

**Medizinische Fakultät der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

**Bedeutung des *Receptor for advanced glycation end-products*
bei der Lungenentwicklung und der Hyperoxie-induzierten
bronchopulmonalen Dysplasie am Mausmodell**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizinischen Wissenschaften (Dr. rer. medic.)
in der Fachrichtung Molekulare Medizin

von Anke Kindermann

geboren am 29.10.1984 in Wippra

Betreuer*in: PD Dr. rer. nat. Babett Bartling

Gutachter*innen:

- Prof. Dr. med. Oliver Thews
- Prof. Dr. med. Ulrich H. Thome, Leipzig

21.01.2021

18.10.2021

Referat

Die Unreife der Lunge bei Frühgeborenen kann zu einem lebensbedrohlichen Sauerstoffmangel führen. Durch die zum Überleben notwendigen Behandlung mit hohen Sauerstoffkonzentrationen (Hyperoxie) sowie dem Auftreten von Inflammationen entwickeln 30 % der Frühgeborenen mit einem Gewicht < 1000 g eine bronchopulmonale Dysplasie (BPD), die durch eine Störung der Alveolarisierung der Lunge charakterisiert ist. Inflammationen werden durch den *Receptor for advanced glycation end-products* (RAGE) verstärkt, der basal bereits sehr hoch in der Lunge exprimiert wird. Seine spezifische Lokalisation auf den Alveolarzellen Typ I (AT I-Zellen) lässt zudem auf weitere Funktionen in der Lunge schließen. Aus diesem Grund soll die vorliegende Arbeit die Bedeutung von RAGE bei der Lungenentwicklung und der Hyperoxie-induzierten BPD untersuchen.

Dafür wurden Wildtyp- (RAGE^{+/+}) und RAGE-Knockout-Mäuse (RAGE^{-/-}) in einem Hyperoxie-induzierten BPD-Modell untersucht. Die neugeborenen Mäuse wurden für 14 Tage moderater (50 % O₂) oder starker Hyperoxie (75 % O₂) ausgesetzt und erholten sich anschließend für 45 bzw. 105 Tage bei Normoxie (21 % O₂). Im Anschluss wurde die Lunge *in situ* (histologische Struktur und Elastinfasern der Lunge, Expression von mRNA/Proteinen für AT-Marker, bronchoalveoläre Lavage (BAL), antioxidative Enzyme und ROS-Bildung) und *ex vivo* (Lungenfunktion) untersucht sowie die Hämatogramme analysiert.

RAGE hat keinen Einfluss auf das Überleben, Körpergewicht und Hämatogramm bei Normoxie. Jedoch sind bei RAGE^{-/-}-Mäusen die Menge an Proteinen in der BAL erhöht, die Alveolarwände der neugeborenen Tiere dicker und die Anzahl der Alveolen geringer als bei RAGE^{+/+}-Mäusen. Die mRNA-Expression der AT-Marker AQP5 und SP-C sind in RAGE^{-/-}-Mäusen erhöht, die Proteinmengen hingegen verringert. Auf die Expression antioxidativer Enzyme hat RAGE keinen Einfluss. Die Compliance der Lunge ist in den RAGE^{-/-}-Mäusen basal erhöht. Neonatale Hyperoxie führt zur Vergrößerung der Alveolen, wovon hauptsächlich die großen Lufträume betroffen sind, und zur Verdickung der Alveolarwände. Starke neonatale Hyperoxie führt ausschließlich bei RAGE^{+/+}-Mäusen zur Fragmentierung der elastischen Fasern und Erhöhung der Compliance.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass RAGE die alveolo-kapilläre Membran abdichtet und sich positiv auf die Alveolarisierung auswirkt. Außerdem stabilisiert RAGE die AT-spezifischen Proteine AQP5 und SP-C. Postnatale Hyperoxie stört die Alveolarisierung und führt RAGE-abhängig zur Strukturveränderung von Elastinfasern. Eine BPD konnte nur bei starker postnataler Hyperoxie ausgelöst werden, wobei RAGE die BPD noch verstärkt. RAGE hat demnach positive Effekte auf die Lungenentwicklung, wirkt sich aber negativ auf die Hyperoxie-induzierte BPD aus.

Kindermann, Anke: Bedeutung des *Receptor for advanced glycation end-products* bei der Lungenentwicklung und der Hyperoxie-induzierten bronchopulmonalen Dysplasie am Mausmodell, Halle (Saale), Univ., Med. Fak.; Diss., 79 Seiten, 2020

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Makro- und mikroskopischer Aufbau der humanen Lunge	1
1.1.1	Pneumozyten	2
1.1.2	<i>Receptor for advanced glycation end-products</i>	2
1.1.3	Surfactant	5
1.2	Entwicklung der Lunge	5
1.2.1	Pränatale Lungenentwicklung	5
1.2.2	Postnatale Lungenentwicklung	6
1.2.3	RAGE in der Lungenentwicklung	8
1.3	Bronchopulmonale Dysplasie	9
1.4	Reaktive Sauerstoffspezies	10
1.5	Hyperoxie-induziertes BPD-Modell und -Studien	11
2	Zielstellung	18
3	Material und Methoden	19
3.1	Maushaltung	19
3.2	Studien-Design	19
3.3	Analyse der bronchoalveolären Lavage	20
3.3.1	Zytologische Analyse	20
3.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	21
3.3.3	Albumin-ELISA	21
3.3.4	IgM-ELISA	21
3.3.5	sRAGE-ELISA	21
3.4	Erstellung der Hämatogramme	22
3.5	Präparation der murinen Lunge	22
3.6	<i>Water-to-dry-weight-Ratio</i>	22
3.7	Proteinbiochemische Analyse des Lungengewebes	22
3.7.1	Herstellung der Proteinlysate aus murinen Lungengewebe	23
3.7.2	Western Blot-Analyse	23
3.7.3	Dot Blot-Analyse	24
3.8	RNA-Analyse des Lungengewebes	25
3.8.1	RNA-Präparation und Konzentrationsbestimmung	25
3.8.2	Reverse Transkription	25
3.8.3	Quantitative Polymerasekettenreaktion	26
3.9	Elektronenspinresonanz-Spektroskopie	26
3.9.1	Herstellung der Lungenlysate für die ESR-Analyse	27
3.9.2	Messung mit ESR-Spektrometer	27
3.10	Histologische Lungenanalysen	27
3.10.1	Paraffineinbettung	27
3.10.2	Herstellung der Gewebeschnitte	28
3.10.3	Hämatoxylin- und Eosinfärbung	28

3.10.4	Strukturanalyse des Lungengewebes	28
3.11	Analyse der elastischen Fasern	29
3.11.1	Elastin-Färbung nach Hart	29
3.11.2	Auswertung der Elastinfärbung	29
3.12	Immunhistologische RAGE-Färbung	30
3.12.1	Vorbereitung der Präparate	30
3.12.2	Spezifische RAGE-Färbung	30
3.13	Analyse der Lungenfunktion	30
3.14	Statistische Auswertung	31
4	Ergebnisse	32
4.1	RAGE-abhängige Lungenentwicklung bei der Maus	32
4.2	Einfluss neonataler Hyperoxie auf das Überleben und weitere Parameter der Mäuse	34
4.3	Einfluss neonataler Hyperoxie auf die Lungenstruktur	37
4.4	Einfluss neonataler Hyperoxie auf Quantität und Qualität der elastischen Fasern .	39
4.5	Einfluss neonataler Hyperoxie auf Faktoren des Alveolarepithels	42
4.6	Einfluss neonataler Hyperoxie auf die Funktion der Lunge	45
5	Diskussion	48
5.1	RAGE fördert die Abdichtung der alveolo-kapillären Membran	48
5.2	RAGE hat keinen Einfluss auf den neonatalen entwicklungsabhängigen Gehalt an ROS-Bildung in der Lunge	49
5.3	RAGE hat keinen Einfluss auf den neonatalen entwicklungsabhängigen Gehalt an anti-oxidativen Enzymen in der Lunge	49
5.4	RAGE fördert in der frühen neonatalen Entwicklung die Stabilisierung des AT-Zell- relevanten Proteins AQP5 in der Lunge	50
5.5	RAGE fördert in der frühen neonatalen Entwicklung die Stabilisierung des AT-Zell- relevanten Proteins SP-C in der Lunge	50
5.6	(s)RAGE und Inflammationen	51
5.7	RAGE fördert die Alveolarisierung	52
5.8	Neonatale Hyperoxie führt zur Störung der Alveolarisierung	53
5.9	Neonatale Hyperoxie führt zu RAGE-abhängigen Strukturveränderungen von Elast- infasern	54
5.10	BPD durch starke neonatale Hyperoxie wird durch RAGE verstärkt	55
5.11	Neonatale Hyperoxie verändert konzentrationsabhängig die Konzentration der Thrombozyten	57
5.12	Starke neonatale Hyperoxie, aber nicht moderate Hyperoxie, induziert eine BPD in der Maus	57
5.13	Limitationen des Hyperoxie-induzierten Tiermodells	58
5.14	Aussichten	59
6	Zusammenfassung	60
7	Literaturverzeichnis	63
8	Thesen der Dissertation	78

