α ^{+/-} Mäuse nach MV-O₂ auf den fehlenden Antrieb dieses Prozesses durch die PDGF-R α positiven MFB in den heterozygoten Tieren unter MV-O₂ hinweisen. Diese Annahme ist in Übereinstimmung mit den Erkenntnissen zur verzögerten Lungenentwicklung nach homozygoter Deletion des PDGF-R α (70). Auch Popova et al. konnten *in vitro* eine reduzierte Migration von PDGF-R α positiven Zellen von Neugeborenen mit BPD gegenüber des Liganden PDGF-A demonstrieren (73). Dabei zeigte sich kein Unterschied in der pulmonalen Expression von PDGF-A im Trachealsekret von Neugeborenen mit BPD im Vergleich zu Neugeborenen ohne BPD. Dieses Ergebnis geht mit den Ergebnissen unserer Studie einher, die keine Veränderung in der Expression von PDGF-A nach 8-stündiger MV-O₂ oder Sauerstoffgabe in PDGF-R α ^{+/+} oder PDGF-R α ^{+/-} Mäusen feststellen konnte. Die Proteinexpression von PDGF-A war im Beatmungsmodell der neugeborenen Maus von Bland et al. entsprechend erst nach 24 h reduziert (24). Eine veränderte Expression von PDGF-A durch eine reduzierte PDGF-R α Expression würde einen autokrinen Mechanismus suggerieren, der bisher nur in der onkologischen Forschung

angedeutet wurde (99). Dass die PDGF-R α ^{+/-} Mäuse der Kontrollgruppe zwar eine reduzierte Zahl und veränderte Anordnung der pulmonalen PDGF-R α positiven MFB, nicht aber die BPD-typische reduzierte Lungenseptierung aufwiesen, steht im Einklang mit der Studie von Popova et al, die zeigen konnte, dass sich eine reduzierte Zahl und veränderte Lokalisation der PDGF-R α positiven Zellen in neugeborenen Mäusen erst nach einer Behandlung mit 75 % Sauerstoff für einen Zeitraum von 14 Tagen auf die Lungenseptierung auswirkte (73).

Zur Veränderung der Lungenstruktur beitragend bewirkte die reduzierte PDGF-R α Expression in PDGF-R α ^{+/-} Mäusen unter dem Einfluss der MV-O₂ eine BPD-typische Veränderung der Elastinfaseranordnung in den Alveolarwänden. Die veränderte Anordnung der Elastinfasern in der extrazellulären Matrix in beatmeten PDGF-R α ^{+/-} Mäusen könnte in unserem Modell durch die Deplatzierung der PDGF-R α positiven Zellen begründet sein und wurde auch in den Lungen von Neugeborenen mit chronischer Lungenerkrankung (100, 101) sowie in verschiedenen anderen BPD Modellen nachgewiesen. So zeigte sich eine Umverteilung des pulmonalen Elastins in den Lungen von WT Mäusen (23) und frühgeborenen Schafen nach invasiver Beatmung (22, 26). Auch hier waren die Veränderungen mit einer reduzierten Septen- und Alveolenzahl assoziiert. Im Schafsmodell wurde in der Folge die Hypothese generiert, dass die Umverteilung der Elastinfasern aus der Zerstörung oder Abflachung der sekundären Septen oder deren Rückbildung in primäre Septen resultiert (26). Obschon sich die in der vorliegenden Studie angewendete Beatmungsstrategie nur partiell mit der im Schafsmodell angewendeten Beatmung vergleichen lässt, zeigen sich viele Parallelen in den pulmonalen strukturellen Veränderungen nach MV-O₂. Die unveränderte Proteinexpression des Tropoelastins im pulmonalen Gewebe der PDGF-R α ^{+/-} Mäuse nach 8-stündiger Beatmung steht im Einklang mit den Ergebnissen anderer Studien. Auch in den Lungen der intrauterin beatmeten Schafe führte erst eine Mindestbeatmungsdauer von 12 h zu einem Anstieg des Gesamtelastins (22), während erst eine Beatmungsdauer von 24 h zu einer erhöhten Tropoelastinexpression in den Lungen 7 Tage alter WT Mäuse führte. Die Beatmungsdauer von 8 h führte nur zu einer erhöhten mRNA Expression des Tropoelastins (23). In weiteren experimentellen Studien wurde eine veränderte Anordnung des Elastins mit einer veränderten pulmonalen Expression zentraler Proteine der Elastinsynthese assoziiert. Diese Veränderungen wurden durch eine MV (23) oder die Antagonisierung des PDGF-R α (96) ausgelöst. Es wird angenommen, dass das Ungleichgewicht der Expression elastinassoziierter Proteine bei unveränderter Tropoelastinexpression die Anordnung der Elastinfasern und in Folge die Alveologese

beeinflusst. So wiesen die Lungen neugeborener Ratten nach der Behandlung mit einem PDGF Rezeptorantagonisten neben einer veränderten Anordnung der Elastinfasern auch eine erhöhte Expression des Proteins Fibulin-5 bei unveränderter Tropoelastinexpression auf (96). Fibulin-5 ist für die Synthese der muren Elastinfaser essenziell und wird während der Alveologenese höher exprimiert (102). In unserer Studie konnte eine Veränderung der Proteinexpression des Fibulin-5 in den Lungen von beatmeten PDGF-R $\alpha^{+/-}$ Mäusen im Vergleich zu den Lungen beatmeter PDGF-R $\alpha^{+/+}$ Mäuse nicht festgestellt werden. Dieses Ergebnis entspricht dem Ergebnis des Beatmungsmodells der neugeborenen Maus von Bland et al., in dem die Proteinexpression des Fibulin-5 in den Lungen neugeborener Mäuse vom WT erst nach 24-stündiger Beatmung signifikant reduziert war (23). Ebenfalls zeigte sich in diesem Modell auch keine signifikante Veränderung der mRNA Expression von anderen Proteinen der Elastinsynthese wie Fibrillin-1, Fibrillin-2, Lysyl oxidase-like-1 und Emilin-1 nach 8-stündiger MV-O₂ (23). Im Modell der frühgeborenen Lämmer war eine reduzierte PDGF-R α und PDGF-A Expression mit einer leicht erhöhten mRNA Expression von Fibrillin-1 und Lysyl oxidase-like-1, einer unveränderten Expression von Fibulin-5 und einer reduzierten Expression von Lysyl-oxidase assoziiert (25). Die Analyse der Expression von weiteren Proteinen der Elastinsynthese neben Fibulin-5 könnte in unserer Studie Aufschluss über die Beeinflussung der Elastinsynthese durch die Veränderung der PDGF-R α Signaltransduktion geben. Eindrucksvolle Studien mit dezellularisierten Lungen verdeutlichen die wichtige Rolle der extrazellulären Matrixproteine für die korrekte Differenzierung pluripotenter Zellen (103).

BPD-typische strukturelle Veränderungen mit einer Störung der Alveologenese können durch eine Erhöhung der pulmonalen Apoptoserate erklärt werden (23). May et al. wiesen in den Lungen von verstorbenen Frühgeborenen eine erhöhte Apoptoserate durch eine erhöhte Anzahl von aktivierten Caspase-3 und Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL) positiven Nuklei nach (104). Auch in unserer Studie konnte gezeigt werden, dass die strukturellen Veränderungen in den Lungen der beatmeten PDGF-R $\alpha^{+/-}$ Mäuse mit einer erhöhten Apoptoserate einhergehen. In kausalem Zusammenhang mit der Reduktion der PDGF Signaltransduktion konnten wir eine gesteigerte Apoptose von Endothelzellen beobachten, die zu einer signifikant reduzierten Zahl der Mikrogefäße geführt hat. Diese Veränderungen der Gefäßstruktur entsprechen den Resultaten verschiedener Tiermodelle der BPD und Studien an humanen Proben von Neugeborenen mit BPD, die eine verminderte Zahl der kleinen Arterien und eine abnorme Verteilung der Mikrogefäße in der

distalen Lunge nachweisen konnten (105-107). Ursächlich ist das Fehlen des Wachstumsfaktors VEGF-A, der als Mediator der Vaskulogenese im Rahmen der Lungenentwicklung essenziell für die Endothelzellproliferation ist (108). Im Modell des hyperoxie-induzierten Lungenschadens bei neonatalen Ratten, das dem Bild der BPD ähnelt, wurden assoziiert mit einem Mangel an VEGF-A der Verlust von Lungenkapillaren und eine Störung der Alveologenese (67) sowie in Mauslungen die Entwicklung eines Lungenemphysems beobachtet (109). Auch konnte gezeigt werden, dass die postnatale intratracheale adenoviral vermittelte Gentherapie mit VEGF nicht nur die Gefäß- sondern auch die Alveolarentwicklung förderte (106). Die vaskuläre Hypothese der BPD (110) postulierte daher, dass eine Störung der pulmonalen Gefäßentwicklung in kritischen Phasen der Lungenentwicklung zu einer Störung der Alveolarentwicklung führt (111). Die reduzierte PDGF-R α Expression führte in unserem Mausmodell unter dem Einfluss der MV-O₂, im Gegensatz zur alleinigen Sauerstoffgabe, ebenfalls neben einer Störung der Lungenseptierung zu einer Störung der Vaskulogenese, wahrscheinlich in Folge einer reduzierten VEGF Expression.