9 Erklärungen

VI

10 Danksagungen

VII

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

AGE	<i>advanced glycation end-products</i>
ALI	<i>acute lung injury</i>
AQP5	Aquaporin-5
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i>
AT I/II	Alveolarzellen Typ I/II
ATP	Adenosintriphosphat
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BPD	bronchopulmonale Dysplasie
BSA	bovines Serumalbumin
CAT	Katalase
•CP	3-Carboxy-2,2,5,5-Tetra-Methyl-Pyrrolin-1-Oxyl
CPH	1-Hydroxy-3-Carboxy-2,2,5,5,-Tetramethyl-Pyrrolidin
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>
Cu	Kupfer
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> = Desoxyribonukleinsäure
ECM	extrazelluläre Matrix
ELN	Elastin
engl	englisch
esRAGE	<i>endogenous secretory RAGE</i>
GPx	Glutathionreduktase
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HMGB1	<i>High-Mobility-Group-Protein B1</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IgM	Immunglobulin M
KM	Knochenmark
LPS	Lipopolysaccharid
LOX	Lysyloxidase
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
mH	moderate neonatale Hyperoxie
MK	Megakaryozyten
MLI	<i>mean linear intercept</i>
MMP	Matrixmetalloproteasen
Mn	Mangan
N	Normoxie
N ₂	molekularer Stickstoff
NADPH	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NF- κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
O ₂	molekularer Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxid
pc	polyklonal
p21ras	G-Protein Ras (Rat sarcoma)

p.m.	postmenstruell
PND	postnataler Tag
pO ₂	partieller Sauerstoffdruck
RAGE	<i>Receptor for advanced glycation end-products</i>
RAGE ^{+/+}	Wildtyp
RAGE ^{-/-}	RAGE-Knockout
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RT	Raumtemperatur
S100	<i>S100 calcium-binding protein</i> = Calgranulin C
sH	starke neonatale Hyperoxie
SOD	Superoxid-Dismutase
SP-A/B/C/D	Surfactantprotein A/B/C/D
sRAGE	<i>soluble</i> RAGE
U	Unit
üN	über Nacht
WT	Wildtyp
Zn	Zink

1 Einleitung

Kein anderes Organ verändert sich zum Zeitpunkt der Geburt so extrem wie die humane Lunge. Während der Schwangerschaft wird der Fötus in der Fruchtblase über die Plazenta und Nabelschnur ausreichend mit Sauerstoff (O₂) aus dem maternalen Kreislauf versorgt. Die Lunge des Fötus ist zu diesem Zeitpunkt noch zusammengefaltet und mit einer in der Lunge produzierten Flüssigkeit gefüllt. Bereits im Mutterleib trainiert der Fötus die Atem- und Zwerchfellmuskulatur. Es bedarf eines enormen Drucks, um die Lunge das erste Mal nach der Geburt vollständig zu entfalten und mit Luft zu füllen, weshalb der erste Atemzug eines neugeborenen Babys besonders kraftvoll sein muss. Die zu Beginn hochfrequente, unregelmäßige Atmung stabilisiert sich nach einiger Zeit und es folgt eine regelmäßige Ventilation von 35 - 40 Atemzüge/min. Im weiteren Verlauf unseres Lebens ist die Respiration (Atmung) meist ein Automatismus, dessen Bedeutung nur dann in unser Bewusstsein rückt, wenn wir uns darauf fokussieren oder die physiologische Funktion gestört ist.

1.1 Makro- und mikroskopischer Aufbau der humanen Lunge

Die Lunge befindet sich in der Pleurahöhle des Thorax und ist mit viszeraler Pleura (Lungenfell) bedeckt. Der Mensch besitzt zwei Lungenflügel: der linke Lungenflügel besteht aus einem oberen und unteren Lungenlappen, der rechte Lungenflügel unterteilt sich in einen oberen, mittleren und unteren Lungenlappen. Nach der Teilung der *Trachea* (Lufttröhre) an der Bifurkation in die beiden Hauptbronchien, verzweigen sich diese in immer kleiner werdende Segmentbronchien bis in die *Bronchioli terminales* (Terminalbronchien). An der bronchoalveolären Übergangszone gehen die konduktiven, d.h. luftleitenden Atemwege direkt in den respiratorischen Abschnitt der Lunge über, die am Gasaustausch beteiligt sind. In diesem Bereich befinden sich die *Bronchioli respiratorii*, die schon einzelne Alveolen enthalten. Diese münden in den *Ductus alveolaris* (Alveolargang), der schließlich im *Sacculus alveolaris* (Alveolarsack) und den Alveolen (Lungenbläschen) endet. Das gesamte Gewebe und alle Luftwege sowie Alveolen, die einem einzigen *Bronchiolus terminalis* zuzuordnen sind, werden als Azinus bezeichnet. Ein Lungenazinus bildet den funktionellen Endabschnitt der Lunge. Hier findet der Gasaustausch statt.

In der Trachea und dem Bronchialsystem besteht das Epithel aus mehrreihigem, hochprismatischem Flimmerepithel. In den Bronchiolen überwiegt einschichtiges, iso- bis hochprismatisches Flimmerepithel, das zum Teil keine Zilie (Flimmerhärchen) mehr trägt. Unter der Epithelschicht befindet sich die *Lamina propria*, in der sich glatte Muskulatur befindet. Das sich anschließende Bindegewebe enthält große Mengen elastischer Fasern sowie muköse und seröse Drüsen, die in die Bronchien münden. In den großen Bronchien befindet sich hyaliner Knorpel, der die Bronchien offen hält. Die Keulenzellen (veraltet Clara-Zellen) des respiratorischen Epithels in den Bronchiolen sind sekretorisch aktive Zellen, die Proteine, die der Immunabwehr dienen, aber auch die Surfactantproteine A und D (SP-A, SP-D) sezernieren. In den Alveolen befinden sich Pneumozyten vom Typ I und Typ II und aus dem Blut stammende Makrophagen.

1.1.1 Pneumozyten

Die Alveolen bilden die funktionelle Struktur der Lunge. Das Alveolarepithel besteht aus zwei Arten von Pneumozyten. Die flachen Alveolarzellen Typ I (AT I-Zellen) sind teilungsunfähige, ausdifferenzierte Zellen, die 50 - 100 μm groß sind und ein Volumen von 2000 - 3000 μm^3 besitzen. Sie machen ca. 8 - 10 % aller Lungenzellen aus und bedecken dabei etwa 95 % der Lungenoberfläche. Sie bilden zusammen mit den kapillären Endothelzellen und den dazwischenliegenden Basalmembranen die Blut-Luft-Schranke, die im Folgenden als alveolo-kapilläre Membran bezeichnet wird und den Gasaustausch ermöglicht. Außerdem sind AT I-Zellen für die Wasserpermeabilität und die Regulation der Alveolarfluidhomöostase der Lunge verantwortlich. Für diese Funktionen spielt das Wasserkanalprotein Aquaporin 5 (AQP5) auf der apikalen Zelloberfläche der AT I-Zellen eine essentielle Rolle. In Zellanalysen dient AQP5 als Oberflächenmarker für die AT I-Zellen, ebenso wie der *Receptor for advanced glycation end-products* (RAGE) (Fehrenbach *et al.*, 1998; Shirasawa *et al.*, 2004).

Die kubischen Typ II-Pneumozyten (AT II-Zellen) sind nur etwa 10 μm groß und haben ein Volumen zwischen 450 - 900 μm^3 . Sie machen etwa 15 % aller Lungenzellen aus, bedecken aber lediglich 5 % der gesamten Lungenoberfläche. Die Hauptfunktionen der AT II-Zellen sind Produktion, Sekretion und Recyceln von Surfactant, einem oberflächenaktiven Tensid. Außerdem sind AT II-Zellen, im Gegensatz zu AT I-Zellen, teilungsfähig und können beschädigte AT I-Zellen ersetzen.

1.1.2 *Receptor for advanced glycation end-products*

Der *Receptor for advanced glycation end-products* (RAGE) ist ein Zelloberflächen-Rezeptor, der in der Lunge extrem hoch exprimiert wird (Neeper *et al.*, 1992; Demling *et al.*, 2006). RAGE besteht aus drei extrazellulären Immunglobulin(Ig)-ähnlichen Domänen (Abb. 1): der V(ariablen)-Domäne, die die Bindestelle für die Liganden darstellt, der C(onstante)1-Domäne, welche bei der Erkennung des Liganden eine entscheidende Rolle spielt, sowie der C2-Domäne. Über eine transmembranäre Helix ist RAGE in der Zellmembran verankert. Eine kurze zytoplasmatische Domäne ist für die Entstehung des intrazellulären Signals und die nachfolgende NF- κ B-Aktivierung verantwortlich (Fritz, 2011). RAGE ist zudem in der Lage parallele (Dattilo *et al.*, 2007) und anti-parallele Homodimere zu bilden (Al-Robaiy *et al.*, 2013).

Durch alternatives Splicing oder Spaltung des Membran-ständigen RAGE entstehen verschiedene lösliche RAGE-Isoformen (Hudson *et al.*, 2008) (Abb. 1). Zu diesen gehören das *endogenous secretory* RAGE (esRAGE) und das *soluble* RAGE (sRAGE). Letzteres findet sich vor allem in der bronchoalveolären Lavage (BAL). Die löslichen RAGE-Isoformen besitzen die Fähigkeit, die RAGE-Signalwirkung zu verringern, in dem sie als „Köder“ für die RAGE-Liganden dienen, diese binden, jedoch kein Signal innerhalb der Zelle weiterleiten (Fritz, 2011). Es konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen (COPD) die sRAGE-Konzentration verringert (Yan *et al.*, 2003; Miniati *et al.*, 2011) und die esRAGE-Konzentration bei Asthmapatienten erhöht ist (Watanabe *et al.*, 2011).

RAGE gehört aufgrund seiner Proteinstruktur zur Ig-Familie (Neeper *et al.*, 1992; Schmidt *et al.*, 1992; Bierhaus *et al.*, 2005) und spielt eine zentrale Rolle als Signalmolekül im angeborenen

Immunsystem. RAGE wird neben den *advanced glycation end-products* (AGEs) (Neeper *et al.*, 1992) von diversen proinflammatorischen Liganden wie z.B. HMGB1 (*high-mobility group protein 1*) (Muhammad *et al.*, 2008; Alexiou *et al.*, 2010), S100/Calgranulin (Hofmann *et al.*, 1999) und β -Amyloid (Yan *et al.*, 1996) aktiviert. Dabei erkennt RAGE dreidimensionale Strukturen wie z.B. β -Faltblattstrukturen und Fibrillen, weshalb RAGE auch zu den Mustererkennungsrezeptoren gezählt wird (Fritz, 2011). Eine Liganden-Rezeptor-Interaktion induziert ein anhaltendes post-Rezeptorsignal, das zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B führt (Bierhaus *et al.*, 2001). RAGE trägt durch die NF- κ B-Aktivierung zur Entstehung von Inflammationen bei, da viele inflammatorische Gene und deren Genprodukte, wie z.B. Interleukin-6 von NF- κ B kontrolliert werden (Londhe *et al.*, 2008). Weiterhin führt eine RAGE-Aktivierung über eine positive Feedback-Schleife und die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen zu einer Hochregulation des Rezeptors selbst (Stern *et al.*, 2002). RAGE konnte mit einer ganzen Reihe an chronischen Erkrankungen, wie z.B. Diabetes (Vlassara *et al.*, 1994), aber auch inflammatorischen Prozessen (Alexiou *et al.*, 2010), Atherosklerose (Koyama *et al.*, 2005) sowie neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. Alzheimer (Yan *et al.*, 1996) und Krebserkrankungen (Basappa *et al.*, 2014) in Verbindung gebracht werden.

Unabhängig von der immunologischen Bedeutung ist die allgemeine Rolle von RAGE in der Lunge nur bedingt geklärt. Bisher konnte gezeigt werden, dass RAGE in AT I-Zellen spezifisch an der basalen und lateralen Membran lokalisiert ist (Fehrenbach *et al.*, 1998; Shirasawa *et al.*, 2004), die Zelladhäsion zur extrazellulären Matrix (ECM) fördert (Bartling *et al.*, 2005; Demling *et al.*, 2006) und bei Zell-Zell-Kontakten eine Rolle spielt (Bartling *et al.*, 2006; Demling *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu allen anderen Organen und Geweben, bleibt die Expression von RAGE in der Lunge postnatal unter physiologischen Bedingungen weiter hochreguliert. Eine Verringerung der pulmonalen Expression von RAGE steht im Zusammenhang mit pathophysiologischen Veränderungen des Lungengewebes, wie es z.B. bei Tumoren (Bartling *et al.*, 2005), Fibrose (Queisser *et al.*, 2008) und chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen (COPD) auftritt (Ohlmeier *et al.*, 2010).

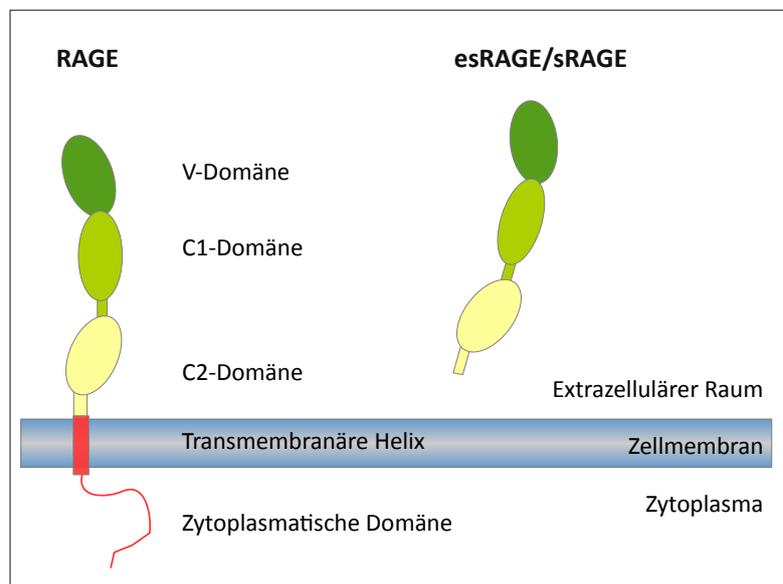


Abbildung 1: RAGE-Aufbau und -Isoformen. RAGE besteht aus einer variablen V-Domäne und den beiden konstanten Domänen C1 und C2, die sich im extrazellulären Raum befinden, einer Transmembran-Helix, die den Rezeptor in der Zellmembran verankert sowie einer zytoplasmatischen Domäne. Zu den bedeutendsten Isoformen zählen esRAGE und sRAGE, die nur aus den Domänen V, C1 und C2 bestehen und ausschließlich im extrazellulären Raum vorkommen. (Abb. verändert nach Fritz, 2011)

1.1.3 Surfactant

Der Anti-Atelektasefaktor Surfactant (*surface active agent*) ist ein oberflächenaktives Tensid, welches die Innenseite der Alveolen überzieht. Er wird von AT II-Zellen synthetisiert und in deren Speicherorganellen, den Lamellenkörpern (*lamellar bodies*) gespeichert. Surfactant besteht aus Phospholipiden, überwiegend Lecithin und verschiedenen assoziierten Proteinen, den Surfactant-Proteinen A - D (SP-A, SP-B, SP-C, SP-D). Diese können als Marker für AT II-Zellen genutzt werden. Die Hauptaufgabe des Surfactant liegt in der Reduktion der alveolären Oberflächenspannung bei der Expiration, wodurch der Kollaps der Alveolen (Atelektase) verhindert wird. Außerdem führt Surfactant zur Senkung des Eröffnungsdrucks kleiner Alveolen und Erhöhung der Lungen-Nachgiebigkeit (Compliance), so dass kleinere Druckdifferenzen und weniger Atemarbeit zur Inspiration benötigt werden.

Bei Frühgeborenen besteht aufgrund der Unreife der Lunge oftmals ein Surfactantmangel, der zu einem Atemnotsyndrom (*respiratory distress syndrome*, RDS) führt. In diesen Fällen ist neben entsprechenden Beatmungsstrategien eine Surfactantapplikation das Mittel der Wahl, welche entweder als prophylaktische (ab Geburt bis 60 min postnatal) oder Interventionsbehandlung (> 1-2 h postnatal bei klinischen und/oder radiologischen Zeichen des RDS) verabreicht wird (Surfactanttherapie des Atemnotsyndroms Frühgeborener (RDS); Leitlinie der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin (GNPI) und der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin (DGKJ); gültig bis 01.01.2021).

1.2 Entwicklung der Lunge

Die Entwicklung der Lunge ist ein kontinuierlicher Prozess, der in der embryonalen Periode der Schwangerschaft beginnt und bis in die Kindheit bzw. das frühe Erwachsenenalter andauert. Über die genauen Kontroll- und Regulationsmechanismen ist bisher wenig bekannt, jedoch unterliegen diese der Interaktion zwischen Mesenchym und Epithel (Roth-Kleiner und Post, 2003). Die Lungenentwicklung umfasst verschiedene Phasen (Abb. 2). Zu den pränatalen Phasen zählen die embryonale, die pseudoglanduläre, die kanalikuläre und die sakkuläre Phase. Postnatal schließt sich die Alveolarisierungsphase an.

1.2.1 Pränatale Lungenentwicklung

Die Lungenentwicklung beginnt beim Menschen etwa vier Wochen nach der Konzeption (Befruchtung) in der Periode der Organogenese mit der embryonalen Phase (4. - 6. Schwangerschaftswoche (SSW)). Aus einer ventralen Knospe des Vorderdarm entstehen durch dichotome Teilung die beiden Lungenflügel und die ersten Bronchien (Roth-Kleiner und Post, 2003). In der sich anschließenden pseudoglandulären Phase (7. - 16. SSW) entstehen alle konduktiven Luftwege, der hyaline Knorpel um die Hauptbronchien, glatte Muskelzellen, muköse Drüsen und die ersten unreifen AT II-Zellen (Smith *et al.*, 2010). In der kanalikulären Phase (17. - 24. SSW) entwickelt sich das pulmonale Parenchym bis hin zum *Bronchioli respiratorii*. Außerdem entsteht die erste Blut-Luft-Schranke (Roth-Kleiner und Post, 2003) und die Alveolarzellen können in Typ I und -II unterschieden werden (Smith *et al.*, 2010). Der Beginn der sakkulären Phase (25. - Geburt) stellt momentan die Grenze

für die Lebensfähigkeit von Frühgeborenen dar. Es entstehen die respiratorischen Luftwege bis hin zu den *Sacculi alveolares* (Alveolarsack). Hier kann auch das erste Mal von echten Alveolen gesprochen werden. Charakteristisch ist die Ausbildung einer doppelten Kapillarschicht in den primären Septen (Smith *et al.*, 2010). Die Entwicklung des Surfactant-Systems (20. - 32. SSW) findet parallel zur sakkulären Phase in den AT II-Zellen statt. Die Sekretion des Surfactant beginnt jedoch frühestens in der 30. SSW (Smith *et al.*, 2010).