Obschon in Tiermodellen der BPD neben einer reduzierten Expression des PDGF-R α eine reduzierte Expression des VEGF-A und VEGF-R2 in der neonatalen Lunge nach mechanischer Beatmung nachgewiesen werden konnte, war ein kausaler Zusammenhang zwischen den beiden Signaltransduktionswegen für die Pathogenese der BPD bisher nicht bekannt (24, 112). Von *in vitro* Studien war bekannt, dass die VEGF Genexpression von glatten Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten in Abhängigkeit von PDGF Isoformen reguliert wird (93). Auch wurde in onkologischen *in vitro* Studien der Chronisch Lymphatischen Leukämie (CLL) festgestellt, dass die Produktion von VEGF durch mesenchymale Stromazellen durch den PDGF Signalweg gesteuert wird (113). Unsere Ergebnisse könnten auch darauf hinweisen, dass die Produktion von VEGF-A durch PDGF Signalwege gesteuert wird, da in den beatmeten PDGF-R α ^{+/-} Mäusen die VEGF-A Expression reduziert war. Somit kommt den pulmonalen PDGF-R α positiven MFB möglicherweise eine Rolle in der Regulation der Vaskulogenese durch die Produktion von VEGF-A zu. Die Expression von VEGF durch kardiale PDGF-R α positive MFB konnte bereits demonstriert werden (114, 115). Andererseits wurde durch Ball et al. in einer *in vitro* Studie gezeigt, dass VEGF-A über die Aktivierung des PDGF-R α die Migration von mesenchymalen Stammzellen fördert und mit anderen PDGF Liganden konkurrieren kann (116). Diese dargestellten entgegengesetzten Effekte verdeutlichen die Notwendigkeit von weiteren *in vitro* sowie *in vivo* Studien zur

genaueren Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der PDGF und der VEGF Signalkaskade, insbesondere in Bezug auf die pulmonalen MFB im Krankheitsbild der BPD.

Der Verzögerung der Alveolo- und Vaskulogenese geht im Rahmen der BPD Genese eine charakteristische Inflammationsreaktion voraus. Die frühe Entzündungsreaktion in der Bronchoalveolären Lavage (BAL) wird in Beatmungsstudien der BPD durch einen initialen Einstrom Neutrophiler Granulozyten charakterisiert, der mit dem Grad des pulmonalen Ödems und dem Risiko einer BPD korreliert (13, 117). Zirkulierende Neutrophile Granulozyten und Monozyten werden 1-3 h nach Beatmungsbeginn aktiviert (118). Die BAL von Frühgeborenen mit BPD weist eine höhere Zahl von Neutrophilen und Makrophagen als die BAL von Frühgeborenen ohne BPD auf (94, 119-121). Tiermodelle der BPD bestätigen diese Ergebnisse (122). Eine Entzündungsreaktion induziert neben vielen verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen die Produktion des Wachstumsfaktors TGF- β (123), welcher mit einer veränderten Expression von anderen Wachstumsfaktoren assoziiert ist (28). Es konnte gezeigt werden, dass niedrig dosiertes TGF- β die Expression von PDGF-R α in pulmonalen mesenchymalen Zellen von Neugeborenen reduziert, die an einer BPD erkranken (73). Aufgrund dieser Untersuchungen von Popova et al interessierte uns die Charakterisierung der Inflammationsreaktion in WT und PDGF-R $\alpha^{+/-}$ Mäusen. Die mögliche Rolle einer pulmonalen Inflammationsreaktion an der Ausprägung des Lungenphenotyps der beatmeten PDGF-R $\alpha^{+/-}$ Maus wurde durch die Quantifizierung der Neutrophilen Granulozyten und Monozyten im Lungengewebe abgeschätzt. Unter dem Einfluss der MV-O₂ konnte eine höhere Zahl von Ly6G positiven Neutrophilen Granulozyten und F4/80 positiven Monozyten in den Lungen der Mäuse beider Gruppen nachgewiesen werden. Die 8-stündige Sauerstoffexposition führte in den Mäusen beider Kontrollgruppen hingegen zu keiner durch unsere Methoden quantifizierbaren Entzündungsreaktion. Ein Anstieg der Monozytenzahl in PDGF-R $\alpha^{+/-}$ Mäusen könnte durch eine Induktion des Wachstumsfaktors TGF- β (124) zu einer aggravierten Reduktion von PDGF-R α führen (73, 125). Da die Aktivierung von TGF- β außerdem neben der Induktion von Apoptose ein Ungleichgewicht zwischen der Proliferation und Migration von Endothelzellen und MFB und BPD-typische histopathologische Veränderungen bewirkt (126, 127), könnte die Aktivierung von TGF- β in einer PDGF-R $\alpha^{+/-}$ Maus ebenso den VEGF-A abhängigen Apoptoseeffekt verstärken. Ein längerer Beatmungszeitraum würde wahrscheinlich den Inflammationsprozess in den PDGF-R $\alpha^{+/-}$ Mäusen im Gegensatz zu PDGF-R $\alpha^{+/+}$ Mäusen aggravierend, da durch Abbauprodukte der extrazellulären Matrix TGF- β produzierende Monozyten rekrutiert werden (128-130).

Weitere Experimente müssten untersuchen, ob die Effekte einer reduzierten PDGF-R α Expression unter MV-O₂ teilweise durch die Aktivierung von TGF- β beeinflusst sind.

Die Gabe von 40 % Sauerstoff allein war nicht in der Lage den Lungenphänotyp in den heterozygoten Mäusen zu induzieren. Dieses Ergebnis stimmt überein mit Studien, die den Effekt der Sauerstofftoxizität auf die Entwicklung BPD-charakteristischer Veränderungen an Tiermodellen der BPD untersuchen und zur Induktion des Phänotyps deutlich höhere Sauerstoffkonzentrationen oder längere Expositionen verwenden (131-133). So konnten Wang et al zeigen, dass die Gabe von 40 % Sauerstoff für 7 Tage zu deutlichen strukturellen Veränderungen in den Lungen von neugeborenen Mäusen des WT führt (134). In dem Modell der Arbeitsgruppe von Rory Morty et al. führte die Exposition neugeborener Mäuse unter anderem gegenüber 85 % Sauerstoff zu keinem Effekt auf die Lungenstruktur nach einem Zeitraum von 24 h (135). Die beschriebenen Unterschiede in der Wirkung der postnatalen Noxen auf die sich entwickelnde Lunge könnten auf die differierende Induktion pulmonaler Apoptose zurückgeführt werden (136).

Zusammenfassend konnte die vorliegende Studie zeigen, dass die charakteristischen histopathologischen Merkmale der BPD wie die Störung der Alveolo- und Vaskulogenese unter dem Einfluss einer postnatalen Schädigung durch MV-O₂ durch eine reduzierte PDGF Expression induziert werden. Die reduzierte Zahl und veränderte Lokalisation der PDGF-R α positiven Zellen weist im Zusammenhang mit der reduzierten alveolären Septierung in den Lungen der PDGF-R α ^{+/-} Mäuse nach MV-O₂ auf den fehlenden Antrieb dieses Prozesses durch die PDGF-R α positiven MFB hin. Die signifikant reduzierte Proteinexpression des Wachstumsfaktors VEGF-A, dem Mediator der Vaskulogenese, und die damit assoziierten Effekte auf die Apoptoserate der Endothelzellen und die Zahl der Mikrogefäße in beatmeten PDGF-R α ^{+/-} Mäusen weisen weiterhin daraufhin, dass die Produktion von VEGF-A PDGF-abhängig gesteuert wird. Auf experimenteller Ebene werden weitere *in vivo* und *in vitro* Studien die zentrale Rolle der PDGF-R α abhängigen Signaltransduktion und die Rolle des MFB in der Pathogenese der neonatalen chronischen Lungenerkrankung klären und die Interaktion weiterer Signalwege aufdecken. Abb. 16 zeigt das entsprechende Modell zur Rolle des PDGF-R α in der Pathogenese der BPD-typischen Störung der Alveolo- und Vaskulogenese unter MV-O₂.

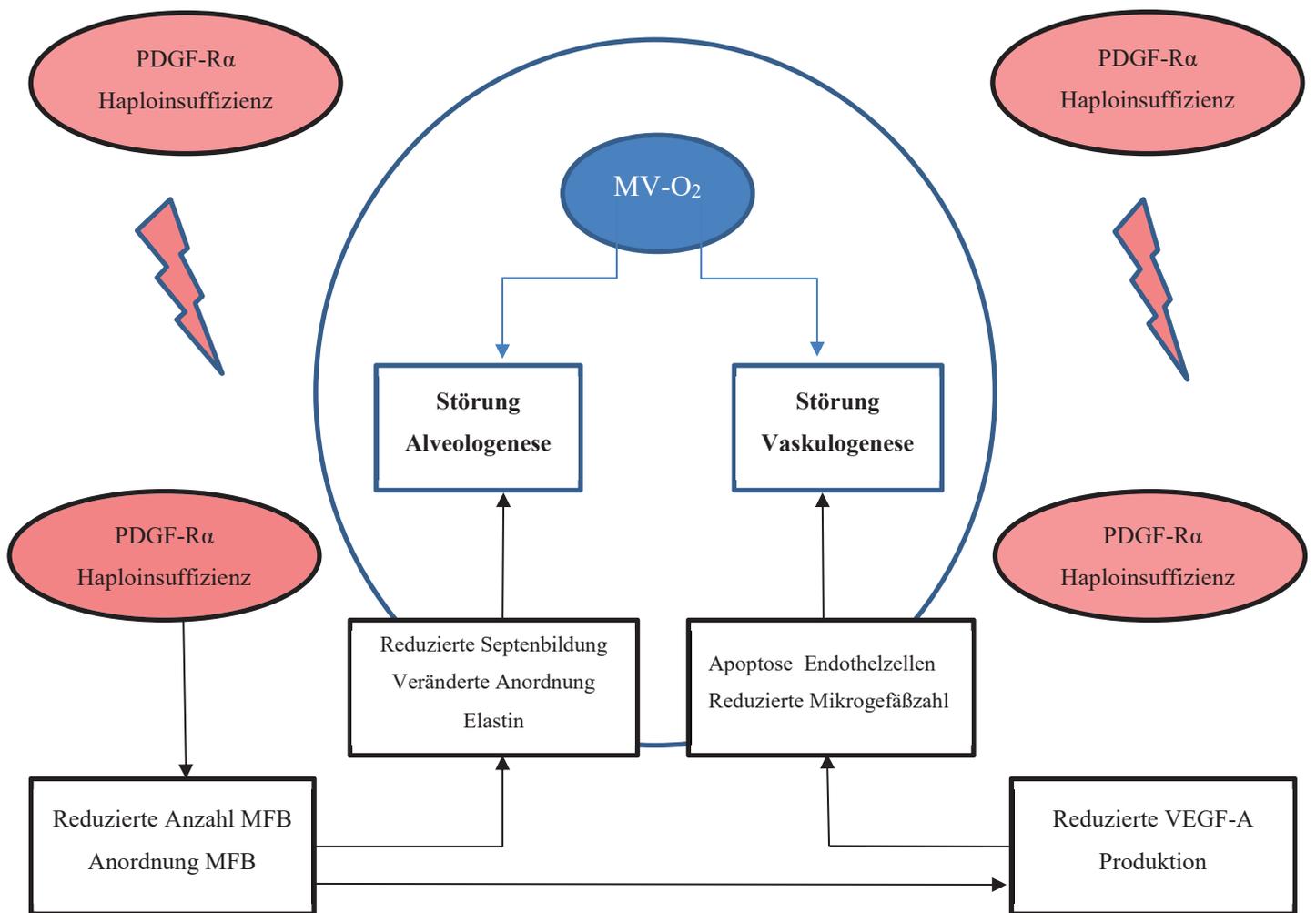


Abb. 16: Modell zur Rolle des PDGF-R α in der Pathogenese der BPD-typischen Störung der Alveolo- und Vaskulogenese unter MV-O₂.

Die PDGF-R α Haploinsuffizienz aggraviert die histopathologischen Merkmale der BPD unter dem Einfluss der MV-O₂. Eine reduzierte Zahl und veränderte Verteilung von PDGF-R α positiven MFB in PDGF-R α ^{+/-} Mäusen führt unter dem Einfluss der MV-O₂ zur einer veränderten Verteilung der pulmonalen Elastinfasern und reduzierten Lungenseptierung sowie zu einer verminderten Produktion von VEGF-A. PDGF-R α positive MFB tragen durch die Produktion von VEGF-A zur Gefäßentwicklung bei. Die Folge einer verminderten Produktion von VEGF-A ist eine erhöhte Apoptoserate der Endothelzellen und eine reduzierte Zahl der Mikrogefäße.

Im klinischen Alltag gilt das Ziel, die Beatmungsstrategie für Frühgeborene weiter zu optimieren. Dabei ist die Behandlung der beatmeten Frühgeborenen mit Surfactant zur Erleichterung des pulmonalen Gasaustausches in Kombination mit geringen Tidalvolumina und Sauerstoffkonzentrationen derzeit der Goldstandard. Auf Basis unserer Studienergebnisse könnte entsprechend des Versuchsmodells mit Elafin (87) untersucht werden, wie sich die Behandlung der beatmeten PDGF-R α ^{+/-} Mäuse mit dem Liganden PDGF-A auf die Zahl und Anordnung der MFB, die Anordnung der Elastinfasern, die Lungenseptierung, die Expression von VEGF-A, die Apoptose der Endothelzellen und die Gefäßstruktur auswirkt. Eine niedrig dosierte Gabe des Liganden PDGF-A zu Beginn der Beatmung erscheint sinnvoll, da zuvor die Überexpression des PDGF-R α eine Hyperplasie stromaler Fibroblasten in Embryos und eine systemische Fibrose multipler Organe in adulten Mäusen bewirkte (137). Die Behandlung der beatmeten PDGF-R α ^{+/-} Mäuse mit PDGF-A könnte möglicherweise die schädlichen Effekte einer reduzierten PDGF-R α Expression vermindern und wäre potenziell protektiv für Neugeborene, die unter dem Einfluss der MV-O₂ eine BPD entwickeln, oder für Neugeborene, die generell eine reduzierte Signaltransduktion via PDGF-R α aufweisen.

Zur Übertragbarkeit der Studie müssen wichtige Unterschiede zwischen dem experimentellen Mausmodell und der klinischen Situation berücksichtigt werden. Die am meisten von der BPD betroffenen Neugeborenen sind extreme Frühgeborene zwischen der 23. und 26. SSW, die aufgrund eines Surfactantmangels und der ausgeprägten Unreife ihrer Lunge eine postnatale Atemstörung entwickeln. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich die Lungen der Frühgeborenen im späten kanalikulären bis frühen sakkulären Entwicklungsstadium. Die Beurteilung der neonatalen Mauslungen 5-7 Tage postnatal erlaubt die histologische Untersuchung in der sakkulären und alveolären Phase der Lungenentwicklung. Zudem erlaubt der Beatmungszeitraum von 8 h im Mausmodell Aussagen über die frühen Veränderungen durch den Einfluss der MV-O₂, nicht aber über die Langzeitfolgen der Beatmung.

5 Anhang

5.1 Chemikalien

| <u>Chemikalien</u> | <u>Hersteller</u> | <u>Bestellnummer</u> | <u>Herstellungsort</u> |
|----------------------------------------------------------|--------------------------|----------------------|------------------------|
| 10xPCR Buffer 2 | Applied Biosystems | #4376212 | Kalifornien, USA |
| Antibody Diluent | Zytomed | ZUC 025-500 | Berlin, Deutschland |
| Background Sniper | Biocare Medical | #BS 966 | Kalifornien, USA |
| Cytoseal 60 media | Richard-Allan Scientific | #8310-4 | Kalamazoo, USA |
| Diaminobenzidine | Dako North America | #K3468 | Carpinteria, USA |
| dNTP's | Fermentas | #R0192 | St. Leon-Rot |
| ECL Western Blotting Detection Reagents | GE Healthcare | RPN 2109 | München, Deutschland |
| Dual Endogenous Enzyme-Blocking Reagent | Dako North America | #S200389-2 | Carpinteria, USA |
| Halt Protease Inhibitor Single-Use Cocktail EDTA-Free | Thermo Scientific | #78424 | Bonn, Deutschland |
| Hematoxylin 1 | Richard-Allan Scientific | #7221 | Kalamazoo, USA |
| Kit BCA Protein Standard | Pierce | #23225 | Rockford, USA |
| Kit SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate | Thermo Scientific | #34095 | Bonn, Deutschland |
| LightCycler 480 SYBR Green I Master (H20CCM) | Roche Diagnostics | #04707516001 | Mannheim, Deutschland |
| MagicMark XP Western Protein Standard 20-220 kDa | Invitrogen | LC5603 | Kalifornien, USA |
| Mayer's Hämalalaun | Merck Millipore | 109249 | Darmstadt, |

| | | | |
|----------------------------------------------|------------------------------------|--------------|---------------------------|
| | | | Deutschland |
| MES SDS Running Buffer 20x | Invitrogen | NP0002 | Kalifornien, USA |
| Methanol | Applichem | A3493 | Darmstadt, Deutschland |
| MgCl ₂ (25 mM) | Applied Biosystems | #361691 | Kalifornien, USA |
| MuLV Reverse Transcriptase 5000 U 50 U/μl | Roche Applied Biosystems | N808-0018 | Mannheim, Deutschland |
| NuPAGE Antioxidant | Invitrogen | NP0005 | Kalifornien, USA |
| NuPAGE LDS Sample Buffer 4x | Invitrogen | NP0007 | Kalifornien, USA |
| NuPAGE Sample Reducing Agent 10x | Invitrogen | NP0004 | Kalifornien, USA |
| NuPAGE Transfer Buffer 20x | Invitrogen | NP 0006-1 | Kalifornien, USA |
| peqGOLD DNase Digest Kit | peqlab | #12-1091-01 | Erlangen, Deutschland |
| peqlab-Gold Total RNA-Kit | peqlab | #12-6834-01 | Erlangen, Deutschland |
| PFA | Electron Microscopy Sciences | #15714 | Pennsylvania, USA |
| Polyacrylamid Gele 3-8% Tris-Acetate | Invitrogen | EA0375Box | Kalifornien, USA |
| Polyacrylamid Gele 4-12% Bis-Tris | Invitrogen | NPO 0321Box | Kalifornien, USA |
| Random Hexamers (50μM) | Roche | #58002113-01 | Mannheim, Deutschland |
| Restore Western Blot Stripping Buffer | Thermo Scientific | #21059 | Bonn, Deutschland |
| RNase Inhibitor 2000 units 20 U/μl | Roche | N808-0119 | Mannheim, Deutschland |

| | | | |
|----------------------------------------|-----------------------|---------------|---------------------------|
| Roti-Quick-Kit Lösung A | Carl Roth GmbH | #A979.1 | Karlsruhe, Deutschland |
| Skim Milk Powder | Sigma-Aldrich | 70166-500G | Perth, Australien |
| Target Retrieval Solution | Dako North America | #S1699 | Carpinteria, USA |
| TBS | Fisher | BP2471500 | Waltham, MA, USA |
| Tris-Acetate SDS Running Buffer 20x | Invitrogen | LA0041 | Kalifornien, USA |
| TRIS Puffer | Applichem GmbH | A1379,1000 | Darmstadt, Deutschland |
| Tween 20 | SIGMA Life Science | CAS 9005-64-5 | Perth, Australien |