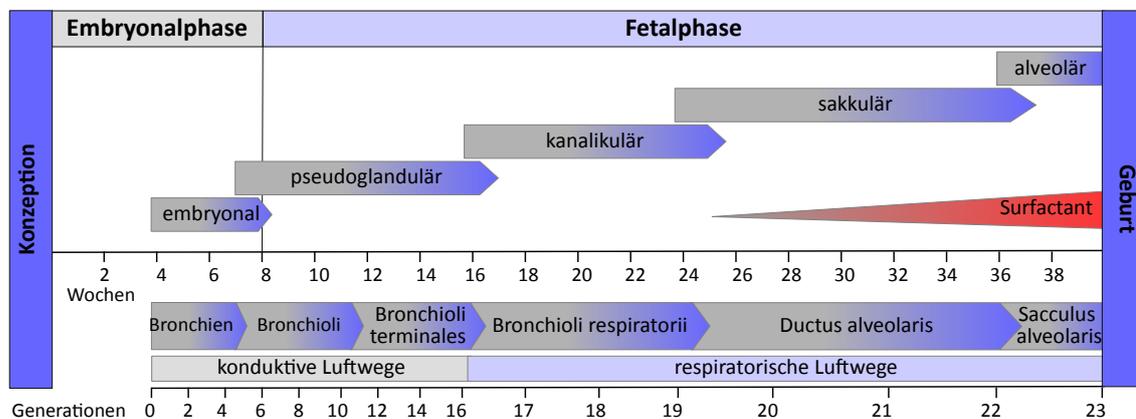


Abbildung 2: Schematische Übersicht zur pränatalen Lungenentwicklung beim Menschen. (Abb. verändert nach <http://www.embryology.ch/allemand/rrespiratory/phasen07.html>, Stand 17.06.2019)

1.2.2 Postnatale Lungenentwicklung

Postnatal kommt es zur Remodellierung des Lungenparenchyms und der Kapillaren sowie zur Alveolarentwicklung. Beim Menschen finden 85 % der Alveolarisierung erst nach der Geburt statt (Smith *et al.*, 2010). Die peripheren, respiratorischen Lufträumen entsprechen dem sakkulären Typ und sind charakterisiert durch dicke Septen mit einer zentralen Schicht Bindegewebe zwischen einem doppelten Kapillarnetzwerk (Burri, 2006). Die Grundstrukturen für die Alveolarisierung bilden diese sog. primären Septen.

Die Alveolarisierungsphase (36. SSW – 1 - 2 Lebensjahr) lässt sich in drei Stufen unterteilen (Abb. 3):

1. Stufe: sekundäre Septation oder alveoläre Phase (Geburt - 12. - 24. Lebensmonat)

Die Bildung neuer Alveolarsepten erfolgt aus unreifen, bereits existierenden primären Septen, die durch eine doppelte Schicht Kapillargefäße charakterisiert sind (Mund *et al.*, 2008). Durch senkrecht Wachstum in den Luftraum bilden sich die sog. sekundären Septen (Roth-Kleiner und Post, 2003), die ebenfalls ein doppeltes Kapillarnetz besitzen. Dadurch erhalten die Septen ein kammartiges Aussehen und es lassen sich erstmals die Konturen der zukünftigen Alveolen erkennen (Burri, 2006).

2. Stufe: mikrovaskuläre Reifung (6. Lebensmonat - 2. Lebensjahr)

Durch Reduktion des interkalierenden, septalen Interstitiums nähern sich die zwei Kapillargefäße an und fusionieren zu einem einfachen Kapillarnetz (Roth-Kleiner und Post, 2003; Burri, 2006). Parallel dazu verlängern und verdünnen sich die sekundären Septen, was den direkten Kontakt

zwischen dem Alveolarkapillarendothelium und den AT I-Zellen ermöglicht. Ab diesem Zeitpunkt spricht man von reifen Septen.

3. Stufe: späte Alveolarisierung (ab dem 2. Lebensjahr)

Nach dem 2. Lebensjahr kommt es hauptsächlich zum Wachstum der Lungenbestandteile. Dabei werden auch weiterhin neue Alveolarsepten, jedoch aus reifen, bereits existierenden Septen gebildet (Mund *et al.*, 2008). Ab dem 3. Lebensjahr entspricht die juvenile Lunge einer Mini-version der adulten Lunge. Auch in der adulten Lunge finden sich noch unreife Septen (Burri, 2006).

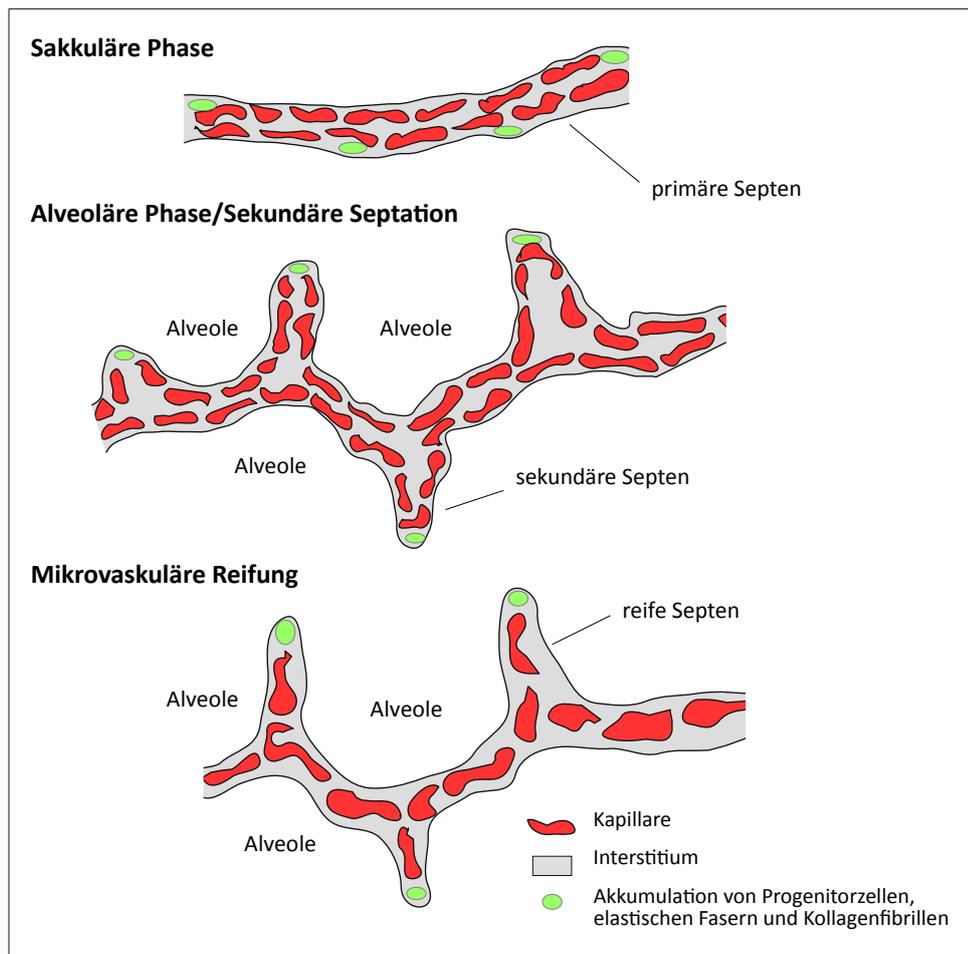


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Septenreifung als bedeutender Teil der postnatalen Lungenentwicklung. (Abb. verändert nach Schittny *et al.*, 2008)

Als wichtiges Versuchstier für die Lungenforschung hat sich die Maus herausgestellt, da die Phasen der Lungenentwicklung bei Maus und Mensch sehr ähnlich sind (Chao *et al.*, 2015) (Tab. 1). Es gibt jedoch auch Unterschiede: beim Menschen hat sich bei der Geburt bereits ein Teil der Alveolen gebildet, da die Alveolarisierung bereits in der 32. SSW beginnt. Bei Mäusen beginnt die Alveolarisierung erst am 5. postnatalen Tag (PND5) und endet an PND30, weshalb alle Alveolen erst nach der Geburt ausgebildet werden (Schittny *et al.*, 2008). Genau durch diesen Unterschied eignen sich Mäuse sehr gut als Model für die frühreife Lunge. Bei Mäusen entspricht die Zeit von der Geburt bis PND30 dem Gestationsalter von der 28. Woche bis zum 36. Lebensmonat beim

Menschen (Roth-Kleiner und Post, 2003). Somit können Studien zur Entwicklung frühreifer Lungen an ausgereiften neugeborenen Mäusen durchgeführt werden.

Dabei ist allerdings zu beachten, dass es einige anatomische Unterschiede zum Menschen gibt. Bei der Maus besitzt der linke Lungenflügel, im Gegensatz zum Menschen, nur einen Lungenlappen. Der rechte Lungenflügel der Maus wird in einen cranialen, mittleren, caudalen und akzessorischen Lappen, also vier Lappen eingeteilt. Auch gibt es auf mikroskopischer Ebene Unterschiede: die *Bronchioli respiratorii* fehlen bei der Maus vollständig (McInnes, 2014). Becherzellen, auch Goblet-Zellen genannt, kommen in der Mauslunge ebenfalls nicht vor (Krinke und Weber, 2012).

Tabelle 1: Vergleichende Übersicht über Phasen der Lungenentwicklung bei Mensch und Maus

Phasen	Mensch	Maus	Entwicklung
embryonale	4. - 6. SSW	E9,5 - E11,0	- lobuläre Bronchien
pseudo-glanduläre	7. - 16. SSW	E11,5 - E16,5	- intrapulmonale konduktive und periphere Luftwege - Differenzierung des respiratorischen Epithels (unreife AT II-Zellen)
kanalikuläre	17. - 24. SSW	E16,6 - E17,5	- pulmonales Parenchym - Blut-Luftschanke - Differenzierung in AT I- und AT II-Zellen
sakkuläre	25. - Geburt	E17,5 - PND4	- erste echte Alveolen
alveoläre	36. SSW - 1./2. Lebensjahr	PND5 - PND30	- Kapillarnetz - Großteil der Alveolen

SSW = Schwangerschaftswoche, E = *embryonic day* (pränataler Tag), PND = postnataler Tag

1.2.3 RAGE in der Lungenentwicklung

Die RAGE-Expression ist stark mit der Lungenentwicklung verbunden und steigt während der Alveolarisierungsphase kontinuierlich an (Lizotte *et al.*, 2007; Reynolds *et al.*, 2008). Dabei wird RAGE in der sakkulären Phasen der pränatalen Lungenentwicklung von undifferenzierten parenchymalen Zellen gebildet (Reynolds *et al.*, 2008). Mit der Geburt kommt es zu einer massiven Veränderung der RAGE-Expression. AT I-Zellen steigern die RAGE-Expression während der alveolaren Phase, wohingegen in anderen Zellen und Geweben die Expression herunter reguliert wird. In den bronchialen Epithelzellen ist RAGE dann nicht mehr nachweisbar. Ein marginaler Nachweis ist zu diesem Zeitpunkt noch in den AT II-Zellen zu finden, der auf das Potential von RAGE, die Differenzierung von AT II- zu AT I-Zellen positiv zu beeinflussen, hindeutet (Reynolds *et al.*, 2008). Eine zu hohe RAGE-Expression vor der Alveolarisierung führt zu schweren Lungenfehlbildungen und perinataler Letalität (Reynolds *et al.*, 2011). Die zeitlich und räumlich regulierte RAGE-Expression während der Lungenentwicklung und im adulten Alveolargewebe deuten auf eine Funktion von RAGE bei der Lungenmorphogenese und -homöostase hin (Reynolds *et al.*, 2011).