5.2 Lösungen und Puffer

| <u>Lösungen/Puffer</u> | <u>Zusammensetzung</u> |
|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| PFA | 50 ml dH ₂ O, 20 ml Phosphatpuffer, 10 ml PFA |
| 0,1% TBS-T | 1800 ml destilliertes Wasser, 200 ml TBS, 2 µl Tween |
| 0,25% Kaliumpermanganat | 0,25 g/ml Kaliumpermanganat in 100 ml Ampuwa |
| 0,25% Tatrazin | 1 g/ml Tatrazin in 400 ml Ampuwa, 1 ml Essigsäure |
| 1 µl Primer Mix | 0,5 µl Forward Primer, 0,5 µl Reverse Primer |
| 5% Oxalsäure | 5 g/ml Oxalsäure in 100 ml Ampuwa |
| Blocking Buffer | 50 ml 0,1% TBS-T, 2,5 g trockenes Milchpulver |
| cDNA Mastermix | 4,0 µl 10x Puffer, 8,0 µl MgCl ₂ , 2,0 µl dNTP's, 2,0 µl Random Hexamers, 1,0 µl RNase-Inhibitor, 2,0 µl Reverse Transkriptase (50U), 1,0 µl H ₂ O |

| | |
|----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| DNase 1 Digestion Reaction Mix | 73,5 µl DNA Digestion Buffer, 1,5 µl DNase 1 |
| Extraktionspuffer | 11 ml Harnstoffpuffer, 110 µl Protease Cocktail |
| Harnstoff Puffer | 0,139 g K ₂ HPO ₄ , 12 g Harnstoff, 85 ml deionisiertes Wasser |
| Phosphatpuffer | 1 L 0,4M Phosphatpuffer = 808ml Stock A (Na ₂ HPO ₄ 28,4 g/L), 192 ml Stock B (KH ₂ PO ₄ 27 g/L |
| Real Time PCR Mastermix | 10 µl Mastermix, 5 µl cDNA, 1 µl Primer Mix, 4 µl RNase freies Wasser |
| Resorcin-Fuchsin-Gebrauchslösung | 10 ml Resorcin-Fuchsin Chroma, 100 ml 70% Ethanol, 2 ml HCl |
| Running Buffer | 760 ml destilliertes Wasser, 40 ml MES SDS Running buffer 20x |
| Transfer Puffer | 850 ml destilliertes Wasser, 50 ml NuPAGE Transfer Buffer 20x, 100 ml Methanol |

5.3 Geräte

| Name | Gerätetyp | Hersteller | Bestellnummer | Herstellungsort |
|----------------------|---------------------------------------------------|------------------------------------|---------------|-------------------|
| BioRad ChemiDoc XRS | BioRad ChemiDoc XRS | BioRad Laboratories | 170-8265 | Kalifornien, USA |
| Einbettungskassetten | Tissue-Tek Mega Kassette 30mmx24mmx11 mm | Sakura | E62512-30 | Kalifornien, USA |
| Gießformen | Tissue-Tek Base Mold, 38mmx25mmx12 mm | Sakura | E62528-38 | Kalifornien, USA |
| Holzblock | Embedding Block, 25mmx25mmx19 mm | Electron Microscopy Sciences | #62363-02 | Pennsylvania, USA |
| ImageLab | Software | BioRad | 170-9690 | Kalifornien, USA |

| | | | | |
|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|--------------|----------------------------------|
| Kälteplatte | Thermo Scientific Microm | Thermo Fisher Scientific | EC 350 | Waltham, MA, USA |
| LightCycler | LightCycler 480II | Roche | #28337 | Mannheim, Deutschland |
| Mikro-Dismembrator | Mikro- Dismembrator S | Sartorius Stedim Biotech | BBI-8531609 | Göttingen, Deutschland |
| Mikroskop | Olympus BX51 Lichtmikroskop | Olympus | BX51 | München, Deutschland |
| Mikrotom | Zeiss Hyrax Microtome | Carl Zeiss | M55 | Oberkochen, Deutschland |
| Nitrozellulose Membranen | Nitrocellulose/ Filter paper sandwich, 0.45 µm Porengröße, 8,5cmx13,5cm | Invitrogen | LC 2006 | Kalifornien, USA |
| Orbitalshaker | Polymax 2040 | Heidolph | 542-40005-00 | Schwabach, Deutschland |
| Power Station | PowerPac Basic Power Supply | BioRad | #1645050 | Kalifornien, USA |
| Prism Software Package | Prism Software Package | Graph Pad | Software | Kalifornien, USA |
| Spectrophotometer | NanoDrop 1000 Spectrophoto- meter | Thermo Scientific | I202 | Bonn, Deutschland |
| Stahlkugeln | Cr-Ni Stahlkugeln D=9mm | Sartorius Stedim Biotech GmbH | BBI-8546916 | Göttingen, Deutschland |
| Stereomikroskop | Stereomikroskop M80 | Leica Mikrosysteme GmbH | 10450155 | Wetzlar, Deutschland |
| TECAN sunrise™ plate reader | TECAN sunrise™ plate reader | TECAN Trading AG | P97269 | Männedorf, Schweiz |
| Temperaturmessgerät | Thermometer Typ FT70 | Beurer GmbH | #79500 | Ulm, Deutschland |
| Tierrespirator | Mouse Ventilator MicroVent Type 848 | Hugo Sachs Elektronik/Harvard Apparatus | 73-3591 | March-Hugstetten, Deutschland |
| Wärmekissen | Heizkissen Easyfix | Sanitas | 214.14 | Uttenweiler, Deutschland |
| Wärmelampe | Wickeltisch Heizstrahler | Reer | 1909 | Leonberg, Deutschland |
| Western Blot Kammer | 5.3.1.1.1.1 X Ce ll | 5.3.1.1.1.2 The rmo Fish | EI0001 | Waltham, MA, USA |

| | | | | |
|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|--|--|
| | Su re Lo ck Mi ni- Ce ll El ect ro ph or esi s Sy ste m | er Scie ntifi c | | |
|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|--|--|

5.4 Primersequenzen

VE-Cadherin FW 5' ACAGACAAGGATGTGGTGCCAGTA 3'

VE-Cadherin RV 5' TTGGCATGCTCCCGATTAAACTGC 3'

Caspase-3 FW 5' TGGGCCTGAAATACCAAGTCAGGA 3'

Caspase-3 RV 5' GTTCAACAGGCCCATTTGTCCCAT 3'

VEGF-A FW 5' TCACCAAAGCCAGCACATAGGAGA 3'

VEGF-A RV 5' TTTCTCCGCTCTGAACAAGGCTCA 3'

PDGF-R α FW 5' TGTGCCGTCTTTAACAACGA 3'

PDGF-R α RV 5' TACCTTTGTTTCTCACTTCTCCAG 3'

5.5 Antikörper

| Name | Spezies | Verdünnung | Bezug | Herstellerort | Katalognummer |
|---------------------------------|---------|------------|------------|---------------------|---------------|
| Galectin-3 H160 | Hase | 1:100 | Santa Cruz | Kalifornien, USA | sc-20157 |
| PDGF- R α □□□□□□ □ | Hase | 1:50 | Santa Cruz | Kalifornien, USA | sc-338 |

| | | | | | |
|--------------|------|-------|-------------------|-------------------------|---------|
| α -MA | Maus | 1:400 | SigmaAldrich | St. Louis, MO, USA | A5228 |
| CD31 | Maus | 1:200 | Dianova | Hamburg, Deutschland | DIA-310 |
| Caspase-3 | Hase | 1:200 | Cell Signaling | Beverly, USA | #9662 |

Abb. 17: Verwendete Primärantikörper für Immunfluoreszenz Färbung.

| Name | Antigen | Spezies | Hersteller | Herstellerort | Katalognummer |
|--------------------|---------|---------|------------|---------------|---------------|
| AlexaFluor 568 | Ziege | Esel | Invitrogen | Oregon, USA | A11057 |
| Alexa Fluor 647 | Ratte | Ziege | Invitrogen | Oregon, USA | A21247 |
| Alexa Fluor 568 | Maus | Ziege | Invitrogen | Oregon, USA | A11004 |
| Alexa Fluor 568 | Hase | Ziege | Invitrogen | Oregon, USA | A11011 |

Abb. 18: Verwendete Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz Färbung.

| Name | Antigen | Spezies | Verdünnung | Hersteller | Katalognummer | Herstellerort |
|-------------------------------|-----------------|---------|------------|-------------------|----------------------------------|---------------------------|
| PDGFR- α | PDGF-R α | Hase | 1:800 | Santa Cruz Bio | #sc-338 170kDa 130kDa | Kalifornien, USA |
| Mouse tropoelastin | Tropoelastin | Hase | 1:1500 | Custom- made | Robert P. Mecham | St. Louis, MO, USA |
| PCNA (FL- 261) | PCNA | Hase | 1:500 | Santa Cruz Bio | #sc-7907 36kDa | Kalifornien, USA |
| VEGF-A (147) | VEGF-A | Hase | 1:200 | Santa Cruz Bio | #sc-507 42kDa | Kalifornien, USA |
| β -actin (ACTBD11B7) | β | Maus | 1:5000 | Santa Cruz Bio | #sc-81178 43kDa | Kalifornien, USA |
| Mouse VEGF R2/KDR-Flk-1 | VEGF-R2 | Ziege | 1:200 | R&D | AF644 | Wiesbaden, Deutschland |
| PDGF-A (E- 10) | PDGF-A | Maus | 1:200 | Santa Cruz Bio | #sc-9974 26kDa (17- 31kDa) | Kalifornien, USA |

| | | | | | | |
|--------------------|-------------|-------|-------|----------------|---------------------|---------------------|
| Fibulin-5 (S20) | Fibulin-5 | Ziege | 1:200 | Santa Cruz Bio | #sc-23062 66kDa | Kalifornien, USA |
| VE-Cadherin (H-72) | VE-Cadherin | Hase | 1:200 | Santa Cruz Bio | #sc-28644 110kDa | Kalifornien, USA |
| Caspase-3 Rabbit | Caspase-3 | Hase | 1:500 | Cell Signaling | #9662P 17/19kDa | Beverly, USA |

Abb. 19: Verwendete Primärantikörper für Immunoblot.

| Name | Antigen | Spezies | Hersteller | Herstellerort | Katalognummer |
|--------------------------|---------|---------|----------------|---------------------|---------------|
| Goat anti-mouse IgG-HRP | Maus | Ziege | Santa Cruz Bio | Kalifornien, USA | #sc-2060 |
| Goat anti-rabbit IgG-HRP | Hase | Ziege | Santa Cruz Bio | Kalifornien, USA | #sc-2301 |
| Donkey anti-goat IgG HRP | Ziege | Esel | Santa Cruz Bio | Kalifornien, USA | #sc-2020 |
| Goat anti-rabbit IgG-HRP | Hase | Ziege | Cell Signaling | Beverly, USA | #7074P2 |

Abb. 20: Verwendete Sekundärantikörper für Immunoblot.

| Name | Antigen | Spezies | Hersteller | Herstellerort | Katalognummer |
|----------------------|---------|---------|-------------|-------------------|---------------|
| Rat anti-F4/80 | F4/80 | Ratte | Abcam | Cambridge, USA | ab6640 |
| Rat anti-Ly-6G, Gr-1 | Ly6G | Ratte | eBioscience | San Diego, USA | #14-5931-85 |

Abb. 21: Verwendete Primärantikörper für Immunhistochemie.

| Name | Antigen | Spezies | Hersteller | Herstellerort | Katalognummer |
|------|---------|---------|------------|---------------|---------------|
|------|---------|---------|------------|---------------|---------------|

| | | | | | |
|----------------------|-----------|-------|------------------------|--------------------|----------|
| streptavidin- HRP | Maus Ig-G | Ratte | Vector Laboratories | Burlingame, USA | #SA-5704 |
|----------------------|-----------|-------|------------------------|--------------------|----------|

Abb. 22: Verwendeter biotinylierter Sekundärantikörper für Immunhistochemie.

6 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| % | Prozent |
| ° | Grad |
| °C | Grad Celsius |
| α-SMA | Alpha-Smooth Muscle Actin |
| Abb. | Abbildung |
| AIS | Amnioninfektionssyndrom |
| Anh. | Anhang |
| ANS | Atemnotsyndrom |
| BAL | Bronchoalveoläre Lavage |
| BCA | Bicinchoninsäure (<i>Bicinchoninic Acid</i>) |
| BPD | Bronchopulmonale Dysplasie |
| CD31 | Cluster of Differentiation 31 |
| cDNA | Komplementäre Desoxyribonukleinsäure |
| CLL | Chronisch lymphatische Leukämie |
| cm | Zentimeter |
| cmH ₂ O | Zentimeter Wassersäule |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| CPAP | <i>Continuous Positive Airway Pressure</i> |
| Ct | <i>threshold cycle</i> |
| D | Durchmesser |
| Da | Dalton |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-phenylindol |
| dH ₂ O | Destilliertes Wasser |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleic Acid</i>) |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| dNTPs | Desoxyribonukleosidtriphosphate |
| Dr. | Doktor |
| dUTP | Desoxyuridintriphosphat |
| E | Embryonaler Tag |
| ECL | Enhanced Chemiluminescence |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure (<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>) |

| | |
|-------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| eGFP | <i>enhanced Green Fluorescent Protein</i> |
| et al. | und andere |
| EU | Europäische Union |
| FiO ₂ | Inspiratorische Sauerstofffraktion |
| g | Gramm |
| GA | Gestationsalter |
| GG | Geburtsgewicht |
| h | Stunde |
| HCl | <i>Hydrochloric Acid</i> |
| HE | Hämatoxylin Eosin |
| Het | Heterozygot |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| HPRT | Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase |
| HRP | <i>Horseradish Peroxidase</i> |
| ID | Innerer Durchmesser |
| Ig | Immunglobulin |
| IL-1 β | Interleukin 1 β |
| IL-6 | Interleukin 6 |
| IL-8 | Interleukin 8 |
| iLBD | Institute of Lung Biology and Disease |
| IUR | <i>Isotropic Uniform Random</i> |
| kDa | Kilodalton |
| KG | Körpergewicht |
| kg | Kilogramm |
| l | Liter |
| Ly6G | Lymphocyte antigen 6 complex-Locus G |
| M | Molar |
| MAP | Mittlerer Beatmungsdruck (<i>Mean Airway Pressure</i>) |
| MIP | Maximaler Beatmungsdruck (<i>Maximal Inspiratory Pressure</i>) |
| max. | maximal |
| med | medicinae |
| MFB | Myofibroblast |
| min | Minute(n) |
| ml | Milliliter |

| | |
|-----------------------|----------------------------------------------------------|
| mm | Millimeter |
| mM | Millimolar |
| mRNA | <i>Messenger Ribonucleic Acid</i> |
| MV-O ₂ | Mechanische Beatmung mit sauerstoffreichem Gas |
| NaCl | Natriumchlorid |
| ng | Nanogramm |
| NHLBI | National Heart, Lung and Blood Institute |
| NICHD | National Institute of Child Health and Human Development |
| NIH | National Institute of Health |
| nm | Nanometer |
| NP | NuPAGE |
| nt | Nukleotid |
| OD | Äußerer Durchmesser |
| ORD | Office of Rare Diseases |
| PBS | <i>Phosphate Buffered Saline</i> |
| PCNA | Proliferating Cell Nuclear Antigen |
| PCR | Polymerase Kettenreaktion |
| PDA | Persistierender Ductus Arteriosus |
| PDGF | Platelet Derived Growth Factor |
| PDGF-R α | Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha |
| PDGF-R α (+/-) | PDGF-R α haploinsuffizient |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PMA | Postmenstruelles Alter |
| RAC | <i>Radial Alveolar Count</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic acid</i>) |
| RNase | Ribonuklease |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>) |
| RT | Reverse Transkriptase |
| sc | Santa Cruz |
| SD | Standardabweichung (<i>Standard Deviation</i>) |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| sek | Sekunde |
| SSW | Schwangerschaftswoche(n) |
| Tab. | Tabelle |

| | |
|---------------|--------------------------------------------------------------|
| TBS | Tris-Buffered Saline |
| TBS-T | Tris-Buffered Saline-Tween |
| TGF- β | Transforming Growth Factor Beta |
| TNF- α | Tumornekrosefaktor Alpha |
| TRIS | Trishydroxymethylaminomethan |
| TUNEL | Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling |
| U | Unit |
| V | Volt |
| VE-Cadherin | Vascular Endothelial Cadherin |
| VEGF | Vascular Endothelial Growth Factor |
| VEGF-R | Vascular Endothelial Growth Factor Receptor |
| vet | veterinär |
| WT | Wildtyp |
| X | Vergrößerung |
| x | facher |
| μg | Mikrogramm |
| μl | Mikroliter |
| μM | Mikromolar |
| μm | Mikrometer |

7 Abbildungsverzeichnis

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abb. 1: Ausbildung der primären und sekundären Septen (63). | 13 |
| Abb. 2: Wirkung der PDGF-R α /PDGF-A Signaltransduktion auf den MFB. | 14 |
| Abb. 3: Vergleich eines histologischen Lungenausschnittes einer WT (+/+) Maus und einer Maus mit homozygoter Deletion des PDGF-A (-/-) im Alter von 3 Wochen. | 15 |
| Abb. 4: Transgenes Mausmodell. | 19 |
| Abb. 5: Beatmungsmodell der Studie. | 21 |
| Abb. 6: Übersicht der einzelnen Versuchsgruppen. | 22 |
| Abb. 7: Mittlerer und maximaler Beatmungsdruck in den Versuchsgruppen. | 23 |
| Abb. 8: Position einer Maus an einer Beatmungsstation während der 8-stündigen MV-O ₂ . | 24 |
| Abb. 9: Lungenvolumen und Anteil der atelektatischen Lungenbezirke in den Lungen der Mäuse aller Gruppen. | 41 |
| Abb. 10: Lungenstruktur in neonatalen PDGF-R α ^{+/-} Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen nach mechanischer Beatmung. | 42 |
| Abb. 11: Untersuchung der Anordnung der pulmonalen Elastinfasern und Elastinproduktion in Lungen von Mäusen der PDGF-R α ^{+/-} Beatmungsgruppe. | 44 |
| Abb. 12: Verteilung und Zahl PDGF-R α positiver Zellen sowie PDGF-R α /PDGF-A Expression in Lungen von PDGF-R α ^{+/-} Mäusen. | 46 |
| Abb. 13: Untersuchung der Apoptose und Proliferation in den Lungen von beatmeten PDGF-R α ^{+/-} Mäusen. | 48 |
| Abb. 14: Apoptoserate endothelialer Zellen, Mikrogefäßzahl und Expression von VE-Cadherin, VEGF-A und VEGF-R2 in den Lungen von beatmeten neonatalen PDGF-R α ^{+/-} Mäusen. | 51 |
| Abb. 15: Zahl der inflammatorischen Zellen in den Lungen von beatmeten PDGF-R α ^{+/-} Mäusen im Vergleich zu Lungen von beatmeten WT Mäusen. | 53 |
| Abb. 16: Modell zur Rolle des PDGF-R α in der Pathogenese der BPD-typischen Störung der Alveolo- und Vaskulogenese unter MV-O ₂ . | 61 |
| Abb. 17: Verwendete Primärantikörper für Immunfluoreszenz Färbung. | 69 |
| Abb. 18: Verwendete Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz Färbung. | 69 |
| Abb. 19: Verwendete Primärantikörper für Immunoblot. | 70 |
| Abb. 20: Verwendete Sekundärantikörper für Immunoblot. | 70 |
| Abb. 21: Verwendete Primärantikörper für Immunhistochemie. | 70 |
| Abb. 22: Verwendeter biotinylierter Sekundärantikörper für Immunhistochemie. | 71 |