1.3 Bronchopulmonale Dysplasie

Durch die Unreife der Lunge und den entwicklungsbedingten Surfactant-Mangel entsteht bei extrem Frühgeborenen das klassische Krankheitsbild des Atemnotsyndrom (eng. *respiratory distress syndrome*, RDS), das zur häufigsten Todesursache bei Frühgeborenen zählt (Benz-Bohm, 2005; Smith *et al.*, 2010; Noguee, 2017). Neben einer O₂-Therapie und Atemunterstützung, z.B. durch Überdruck-Beatmung (CPAP, eng. *continuous positive airway pressure*), ist in extremen Fällen eine Langzeitbeatmung über ein Tracheostoma erforderlich, um den arteriellen O₂-Gehalt des Blutes zu erhöhen und die Entwicklung der Frühgeborenen zu gewährleisten (Baker, 2019). Dabei erkranken ca. 30 % der Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 1000 g an bronchopulmonaler Dysplasie (BPD) (Stevenson *et al.*, 1998). BPD ist eine multifaktorielle, potentiell reversible, chronische Lungenerkrankung, die 1967 erstmals beschrieben wurde (Northway *et al.*, 1967) und durch die Unreife der Lunge, inflammatorische Prozesse, Barotraumen bei Beatmungstherapien sowie die Toxizität des verabreichten O₂ entsteht. Charakteristisch für BPD ist eine Störung der Alveolarisierung (Coalson, 2006) und Vaskularisierung der Lunge (Thébaud und Abman, 2007), die durch folgende klinische Merkmale gekennzeichnet ist:

- Tachypnoe
- vertiefte angestrengte Atmung mit Einziehungen am Brustkorb
- vermehrtes Bronchialsekret
- Husten
- Wachstumsverzögerung
- livide Haut und Schleimhaut
- röntgenologische Hinweise auf Lungenemphysem und Atelektase

In der sog. Vorsurfactantära wurde die „alte“ BPD als Folgeerkrankung der Beatmungstherapie bei Frühgeborenen mit RDS angesehen, an der auch mäßig reife Frühgeborene erkrankten. Charakteristisch waren diffuse Schäden der Luftwege, lokalisierte Überblähungen und eine interstitielle Fibrose (Bland und Coalson, 2000). Zu den aktuell wichtigsten Präventions- und Therapiestandards gehören pränatale Kortikosteroide, die eine frühzeitige Lungenreife herbeiführen sollen, Surfactantsubstitutionen und individuelle Beatmungsstrategien (Prävention und Therapie der bronchopulmonalen Dysplasie Frühgeborener, Leitlinien der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin (GNPI) und der Deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin (DGKJ), gültig bis 30.06.2014). Dadurch hat sich das Krankheitsbild der BPD verändert. Die „neue“ BPD der Surfactantära ist definiert als eine unreife-assoziierte Multisystemerkrankung, die durch eine Verzögerung der Lungenentwicklung bei extrem unreifen Frühgeborenen charakterisiert ist (Allen *et al.*, 2003; Herting, 2010).

Auch bei BPD scheint RAGE eine Rolle zu spielen, da die Proteinmengen von esRAGE und sRAGE in den Trachealsekreten von Frühgeborenen mit schwerer BPD verringert sind (Benjamin *et al.*, 2018). Interessanterweise macht dabei esRAGE den größten Teil des löslichen RAGE aus, im Gegensatz zu adulten Patienten mit ALI, bei denen sRAGE die vorherrschende Isoform ist (Jabaudon *et al.*, 2015). Eine andere Studie zeigt hingegen eine sRAGE-Erhöhung bei Frühgeborenen, die mechanisch beatmet wurden bzw. eine BPD entwickelten (Rozycki *et al.*, 2017). Eine RAGE-Überexpression in fetalen und adulten Ratten führt zur Vereinfachung der Lungenarchitektur, wie sie auch bei BPD

vorkommt (Stogsdill *et al.*, 2012, 2013). Dies macht deutlich, dass zu viel RAGE die Lungenentwicklung stören kann, während zu wenig, zumindest von der löslichen Form, Inflammationen fördern kann (Rozycki *et al.*, 2017).

„Sauerstoff ist das wichtigste Medikament zur Behandlung der chronischen Hypoxämie bei BPD“ (Prävention und Therapie der bronchopulmonalen Dysplasie Frühgeborener, Leitlinien der GNPI und der DGKJ, gültig bis 30.06.2014), wobei eine O₂-Sättigung (SpO₂) von 93 - 98 % unter O₂-Therapie empfohlen wird. Jedoch ist ein höherer Sättigungszielbereich (96 - 99 %) mit einer höheren Rate an BPD-Exazerbationen assoziiert als ein niedriger Zielbereich (89 - 94 %) (The STOP-ROP Multicenter Study Group, 2000). Abhängig von der Höhe und Dauer der O₂-Supplementation wird zwischen verschiedenen Schweregraden der BPD unterschieden (Tab. 2).

Tabelle 2: Einteilung der BPD durch die National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI) in Maryland, USA aus den Jahr 2000.

Schweregrad der BPD	Beschreibung
keine	< 28 Tage O ₂ -Supplementation
mild	> 28 Tage O ₂ -Supplementation, kein O ₂ ab der 36. Woche p.m. benötigt
moderat	ab der 36. Woche p.m. noch 30 % O ₂ -Supplementation benötigt
schwer	ab der 36. Woche p.m. > 30 % O ₂ oder Überdruckbeatmung benötigt

p.m. = post menstruell

Es gilt zu beachten, dass die unreife Lunge von Frühgeborenen auf die normoxische O₂-Konzentration von 21 % außerhalb des Mutterleibs noch nicht vorbereitet ist, da in der Gebärmutter hypoxische Bedingungen herrschen. Schon der normale Luftsauerstoffgehalt stellt somit für die Frühgeborenen eine hyperoxische Belastung dar, die durch die Verabreichung von zusätzlichem O₂ während der Beatmungstherapie noch verschärft wird (Joshi und Kotecha, 2007; Vogel *et al.*, 2015). In der Abteilung für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin des Universitätsklinikums Halle (Saale) wird deshalb bei der Beatmung von Frühgeborenen eine durchschnittliche O₂-Konzentration von 50 % verwendet (persönliche Kommunikation im Rahmen des gemeinsamen Forschungsprojektes: Bartling & Baier, Importance of the Receptor for Advanced Glycation End-products and Endoglin at the alveolo-capillary membrane for the development of bronchopulmonary dysplasia in preterm neonates by hypoxia-hyperoxia conditions, Roux-Projekt an der medizinischen Fakultät Halle (Saale), FKZ 28-14).

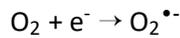
1.4 Reaktive Sauerstoffspezies

Je höher der Anteil an molekularem O₂ während der Beatmung, desto mehr reaktive Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*; ROS) entstehen (Freeman und Crapo, 1981; James *et al.*, 2013; Bouch *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2015). ROS bilden eine inhomogene Molekülgruppe und sind dadurch gekennzeichnet, dass sie alle Sauerstoff (O₂) enthalten. Eine Hauptunterteilung der ROS erfolgt in:

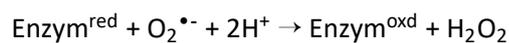
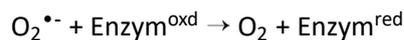
- nichtradikalische O-Verbindungen (z.B. Wasserstoffperoxid H₂O₂, Ozon O₃)
- radikalische O-Verbindungen (z.B. Hydroxid-Radikal O₂^{•-} (veraltet: Superoxid-Anion), Hydroxyl-Radikal •OH)

- radikalische NO-Verbindungen (reaktive Stickstoffspezies (RNS) z.B. Stickstoffmonoxid NO•, Peroxynitrit ONOO⁻)

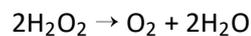
Im Stoffwechsel entstehen Hyperoxid-Radikal (O₂^{•-}) während der Zellatmung in Mitochondrien, und der Phagozytose durch Immunzellen, wie neutrophile Granulozyten und Makrophagen (Shadel und Horvath, 2015) sowie bei Entzündungsreaktionen (Ristow, 2014) durch Reduktion von molekularem O₂:



In geringer Konzentration spielen ROS eine wichtige Rolle als Signalmoleküle (Shadel und Horvath, 2015), können jedoch in hohen Konzentrationen schädlich wirken und zu oxidativem Stress führen. Bei der Abwehr der o.g. Spezies spielen natürlich vorkommende Antioxidantien (z.B. Ascorbinsäure (Vitamine C), Tocopherol (Vitamin E), Carotinoide, Glutathion) und antioxidative Enzyme (z.B. Superoxid-Dismutasen, Glutathionperoxidase, Katalase) eine wichtige Rolle. Die Enzyme der Familie der Superoxid-Dismutasen (SOD) werden in drei verschiedene Gruppen unterteilt: cytosolische Kupfer/Zink-enthaltenden SODs (Cu/Zn-SOD), Mangan-haltige SODs (Mn-SOD) in Mitochondrien und Peroxisomen und extrazelluläre SODs (ecSOD) (Faraci und Didion, 2004). SODs haben eine wichtige Bedeutung bei der Abwehr der radikalischen O-Verbindungen:



Das entstehende H₂O₂ wirkt sehr ätzend und zytotoxisch. Der Organismus schützt sich gegen die toxische Wirkung mittels Enzymen wie Katalase und Peroxidase, die H₂O₂ in H₂O umwandeln:



Das fetale Level an pulmonalen antioxidativen Enzymen steigt zum Ende der Schwangerschaft kontinuierlich an (Asikainen und White, 2005; Poggi und Dani, 2014). Interessanterweise konnte der genetische Polymorphismus von SODs in Zusammenhang mit der Entstehung von BPD gebracht werden, was die Bedeutung der Balance des antioxidativen Redoxsystems verdeutlicht (Poggi *et al.*, 2012). Befinden sich die Bildung und der Abbau von ROS außerhalb des physiologischen Gleichgewichts zu Gunsten der Anreicherung von ROS innerhalb der Zelle, spricht man von oxidativem Stress. Da ROS sehr reaktionsfreudig sind, reagieren sie bei einem Überschuss mit anderen Molekülen, wie Strukturproteinen und der DNA, und verursachen dadurch Schädigungen, die zu vielfältigen und irreversiblen Zellschäden führen können (Bokov *et al.* 2004).

1.5 Hyperoxie-induziertes BPD-Modell und -Studien

Auch eine, durch hohe O₂-Konzentrationen (Hyperoxie) bedingte ROS-Produktion führt zur Oxidation von DNA, Proteinen und Lipiden (Bongarzone *et al.*, 1995; Barker *et al.*, 2006). Auf DNA-Ebene kann es durch Hyperoxie zu Basenmodifikationen und Einzelstrangbrüchen kommen, wodurch das Risiko einer Sequenzveränderung bei der Replikation steigt. Bei einer Akkumulation der Schäden kann es zur zellulären Seneszenz oder Apoptose kommen, wodurch die Gewebeerneuerung beeinträchtigt werden kann (Jackson und Bartek, 2009). Da der Redox-Zustand und O₂-Konzentration

wichtige Regulatoren für die Genexpression sind, werden durch die Hyperoxie außerdem die Transkription und die Translation beeinflusst (Fanburg *et al.*, 1992). Dies führt zu einer Verringerung der DNA-Synthese was sich negativ auf die Zellproliferation und damit auch die Zellteilung auswirkt. Dies kann während der Entwicklung zum Absterben wichtiger Progenitorzellen in der Lunge führen. Außerdem haben die Hyperoxie-induzierten Veränderungen der Zellproliferation Auswirkungen auf Wachstums-relevante Proteine (Han *et al.*, 1996). Im Zuge dessen kommt es zum vermehrten Einstrom inflammatorischer Zellen in das Lungengewebe, die durch die Freisetzung oxidativer Radikale und Proteasen weitere Lungenschäden und Dysplasien verursachen. Des Weiteren setzen die inflammatorischen Zellen Zytokine frei, die Inflammationen und Wachstumsfaktoren regulieren und dadurch ebenfalls die Zellproliferation und fibroelastische Strukturen beeinflussen (Smith *et al.*, 1995). Es kommt zu Störungen in der Kollagenverteilung, wodurch die Lungenarchitektur nachhaltig beeinflusst wird. Charakteristisch dafür sind Vergrößerungen der Lufträume, Fibrose und Inflammationen (Raffay *et al.*, 2013; Bouch *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2016). Hyperoxie führt außerdem zu einer Verringerung der Alveolarisierung der Lunge, welche mit dickeren Alveolarwänden und größeren parenchymalen Lufträumen einhergeht (Bozyk *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013; Bouch *et al.*, 2015).

In histologischen Analysen zeigt sich die Verringerung der Alveolarisierung u.a. in der Vergrößerung des *Mean Linear Intercept* (MLI) (James *et al.*, 2013; Jones *et al.*, 2014; Wang und Huang, 2014; Willis *et al.*, 2018). In Ratten führt Hyperoxie zudem zu einer Verringerung der mRNA-Expression des AT I-Zell-Markers AQP5 (Fu *et al.*, 2008), bei Mäusen hingegen zu einer Zunahme (Yee *et al.*, 2014). Ähnlich verhält es sich bei dem AT II-Zellmarker SP-C dessen Proteinmenge bei neugeborenen Mäusen durch Hyperoxie an PND4 verringert und an PND10 erhöht ist (Yee *et al.*, 2014). Interessanterweise lassen sich eine Erhöhung der Expression der antioxidativen Enzyme wie SODs und GPx (Frank und Sosenko, 1991; Morton *et al.*, 1999) sowie CAT (Bouch *et al.*, 2017) durch Hyperoxie nicht induzieren. In der Studie von Reynolds *et al.* (2010) an 10 Wochen alten Mäusen führt Hyperoxie zu einer Zunahme der RAGE mRNA-Expression und Proteinmenge. Allerdings waren RAGE^{-/-}-Mäuse gegen Hyperoxie-induzierte Inflammationen im Lungengewebe geschützt. In der BAL führt Hyperoxie zu einer Zunahme der Gesamtzellzahl und besonders der neutrophilen Granulozyten sowie der gesamten Proteinmenge (Reynolds *et al.*, 2010). Diese Veränderungen wirken sich auch auf die Lungenfunktion aus. Hyperoxie führt in Ratten zu einer Verringerung der Atemarbeit (Shafa *et al.*, 2018) und der Compliance bei Mäusen (Chetty *et al.*, 2008). Gerade Letzteres wird auch bei Kindern mit BPD beobachtet (Tortorolo *et al.*, 2002).

Besonders in der sensiblen Phase der Lungenentwicklung führt Hyperoxie zu permanenten Schädigungen der Lungenmorphologie, die sich in einer Verschlechterung der Lungenfunktion äußern. Das Hyperoxie-induzierte pathologische Bild entspricht dem von Kindern mit BPD, weshalb eine einfache Hyperoxie-Exposition zur Etablierung von BPD im Tier-Modell genutzt wird (Han *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2012). Viele bisher bekannte pathologische Veränderungen sind mittels Tiermodellen an Mäusen und Ratten beschrieben worden (Tab. 3). Dabei wurden jedoch meist überproportionierte O₂-Bedingungen (> 84 % O₂, sehr starke Hyperoxie) benutzt. Deshalb ist nicht ausreichend geklärt, ob klinisch relevante, moderate Hyperoxie-Bedingungen (40 - 60 % O₂) zu ähnlichen Ergebnissen führen.

Bei genauerer Analyse der Literatur, die sich mit dem Studienthema murine Hyperoxie-induzierte BPD-/ALI-Modelle bzw. pulmonales RAGE beschäftigt, fällt auf, dass die meisten Arbeiten nur ein

oder zwei Untersuchungsschwerpunkte analysieren (Tab. 3). Von den, in Tab. 3 dargestellten 88 Studien untersuchen 76 die histologische Struktur der Lunge, 61 die Genexpression verschiedenster Gene, 25 die BAL, 22 die Lungenfunktion, sechs das Blut und nur vier pulmonales RAGE. Nur in drei Studien wird RAGE bei Hyperoxie-Exposition untersucht und nur bei einer dieser Studie sind die Versuchstiere neugeborene Ratten. Auch wurden in keiner der Studien die dargestellten Untersuchungsschwerpunkte an den selben Versuchstieren analysiert, was einen Vergleich und die Darstellung von Korrelationen schwierig gestaltet.

Durch Neugeborenen-Hyperoxie wird nicht nur das Überleben von Frühgeborenen bedroht, es stellt auch die Ursache für manche chronischen Lungenerkrankungen im Kindes- und Erwachsenenalter dar und hat negative Auswirkungen auf die Lebensqualität der Patienten (Han *et al.*, 2017b). Auch zeigen Erkrankte ein höheres Risiko für die spätere Entwicklung von Asthma- oder reaktive Atemwegserkrankung, Bluthochdruck (de Jong *et al.*, 2012), Herz-Kreislaufkrankungen oder Epilepsie (Crump *et al.*, 2011b). Des Weiteren zeigen sich im Kindesalter vermehrt Verhaltensauffälligkeiten und Sprachentwicklungsstörungen (Anderson und Doyle, 2006) sowie eine geringere Lebenserwartung (Crump *et al.*, 2011a).

Zwar hat das Interesse an der Erforschung der Auswirkungen von Hyperoxie auf die Lunge und den Mechanismen der Entstehung von Hyperoxie-induzierten Lungenschäden in den letzten Jahren stark zugenommen (Abb. 4), trotzdem sind vor allem die Langzeiteffekte einer Neugeborenen-Hyperoxie bisher wenig aufgeklärt. Auch die Rolle von RAGE in der Lunge rückte zunehmend in den Fokus. Dennoch gibt es kaum Studien, die die Rolle von RAGE bei Hyperoxie-induzierten Lungenschäden untersuchen (Abb. 4).