8

8 Literaturverzeichnis

1. Merritt TA, Deming DD, Boynton BR. The 'new' bronchopulmonary dysplasia: challenges and commentary. *Seminars in fetal & neonatal medicine*. 2009;14(6):345-57.
2. Jobe AH, Bancalari E. Workshop on Bronchopulmonary Dysplasia. National Heart, Lung and Blood Institute's Workshop on Bronchopulmonary Dysplasia; June 1-2, 2000; Bethesda, MD2000.
3. Eber E, Zach MS. Long term sequelae of bronchopulmonary dysplasia (chronic lung disease of infancy). *Thorax*. 2001;56(4):317-23.
4. Karagianni P, Tsakalidis C, Kyriakidou M, Mitsiakos G, Chatziioanidis H, Porpodi M, et al. Neuromotor outcomes in infants with bronchopulmonary dysplasia. *Pediatric neurology*. 2011;44(1):40-6.
5. Doyle LW, Anderson PJ. Long-term outcomes of bronchopulmonary dysplasia. *Seminars in fetal & neonatal medicine*. 2009;14(6):391-5.
6. Smith V, Zupancic J, McCormick M. Trends in severe bronchopulmonary dysplasia rates between 1994 and 2002. *The Journal of pediatrics*. 2005;146(4):469-73.
7. Laughon MM, Langer JC, Bose CL, Smith PB, Ambalavanan N, Kennedy KA, et al. Prediction of bronchopulmonary dysplasia by postnatal age in extremely premature infants. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2011;183(12):1715-22.
8. Gortner L, Misselwitz B, Milligan D, Zeitlin J, Kollée L, Boerch K, et al. Rates of Bronchopulmonary Dysplasia in very preterm neonates in Europe: Results from the MOSAIC Cohort. *Neonatology*. 2011;99, No.2.
9. Stoll BJ, Hansen N, Bell E, Shankaran S, Laptook AR. Neonatal outcomes of extremely preterm infants from the NICHD Neonatal Research Network. *PEDIATRICS*. 2010;126:443-56.
10. Northway WH, Jr., Rosan RC, Porter DY. Pulmonary disease following respirator therapy of hyaline-membrane disease. Bronchopulmonary dysplasia. *The New England journal of medicine*. 1967;276(7):357-68.
11. National Institutes of Health. Report of Workshop on Bronchopulmonary Dysplasia. Washington DC: National Institutes of Health, 1979.
12. vom Hove M, Henn C, Meir J, Mieke U, Prenzel F. Pulmonale Langzeitfolgen der bronchopulmonalen Dysplasie. *Kinder- und Jugendmedizin*. 2011;11(Heft 1 2011):38-42.
13. Bland RD. Neonatal chronic lung disease in the post-surfactant era. *Biology of the neonate*. 2005;88:181-91.
14. Ehrenkranz RA, Walsh MC, Vohr BR, Jobe AH, Wright LL, Fanaroff AA, et al. Validation of the National Institutes of Health consensus definition of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics*. 2005;116(6):1353-60.
15. Shennan AT, Dunn MS, Ohlsson A, Lennox K, Hoskins EM. Abnormal pulmonary outcomes in premature infants: prediction from oxygen requirement in the neonatal period. *Pediatrics*. 1988;82(4):527-32.
16. deRegnier RA, Roberts D, Ramsey D, Weaver RG, Jr., O'Shea TM. Association between the severity of chronic lung disease and first-year outcomes of very low birth weight infants. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association*. 1997;17(5):375-82.
17. Couchard M, Polge J, Bomsel F. [Hyaline membrane disease: diagnosis, radiologic surveillance, treatment and complications]. *Annales de radiologie*. 1974;17(7):669-83.
18. Ambalavanan N. Bronchopulmonary Dysplasia. Medscape Reference [Internet]. 2011 11/08/12.
19. Cools F, Askie LM, Offringa M, Asselin JM, Calvert SA, Courtney SE, et al. Elective high-frequency oscillatory versus conventional ventilation in preterm infants: a systematic review and meta-analysis of individual patients' data. *Lancet*. 2010;375(9731):2082-91.

20. Hayes D, Jr., Feola DJ, Murphy BS, Shook LA, Ballard HO. Pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Respiration; international review of thoracic diseases.* 2010;79(5):425-36.
21. Bancalari E, Gonzalez A. Clinical course and lung function abnormalities during development of neonatal chronic lung disease. In: Bland R, Coalson J, editors. *Chronic lung disease in early infancy.* New York: Marcel Dekker; 2000. p. 41-64.
22. Allison BJ, Crossley KJ, Flecknoe SJ, Davis PG, Morley CJ, Harding R, et al. Ventilation of the very immature lung in utero induces injury and BPD-like changes in lung structure in fetal sheep. *Pediatric research.* 2008;64(4):387-92.
23. Bland RD, Ertsey R, Mokres LM, Xu L, Jacobson BE, Jiang S, 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? *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology.* 2008;294(1):L3-14.
24. Bland RD, Mokres LM, Ertsey R, Jacobson BE, Jiang S, Rabinovitch M, et al. Mechanical ventilation with 40% oxygen reduces pulmonary expression of genes that regulate lung development and impairs alveolar septation in newborn mice. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology.* 2007;293(5):L1099-110.
25. Bland RD, Xu L, Ertsey R, Rabinovitch M, Albertine KH, Wynn KA, et al. Dysregulation of pulmonary elastin synthesis and assembly in preterm lambs with chronic lung disease. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology.* 2007;292(6):L1370-84.
26. Brew N, Hooper SB, Allison BJ, Wallace MJ, Harding R. Injury and repair in the very immature lung following brief mechanical ventilation. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology.* 2011;301(6):L917-26.
27. Kroon AA, Wang J, Kavanagh BP, Huang Z, Kuliszewski M, van Goudoever JB, et al. Prolonged mechanical ventilation induces cell cycle arrest in newborn rat lung. *PloS one.* 2011;6(2):e16910.
28. Mokres LM, Parai K, Hilgendorff A, Ertsey R, Alvira CM, Rabinovitch M, et al. Prolonged mechanical ventilation with air induces apoptosis and causes failure of alveolar septation and angiogenesis in lungs of newborn mice. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology.* 2010;298(1):L23-35.
29. Fischer HS, Buhner C. Avoiding endotracheal ventilation to prevent bronchopulmonary dysplasia: a meta-analysis. *Pediatrics.* 2013;132(5):e1351-60.
30. Hallman M, Haataja R. Genetic influences and neonatal lung disease. *Seminars in neonatology : SN.* 2003;8(1):19-27.
31. Rezvani M, Wilde J, Vitt P, Mailaparambil B, Grychtol R, Krueger M, et al. Association of a FGFR-4 gene polymorphism with bronchopulmonary dysplasia and neonatal respiratory distress. *Disease markers.* 2013;35(6):633-40.
32. Regev RH, Lusky A, Dolfen T, Litmanovitz I, Arnon S, Reichman B. Excess mortality and morbidity among small-for-gestational-age premature infants: a population-based study. *The Journal of pediatrics.* 2003;143(2):186-91.
33. Reiss I, Landmann E, Heckmann M, Misselwitz B, Gortner L. Increased risk of bronchopulmonary dysplasia and increased mortality in very preterm infants being small for gestational age. *Archives of gynecology and obstetrics.* 2003;269(1):40-4.
34. Van Marter LJ, Leviton A, Allred EN, Pagano M, Kuban KC. Hydration during the first days of life and the risk of bronchopulmonary dysplasia in low birth weight infants. *The Journal of pediatrics.* 1990;116(6):942-9.
35. Schmidt B, Roberts RS, Fanaroff A, Davis P, Kirpalani HM, Nwaesei C, et al. Indomethacin prophylaxis, patent ductus arteriosus, and the risk of bronchopulmonary dysplasia: further analyses from the Trial of Indomethacin Prophylaxis in Preterms (TIPP). *The Journal of pediatrics.* 2006;148(6):730-4.