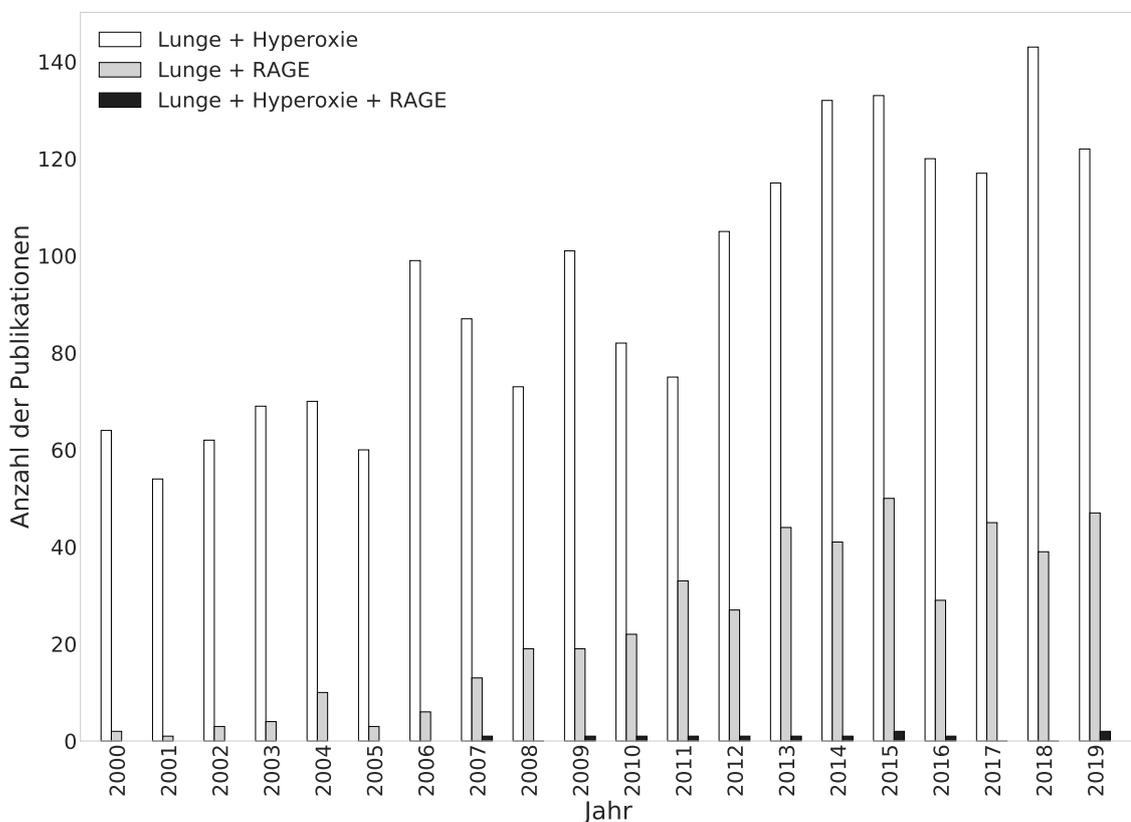


Abbildung 4: Historie der Publikationen. Mittels PubMed Recherche wurde die Anzahl der Publikationen für die Stichworte: Lunge + Hyperoxie (weiß), Lunge + RAGE (grau) und Lunge + Hyperoxie + RAGE (schwarz) für die Jahre 2000 - 2019 (Stand 02.01.2020) ermittelt.

Tabelle 3: Literaturübersicht zum Thema murine Hyperoxie-induzierte BPD-/ALI-Modelle bzw. pulmonales RAGE sowie zu verwendeten Versuchstieren, Alter der Tiere, O₂-Konzentrationen, Dauer der Anwendung, Normoxiedauer nach Hyperoxie und Aufarbeitungsschwerpunkten vergleichend zur vorliegenden Arbeit.

Referenz	M/R	PND (d)			Hyperoxie (% O ₂)			Dauer (d)			ND nach H (d)	Histo	Gen-expression	BAL	Blut	Lungenfunktion	(s)RAGE
		≤ 3	4 - 30	≥ 31	≤ 59	60 - 83	≥ 84	≤ 3	4 - 14	≥ 15							
Vorliegende Arbeit	M	0			50	75			14		45	X	X	X	X		X
Alejandro-Alcázar et al., 2007	M	1					85			28		X	X				
Barazzone et al., 1998	M			56 - 84		100		4				X	X				
Bavis et al., 2010	R	0				60		14							X		
Benipal et al., 2015	M			56 - 70		100		3				X		X			
Bhandaria et al., 2006	M		28	42		100		12				X	X	X			
Berkelhamer et al., 2013	M		5/10	56		75		1				X	X				
Bouch et al., 2015	M	0			40	65		7			49	X	X	X			
Bouch et al., 2017	M	0			40			7			49	X	X	X			
Bozyk et al., 2012	M	2 - 3				75		14				X	X				
Branchfield et al., 2015	M	0				75				15		X					
Britt et al., 2013	M	0					85	14				X	X	X			
Chetty et al., 2008	M		5			90		8				X			X		
Cox et al., 2017	M	0				90		14			42	X					
Dumpa et al., 2019	M	1				95		3			84	X	X				
Dylag et al., 2017	M	0			50			7			14	X	X		X		
Endesfelder et al., 2019	R	0				80		3	5		10/12	X	X	X			
Fechtner et al., 2015	M			56 - 98		100		14							X		
Fiaturi et al., 2018	M		5			90		8					X				
Fritzell et al., 2009	M	0		66		95		2	7		10/49	X					
Han et al., 2017b	M	1 - 2				60 - 70				21		X	X				
Hatfield et al., 2015	M			56 - 84		60				21		X	X				

Referenz	M/R	PND (d)			Hyperoxie (% O ₂)			Dauer (d)			ND nach H (d)	Histo	Gen-expression	BAL	Blut	Lungenfunktion	(s)/RAGE
		≤ 3	4 - 30	≥ 31	≤ 59	60 - 83	≥ 84	≤ 3	4 - 14	≥ 15							
Jagarapu <i>et al.</i> , 2015	R	2					85		14			X	X	X			
James <i>et al.</i> , 2013	M	0					85		7/14			X			X		
Jiang <i>et al.</i> , 2018	M		7				85		7			X					
Jones <i>et al.</i> , 2014	M	0				65		5/7				X			X		
Kemmler <i>et al.</i> , 2015	M		84				100	1		1	1	X		X			
Kumar <i>et al.</i> , 2016	M	0					85		12		91	X		X			
Kumarasamy <i>et al.</i> , 2009	M	0					85	1	7/14	21/28		X					
Lee <i>et al.</i> , 2013	M	0				75		14		13		X		X			
Li <i>et al.</i> , 2015a	M		42 - 56			Ventilation mit Hyperoxie		1				X		X			
Li <i>et al.</i> , 2015b	R											X		X			X
Lin <i>et al.</i> , 2015	M		70 - 84					3				X		X			
Lingappan <i>et al.</i> , 2014	M		56 - 70					2-3				X		X			
Lingappan <i>et al.</i> , 2015	M		56 - 70					1/2/3				X		X			
Liu <i>et al.</i> , 2019	R	2					85	3	7/14			X		X			
Lizotte <i>et al.</i> , 2007	R	0					95		7			X		X			X
Maturu <i>et al.</i> , 2017	M	0					85		14			X		X			
Martin <i>et al.</i> , 2014	M	0					90		10			X		X			
McKenna <i>et al.</i> , 2014	M	0					95		14			X		X			
Menon <i>et al.</i> , 2017	M	0				70			14			X					
Mills <i>et al.</i> , 2017	M	0					90									X	
Miranda <i>et al.</i> , 2013	R	2					90		14			X					
Mizushima <i>et al.</i> , 2015	M		56 - 98				90	1/2/3	4			X		X			
Nagato <i>et al.</i> , 2009	R		42 - 56			50	75	100		1		X		X			

Referenz	M/R	PND (d)			Hyperoxie (% O ₂)			Dauer (d)			ND nach H (d)	Histo	Gen-expression	BAL	Blut	Lungenfunktion	(s)RAGE
		≤ 3	4 - 30	≥ 31	≤ 59	60 - 83	≥ 84	≤ 3	4 - 14	≥ 15							
Nagato <i>et al.</i> , 2012	M			56			100	0,5 / 1 / 2				X	X				
Namba <i>et al.</i> , 2016	M	0					95		4		56	X	X		X		
Natarajan <i>et al.</i> , 2017	M	0					75		7				X				
Nold <i>et al.</i> , 2013	M	0					65	3	14	28		X	X				
Olave <i>et al.</i> , 2018	M	0	4				85		10			X	X		X		
O'Reilly <i>et al.</i> , 2014	M	0					65		7		300	X					
Ota <i>et al.</i> , 2016	M			42 - 56			100	3				X		X			X
Popova <i>et al.</i> , 2014	M	3					75		14			X	X				
Pietrofesa <i>et al.</i> , 2014	M			42 - 56			95		14			X	X	X			
Raffay <i>et al.</i> , 2013	M	0					85		14		14	X	X				
Raffay <i>et al.</i> , 2016	M	0					60			21		X	X		X		
Ramachandran <i>et al.</i> , 2015	R	2					90		7			X	X				
Ramani <i>et al.</i> , 2015	M	2					85		12		70	X			X		
Ratner <i>et al.</i> , 2009	M	3					65			28		X	X				
Reddy <i>et al.</i> , 2015	M			56			95	2			3		X	X			
Regal <i>et al.</i> , 2014	M	0					100		4		55 - 77				X		
Reynolds <i>et al.</i> , 2010	M			70			75		4 / 14			X	X	X		X	
Rogers <i>et al.</i> , 2011	M	0					95	1 / 3	7 / 14			X	X		X		
Royce <i>et al.</i> , 2016	M	0					65			28		X	X		X		
Sammour <i>et al.</i> , 2016	R	2					85 - 90			19		X					
Sauler <i>et al.</i> , 2015	M			56 - 70			95	3				X	X	X			
Shafa <i>et al.</i> , 2018	M		4				85		10		14	X				X	
Shivanna <i>et al.</i> , 2015	M	0					85		14			X	X	X			