36. Bao Y, Zhao ZY, Shi LP, Ma XL, Chen Z, Luo F. [Clinical significance of *Ureaplasma urealyticum* in bronchopulmonary dysplasia of prematurity]. *Zhonghua er ke za zhi Chinese journal of pediatrics*. 2012;50(10):767-70.
37. Abele-Horn M, Genzel-Boroviczeny O, Uhlig T, Zimmermann A, Peters J, Scholz M. *Ureaplasma urealyticum* colonization and bronchopulmonary dysplasia: a comparative prospective multicentre study. *European journal of pediatrics*. 1998;157(12):1004-11.
38. Biniwale MA, Ehrenkranz RA. The role of nutrition in the prevention and management of bronchopulmonary dysplasia. *Seminars in perinatology*. 2006;30(4):200-8.
39. Babu TA, Sharmila V. Vitamin A supplementation in late pregnancy can decrease the incidence of bronchopulmonary dysplasia in newborns. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet*. 2010;23(12):1468-9.
40. Watterberg KL, Scott SM. Evidence of early adrenal insufficiency in babies who develop bronchopulmonary dysplasia. *PEDIATRICS*. 1995;95(1):120-5.
41. Watterberg KL, Demers LM, Scott SM, Murphy S. Chorioamnionitis and early lung inflammation in infants in whom bronchopulmonary dysplasia develops. *PEDIATRICS*. 1996;97(2):210-5.
42. Thomas W, Speer CP. Chorioamnionitis is essential in the evolution of bronchopulmonary dysplasia - The case in favour. *Paediatric respiratory reviews*. 2013.
43. Lacaze-Masmonteil T. That Chorioamnionitis is a Risk Factor for Bronchopulmonary Dysplasia - The case against. *Paediatric respiratory reviews*. 2013.
44. Speer CP. Neonatal respiratory distress syndrome: an inflammatory disease? *Neonatology*. 2011;99(4):316-9.
45. Kallapur SG, Kramer BW, Jobe AH. *Ureaplasma* and BPD. *Seminars in perinatology*. 2013;37(2):94-101.
46. 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. *The Journal of pediatrics*. 1995;126(4):605-10.
47. Balany J, Bhandari V. Understanding the Impact of Infection, Inflammation, and Their Persistence in the Pathogenesis of Bronchopulmonary Dysplasia. *Frontiers in medicine*. 2015;2:90.
48. Jain D, Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia: clinical perspective. *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology*. 2014;100(3):134-44.
49. Coalson JJ. Pathology of Bronchopulmonary Dysplasia. *Seminars in perinatology*. 30: Elsevier; 2006. p. 179-84.
50. Husain AN, Siddiqui NH, Stocker JT. Pathology of arrested acinar development in postsurfactant bronchopulmonary dysplasia. *Human pathology*. 1998;29(7):710-7.
51. Pierce RA, Albertine KH, Starcher BC, Bohnsack JF, Carlton DP, Bland RD. Chronic lung injury in preterm lambs: disordered pulmonary elastin deposition. *The American journal of physiology*. 1997;272(3 Pt 1):L452-60.
52. Thebaud B, Abman SH. Bronchopulmonary dysplasia: where have all the vessels gone? Roles of angiogenic growth factors in chronic lung disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2007;175(10):978-85.
53. Abman SH, Mourani PM, Sontag M. Bronchopulmonary dysplasia: a genetic disease. *PEDIATRICS*. 2008;122(3):658-9.
54. Ryan RM, Ahmed Q, Lakshminrusimha S. Inflammatory mediators in the immunobiology of bronchopulmonary dysplasia. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2008;34(2):174-90.
55. Greenough A, Cox S, Alexander J. Health care utilisation of infants with chronic lung disease, related to hospitalisation for RSV infection. *Arch Dis Child*. 2001;85(6):463-8.

56. Anderson PJ, Doyle LW. Neurodevelopmental outcome of bronchopulmonary dysplasia. *Seminars in perinatology*. 2006;30(4):227-32.
57. Burri PH. The postnatal growth of the rat lung. 3. Morphology. *The Anatomical record*. 1974;180(1):77-98.
58. Burri PH. Structural aspects of postnatal lung development - alveolar formation and growth. *Biology of the neonate*. 2006;89(4):313-22.
59. Bland RD, Coalson J. Pathology of chronic lung disease of early infancy. . *Chronic lung disease in early infancy*2000.
60. Kapanci Y, AM K, M. R, G. G. Phenotypic modulation of alveolar myofibroblasts in transplanted human lungs. *Mod Pathol*. 1997;11.
61. Kimani PW, Holmes AJ, Grossmann RE, McGowan SE. PDGF-Ralpha gene expression predicts proliferation, but PDGF-A suppresses transdifferentiation of neonatal mouse lung myofibroblasts. *Respiratory research*. 2009;10:119.
62. Bostrom H, Willetts K, Pekny M, Leveen P, Lindahl P, Hedstrand H, et al. PDGF-A signaling is a critical event in lung alveolar myofibroblast development and alveogenesis. *Cell*. 1996;85(6):863-73.
63. Morrissey EE, Hogan BL. Preparing for the first breath: genetic and cellular mechanisms in lung development. *Developmental cell*. 2010;18(1):8-23.
64. Konietzko N, Wendel H, Wiesner B. *Erkrankungen der Lunge*. Berlin: Walter de Gruyter; 1994.
65. Tomasek J, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown R. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2002;3:349-63.
66. Dasgupta C, Sakurai R, Wang Y, Guo P, Ambalavanan N, Torday J, et al. Hyperoxia-induced neonatal rat lung injury involves activation of TGF- β and Wnt Signaling and is protected by rosiglitazone. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2009;296:1031-41.
67. Jakkula M, Le Cras TD, Gebb S, Hirth KP, Tuder RM, Voelkel NF, et al. Inhibition of angiogenesis decreases alveolarization in the developing rat lung. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2000;279(3):L600-7.
68. Sheppard D. Transforming Growth Factor β
A Central Modulator of Pulmonary and Airway Inflammation and Fibrosis. *Proc Am Thorac Soc*. 2006;3:413-7.
69. Lee CG, Kang HR, Homer RJ, Chupp G, Elias JA. Transgenic modeling of transforming growth factor-beta(1): role of apoptosis in fibrosis and alveolar remodeling. *Proc Am Thorac Soc*. 2006;3(5):418-23.
70. Sun T, Jayatilake D, Afink GB, Ataliotis P, Nister M, Richardson WD, et al. A human YAC transgene rescues craniofacial and neural tube development in PDGFRalpha knockout mice and uncovers a role for PDGFRalpha in prenatal lung growth. *Development (Cambridge, England)*. 2000;127(21):4519-29.
71. McGowan SE, Grossmann RE, Kimani PW, Holmes AJ. Platelet-derived growth factor receptor-alpha-expressing cells localize to the alveolar entry ring and have characteristics of myofibroblasts during pulmonary alveolar septal formation. *Anatomical record (Hoboken, NJ : 2007)*. 2008;291(12):1649-61.
72. Soriano P. The PDGF alpha receptor is required for neural crest cell development and for normal patterning of the somites. *Development (Cambridge, England)*. 1997;124(14):2691-700.
73. Popova AP, Bentley JK, Cui TX, Richardson MN, Linn MJ, Lei J, et al. Reduced platelet-derived growth factor receptor expression is a primary feature of human bronchopulmonary dysplasia. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2014.

74. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine*. 2003;9(6):669-76.
75. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenshtein M, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*. 1996;380(6573):435-9.
76. Compennolle V, Brusselmans K, Acker T, Hoet P, Tjwa M, Beck H, et al. Loss of HIF-2alpha and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nature medicine*. 2002;8(7):702-10.
77. Bhatt AJ, Pryhuber GS, Huyck H, Watkins RH, Metlay LA, Maniscalco WM. Disrupted pulmonary vasculature and decreased vascular endothelial growth factor, Flt-1, and TIE-2 in human infants dying with bronchopulmonary dysplasia. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001;164(10 Pt 1):1971-80.
78. De Paepe ME. Endoglin (CD105) up-regulation in pulmonary microvasculature of ventilated preterm infants. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2008;178(2).
79. Hasan J, Beharry KD, Valencia AM, Strauss A, Modanlou HD. Soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 in tracheal aspirate fluid of preterm neonates at birth may be predictive of bronchopulmonary dysplasia/chronic lung disease. *PEDIATRICS*. 2009;123(6):1541-7.
80. Assoian R, Fleurdelys B, Stevenson H, Miller P, Madtes D, Raines E, et al. Expression and secretion of type beta transforming growth factor by activated human macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987;84(17):6020-4.
81. Wipff PJ, Rifkin DB, Meister JJ, Hinz B. Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta1 from the extracellular matrix. *The Journal of cell biology*. 2007;179(6):1311-23.
82. Lu Q, Patel B, Harrington EO, Rounds S. Transforming growth factor-beta1 causes pulmonary microvascular endothelial cell apoptosis via ALK5. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2009;296(5):L825-38.
83. Alejandre-Alcazar MA, Kwapiszewska G, Reiss I, Amarie OV, Marsh LM, Sevilla-Perez J, et al. Hyperoxia modulates TGF-beta/BMP signaling in a mouse model of bronchopulmonary dysplasia. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2007;292(2):L537-49.
84. Bhandari V. Postnatal inflammation in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology*. 2014;100(3):189-201.
85. Kotecha S, Wangoo A, Silverman M, RJ S. Increase in the concentration of transforming growth factor beta-1 in bronchoalveolar lavage fluid before development of chronic lung disease of prematurity. *J Pediatr*. 1996;128(4).
86. Jones CA, Cayabyab RG, Kwong KY, Stotts C, Wong B, Hamdan H, et al. Undetectable interleukin (IL)-10 and persistent IL-8 expression early in hyaline membrane disease: a possible developmental basis for the predisposition to chronic lung inflammation in preterm newborns. *Pediatric research*. 1996;39(6):966-75.
87. Hilgendorff A, Parai K, Ertsey R, Jain N, Navarro EF, Peterson JL, et al. Inhibiting Lung Elastase Activity Enables Lung growth in Mechanically Ventilated Newborn Mice *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2011;184:537-46.
88. Hamilton TG, Klinghoffer RA, Corrin PD, Soriano P. Evolutionary divergence of platelet-derived growth factor alpha receptor signaling mechanisms. *Molecular and cellular biology*. 2003;23(11):4013-25.
89. Nagamoto T, Eguchi G, Beebe DC. Alpha-Smooth Muscle Actin Expression in Cultured Lens Epithelial Cells. *Investigative Ophthalmology&Visual Science*. 2000;41:1122-9.

90. Liu FT, Hsu DK, Zuberi RI, Kuwabara I, Chi EY, Henderson WR, Jr. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. *The American journal of pathology*. 1995;147(4):1016-28.
91. 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(184):544-7.
92. Lindahl P, Karlsson L, Hellstrom M, Gebre-Medhin S, Willetts K, Heath JK, et al. Alveogenesis failure in PDGF-A-deficient mice is coupled to lack of distal spreading of alveolar smooth muscle cell progenitors during lung development. *Development (Cambridge, England)*. 1997;124(20):3943-53.
93. Nauck M, Roth M, Tamm M, Eickelberg O, Wieland H, Stulz P, et al. Induction of vascular endothelial growth factor by platelet-activating factor and platelet-derived growth factor is downregulated by corticosteroids. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 1997;16(4):398-406.
94. Groneck P, Gotze-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.
95. Hillman NH, Polglase GR, Pillow JJ, Saito M, Kallapur SG, Jobe AH. Inflammation and lung maturation from stretch injury in preterm fetal sheep. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2011;300(2):L232-41.
96. Lau M, Masood A, Yi M, Belcastro R, Li J, Tanswell AK. Long-term failure of alveologenesi s after an early short-term exposure to a PDGF-receptor antagonist. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2011;300(4):L534-47.
97. Bland RD, Albertine KH, Pierce RA, Starcher BC, Carlton DP. Impaired alveolar development and abnormal lung elastin in preterm lambs with chronic lung injury: potential benefits of retinol treatment. *Biology of the neonate*. 2003;84(1):101-2.
98. Powell PP, Wang CC, Jones R. Differential regulation of the genes encoding platelet-derived growth factor receptor and its ligand in rat lung during microvascular and alveolar wall remodeling in hyperoxia. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 1992;7(3):278-85.
99. Matei D, Emerson RE, Lai YC, Baldrige LA, Rao J, Yiannoutsos C, et al. Autocrine activation of PDGFRalpha promotes the progression of ovarian cancer. *Oncogene*. 2006;25(14):2060-9.
100. Margraf LR, Tomashefski JF, Jr., Bruce MC, Dahms BB. Morphometric analysis of the lung in bronchopulmonary dysplasia. *The American review of respiratory disease*. 1991;143(2):391-400.
101. 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.
102. Bourbon J, Boucherat O, Chailley-Heu B, Delacourt C. Control mechanisms of lung alveolar development and their disorders in bronchopulmonary dysplasia. *Pediatric research*. 2005;57(5 Pt 2):38R-46R.
103. Ghaedi M, Calle EA, Mendez JJ, Gard AL, Balestrini J, Booth A, et al. Human iPS cell-derived alveolar epithelium repopulates lung extracellular matrix. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(11):4950-62.
104. May M, Strobel P, Preissshofen T, Seidenspinner S, Marx A, Speer CP. Apoptosis and proliferation in lungs of ventilated and oxygen-treated preterm infants. *The European respiratory journal*. 2004;23(1):113-21.
105. Coalson J. Pathology of chronic lung disease of early infancy. In: Bland RD, editor. *Chronic lung disease of early infancy*. New York: Marcel Dekker; 2000. p. 85-124.

106. Thebaud B, Ladha F, Michelakis ED, Sawicka M, Thurston G, Eaton F, et al. Vascular endothelial growth factor gene therapy increases survival, promotes lung angiogenesis, and prevents alveolar damage in hyperoxia-induced lung injury: evidence that angiogenesis participates in alveolarization. *Circulation*. 2005;112(16):2477-86.
107. Wilson WL, Mullen M, Olley PM, Rabinovitch M. Hyperoxia-induced pulmonary vascular and lung abnormalities in young rats and potential for recovery. *Pediatric research*. 1985;19(10):1059-67.
108. Voelkel NF, Vandivier RW, Tuder RM. Vascular endothelial growth factor in the lung. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2006;290(2):L209-21.
109. McGrath-Morrow SA, Cho C, Cho C, Zhen L, Hicklin DJ, Tuder RM. Vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade disrupts postnatal lung development. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2005;32(5):420-7.
110. Abman SH. Bronchopulmonary dysplasia: "a vascular hypothesis". *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001;164(10 Pt 1):1755-6.
111. Stenmark KR, Abman SH. Lung vascular development: implications for the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Annual review of physiology*. 2005;67:623-61.
112. Bland RD, Ling CY, Albertine KH, Carlton DP, MacRitchie AJ, Day RW, et al. Pulmonary vascular dysfunction in preterm lambs with chronic lung disease. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2003;285(1):L76-85.
113. Ding W, Knox TR, Tschumper RC, Wu W, Schwager SM, Boysen JC, et al. Platelet-derived growth factor (PDGF)-PDGF receptor interaction activates bone marrow-derived mesenchymal stromal cells derived from chronic lymphocytic leukemia: implications for an angiogenic switch. *Blood*. 2010;116(16):2984-93.
114. Chintalgattu V, Nair DM, Katwa LC. Cardiac myofibroblasts: a novel source of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors Flt-1 and KDR. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2003;35(3):277-86.
115. Fan B, Ma L, Li Q, Wang L, Zhou J, Wu J. Role of PDGFs/PDGFRs signaling pathway in myocardial fibrosis of DOCA/salt hypertensive rats. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2014;7(1):16-27.
116. Ball SG, Shuttleworth CA, Kielty CM. Vascular endothelial growth factor can signal through platelet-derived growth factor receptors. *The Journal of cell biology*. 2007;177(3):489-500.
117. 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. *Biology of the neonate*. 2004;86(1):1-5.
118. Turunen R, Nupponen I, Siitonen S, Repo H, Andersson S. Onset of mechanical ventilation is associated with rapid activation of circulating phagocytes in preterm infants. *Pediatrics*. 2006;117(2):448-54.
119. 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. *Archives of disease in childhood Fetal and neonatal edition*. 1995;72(2):F90-6.
120. Ogden BE, Murphy SA, Saunders GC, Pathak D, Johnson JD. Neonatal lung neutrophils and elastase/proteinase inhibitor imbalance. *The American review of respiratory disease*. 1984;130(5):817-21.
121. Merritt TA, Stuard ID, Puccia J, Wood B, Edwards DK, Finkelstein J, et al. Newborn tracheal aspirate cytology: classification during respiratory distress syndrome and bronchopulmonary dysplasia. *The Journal of pediatrics*. 1981;98(6):949-56.
122. Jackson JC, Chi EY, Wilson CB, Truog WE, Teh EC, Hodson WA. Sequence of inflammatory cell migration into lung during recovery from hyaline membrane disease in

- premature newborn monkeys. *The American review of respiratory disease*. 1987;135(4):937-40.
123. Assoian RK, Fleurdelys BE, Stevenson HC, Miller PJ, Madtes DK, Raines EW, et al. Expression and secretion of type beta transforming growth factor by activated human macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987;84(17):6020-4.
124. Grotendorst GR, Smale G, Pencev D. Production of transforming growth factor beta by human peripheral blood monocytes and neutrophils. *Journal of cellular physiology*. 1989;140(2):396-402.
125. Bonner JC, Badgett A, Lindroos PM, Osornio-Vargas AR. Transforming growth factor beta 1 downregulates the platelet-derived growth factor alpha-receptor subtype on human lung fibroblasts in vitro. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 1995;13(4):496-505.
126. Gauldie J, Galt T, Bonniaud P, Robbins C, Kelly M, Warburton D. Transfer of the active form of transforming growth factor-beta 1 gene to newborn rat lung induces changes consistent with bronchopulmonary dysplasia. *The American journal of pathology*. 2003;163(6):2575-84.
127. Hilgendorff A, Reiss I, Ehrhardt H, Eickelberg O, Alvira CM. Chronic lung disease in the preterm infant. Lessons learned from animal models. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2014;50(2):233-45.
128. Postlethwaite AE, Kang AH. Collagen-and collagen peptide-induced chemotaxis of human blood monocytes. *The Journal of experimental medicine*. 1976;143(6):1299-307.
129. Senior RM, Griffin GL, Mecham RP. Chemotactic activity of elastin-derived peptides. *The Journal of clinical investigation*. 1980;66(4):859-62.
130. Hunninghake GW, Davidson JM, Rennard S, Szapiel S, Gadek JE, Crystal RG. Elastin fragments attract macrophage precursors to diseased sites in pulmonary emphysema. *Science (New York, NY)*. 1981;212(4497):925-7.
131. Han RN, Buch S, Tseu I, Young J, Christie NA, Frndova H, et al. Changes in structure, mechanics, and insulin-like growth factor-related gene expression in the lungs of newborn rats exposed to air or 60% oxygen. *Pediatric research*. 1996;39(6):921-9.
132. 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. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1975;32(5):619-35.
133. Dager S, Ferkdadji L, Saumon G, Vardon G, Peuchmaur M, Gaultier C, et al. Neonatal exposure to 65% oxygen durably impairs lung architecture and breathing pattern in adult mice. *Chest*. 2003;123(2):530-8.
134. Wang H, Jafri A, Martin RJ, Nnanabu J, Farver C, Prakash YS, et al. Severity of neonatal hyperoxia determines structural and functional changes in developing mouse airway. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2014;307(4):L295-301.
135. Nardiello C, Mizikova I, Silva DM, Ruiz-Camp J, Mayer K, Vadasz I, et al. Modelling bronchopulmonary dysplasia in mice: how much oxygen is enough? *Disease models & mechanisms*. 2016.
136. Del Riccio V, van Tuyl M, Post M. Apoptosis in lung development and neonatal lung injury. *Pediatric research*. 2004;55(2):183-9.
137. Olson LE, Soriano P. Increased PDGFRalpha activation disrupts connective tissue development and drives systemic fibrosis. *Developmental cell*. 2009;16(2):303-13.

Eidesstattliche Versicherung

Thiel, Isabella

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Die Rolle des Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha (PDGF-R α) in der Genese pathologischer Veränderungen durch die mechanische Beatmung der neugeborenen Lunge

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Zürich, 01.06.2019

Ort, Datum

Isabella Thiel

Unterschrift Doktorandin/Doktorand