Referenz	M/R	PND (d)		Hyperoxie (% O ₂)			Dauer (d)			ND nach H (d)	Histo	Gen-expression	BAL	Blut	Lungenfunktion	(s)RAGE
		≤ 3	4 - 30	≥ 31	≤ 59	60-83	≥ 84	≤ 3	4 - 14							
Song <i>et al.</i> , 2000	M			56 - 70			95	3					X			
Sozo <i>et al.</i> , 2015	M	0			65			7						X		
Soreshbabu <i>et al.</i> , 2015	M	0				100		7			X	X				
Sun <i>et al.</i> , 2019	R	0				90		14	7		X	X		X		
Sutsko <i>et al.</i> , 2013	R	2				90		14	14/84		X	X				
Syed <i>et al.</i> , 2017	M	1				100		4	10		X	X				
Takeda <i>et al.</i> , 2009	M	0			70			10	30		X			X		
Tung <i>et al.</i> , 2014	M			56		95		3	14		X	X	X			
Uhlrig <i>et al.</i> , 2014	R						LPS Injektion → ARDS				X	X		(X)		
van Haften <i>et al.</i> , 2009	R	0				95		14			X					
Vnukov <i>et al.</i> , 2015	R					100		1				X				
Wang <i>et al.</i> , 2014a	M	0			40	70		7	14		X	X		X		
Wang <i>et al.</i> , 2015	M			56 - 70		95		1/2/3			X	X				
Wang <i>et al.</i> , 2014b	R	0				60		14			X	X	X			
Wang und Huang, 2014	R	0				85		14			X	X				
Ward <i>et al.</i> , 2000	M					100		12			X	X	X			
Warner <i>et al.</i> , 1998	M	0				85			14 - 28		X	X	X	X		
Willis <i>et al.</i> , 2018	M	0			75			7	7/35		X	X		X		
Xia <i>et al.</i> , 2015	M	0				85			21		X	X				
Yee <i>et al.</i> , 2009	M	0			40	60/80	100	4	56		X	X	X	X		
Zhang <i>et al.</i> , 2015	M		7			75		6				X				
Zhang <i>et al.</i> , 2017	M	0				95		5	14			X				

Bronchopulmonale Dysplasie (BPD), acute lung injury (ALI), Maus (M), Ratte (R), postnataler Tag (PND, Alter zu Versuchsbeginn), Normoxiedauer nach Hyperoxie (ND nach H), Histologie (Histo), Bronchoalveoläre Lavage (BAL), (soluble) Receptor for advanced glycation end-products ((s)RAGE), Lipopolysaccharid (LPS), acute respiratory distress syndrome (ARDS)

2 Zielstellung

Die Alveolarisierung stellt die letzte Phase der Lungenentwicklung dar, wobei die Bildung der Alveolen überwiegend ein postnatales Ereignis ist. Zu diesem Zeitpunkt ist die Bildung der Luftwege bereits abgeschlossen. Daher dürfte Neugeborenen-Hyperoxie hauptsächlich die Entwicklung des Lungenparenchyms, aber nicht der Luftwege schädigen. Da der AT I-spezifische Rezeptor RAGE im Lungenparenchym lokalisiert ist, könnte er dort eine zentrale Rolle bei der Alveolarisierung während der Lungenentwicklung, wie auch bei der Entstehung von Lungenparenchymschäden durch Neugeborenen-Hyperoxie, wie sie bei der BPD vorkommen, spielen.

Dazu sollen folgende Fragen geklärt werden:

1. Welche Bedeutung hat RAGE bei der Lungenentwicklung?
2. Welche Bedeutung hat RAGE bei der Hyperoxie-induzierten BPD?

Stellt man vergleichend eine Auswahl an Hyperoxie-Studien nebeneinander (Tab. 3), so fällt bei genauerer Analyse auf, dass die meisten Arbeiten immer nur einen Untersuchungsschwerpunkt, wie z.B. die Histologie oder Expression aufweisen. Relativ wenige Arbeiten untersuchen die Funktion der Lunge nach Hyperoxiebehandlung. Aus diesem Grund soll die vorliegende Arbeit eine zusammenfassende Darstellung der Auswirkungen von Neugeborenen-Hyperoxie auf die Histologie, Expression, Hämatologie und Lungenfunktion sein. Zudem sollen zwei verschiedene O₂-Konzentrationen vergleichend analysiert werden. Deshalb stellt die vorliegende Arbeit eine Neuerung in der Fülle der Hyperoxie-Studien dar, womit die Alleinstellungsmerkmale dieser Arbeit die RAGE-Analyse mittels RAGE-Knockout-Mausstamm bei Neugeborenen-Hyperoxie und die zusammenfassende Darstellung verschiedener Untersuchungsschwerpunkte in einer Mausstudie sind.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit soll die vergleichende und umfassende Analyse der RAGE-abhängigen und -unabhängigen Auswirkungen verschiedener O₂-Konzentrationen auf die Lungenentwicklung und die Hyperoxie-induzierte BPD sein. Dazu sollen RAGE-abhängige Analysen der Lungenparenchymstruktur und der Lungenfunktion bei jungen erwachsenen Mäusen durchgeführt werden, die als Neugeborene normoxischen oder moderaten (50 % O₂) bzw. starken hyperoxischen (75 % O₂) Sauerstoffbedingungen ausgesetzt worden sind. Es sollen zudem die Expression ausgewählter Proteine, die eine wichtige Rolle im Alveolarepithel und der antioxidativen Abwehr spielen, analysiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Maushaltung

Die Durchführung der Tierversuche erfolgte nach Genehmigung durch das Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt in Halle(Saale) (203.m-42502-2-1258MLU). Es wurden Wildtyp-Mäuse ($RAGE^{+/+}$) vom Inzuchtstamm C57BL/6N (Charles River, Sulzfeld, D) sowie $RAGE$ -Knockout-Mäuse ($RAGE^{-/-}$) (Chavakis *et al.* 2003), die über 12 Generationen mit dem Stamm C57BL/6N zurückgekreuzt worden sind, verwendet. Allgemeine Haltung (spezifisch Pathogen-frei), Rückkreuzung, Kontrolle und tierexperimentelle Versuche erfolgten am Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG) des Universitätsklinikums Halle (Saale). Für die tierexperimentellen Versuche wurde die konventionelle Haltung in einem eigens dafür eingerichteten Versuchsraum gewählt. Die Tiere wurden in Standardkäfigen (265 x 205 x 140 mm, Bioscape, Emmendingen, D) in offenen Regalsystemen gehalten. Das Umsetzen der Tiere erfolgte ebenfalls offen im Versuchsraum. Dieser unterlag einem konstanten 12 h-Hell-Dunkel-Rhythmus. Die Raumtemperatur lag bei 21 °C und die Luftfeuchtigkeit bei mindestens 45 %. Der Zugang zu Wasser und Futter erfolgte *ad libitum*. Zu den Enrichment-Maßnahmen zählten das Einbringen von Nestbau-Material (Zellstoff) und Maus-Häuschen, sowie die Gruppenhaltung. Die Mütter wurden mit den Jungtieren während der Versuchsphase und zu Beginn der sich anschließenden Normalisierungsphase zusammengehalten. Mit sechs Wochen wurden die Jungtiere von der Mutter abgesetzt und nach Geschlechtern getrennt. Soweit es möglich war, wurden die Wurfgeschwister zusammen in einem Käfig gehalten, wobei die maximale Anzahl von vier Tieren pro Käfig nicht überschritten wurde. Auf Einzelhaltung wurde weitestgehend verzichtet.

3.2 Studien-Design

Die Behandlung der Mäuse mit Hyperoxie erfolgte in einer großen Polyacrylbox, die drei Standardkäfige fasste. In dieser konnten verschiedene Sauerstoffkonzentrationen mittels Computergesteuerter Gasmischbatterie (AerFC-R7800; Hitachi Metals, Obuke, J) und O_2 -Gasdetektor (GfG, Dortmund, D) eingestellt werden. Die Entwicklung und der Bau der Box erfolgten in Kooperation mit der GCE GmbH (Teusenthal), der FAP GmbH (Dresden) und dem ZMG (Halle). Die Käfige mit den unbehandelten Mäusen der Kontrollgruppe konnten direkt auf der Polyacrylbox aufgestellt werden. Es wurden eine Studie mit moderater Hyperoxie (mH, 50 % O_2) und starker Hyperoxie (sH, 75 % O_2) durchgeführt. Die neugeborenen $RAGE^{+/+}$ - und $RAGE^{-/-}$ -Mäuse wurden innerhalb von 24 h nach der Geburt randomisiert und auf die Mütter verteilt, wobei jedem Muttertier sechs Neugeborene zugeordnet wurden. Als Kontrolle dienten Mütter und Jungtieren des entsprechenden Genotyps, welche unter normalen Sauerstoffbedingungen (21 % O_2 , Kontrollgruppe, N) mitgeführt wurden. Die Muttertiere wurden in der Versuchsphase täglich zwischen Normoxie und Hyperoxie ausgetauscht, um maternale Effekte zu vermeiden (Strüder *et al.* 1999). Die Jungtiere wurden die ersten 14 Lebenstage (Versuchsphase) unter den Hyperoxie-Bedingungen gehalten (Abb. 5, Basisversuch). Im Hauptversuch schloss sich an diese 14-tägige Versuchsphase eine 45-tägige Normalisierungsphase unter normalen Sauerstoffbedingungen an (Abb. 5, Hauptversuch). Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Aufarbeitung 60 d alt (PND60). Im Langzeitversuch betrug die Normalisierungsphase 105 Tage (Abb 5, Langzeitversuch). Die Aufarbeitung der Tiere erfolgte dann an PND120.

Während der gesamten Versuchsphase wurde täglich und während der Normalisierungsphase regelmäßig das Gewicht und der Gesundheitszustand der Tiere kontrolliert und dokumentiert. Die BAL-, Blut- und Organentnahme erfolgte am narkotisierten Tier. Dazu wurde den Tieren nach dem Wiegen eine Xylazin/Ketamin-Mischung mit einer Endkonzentration von 65 mg Ketamin/kg und 13 mg Xylazin/kg Körpergewicht mittels 1 ml-Spritze i.p. injiziert.

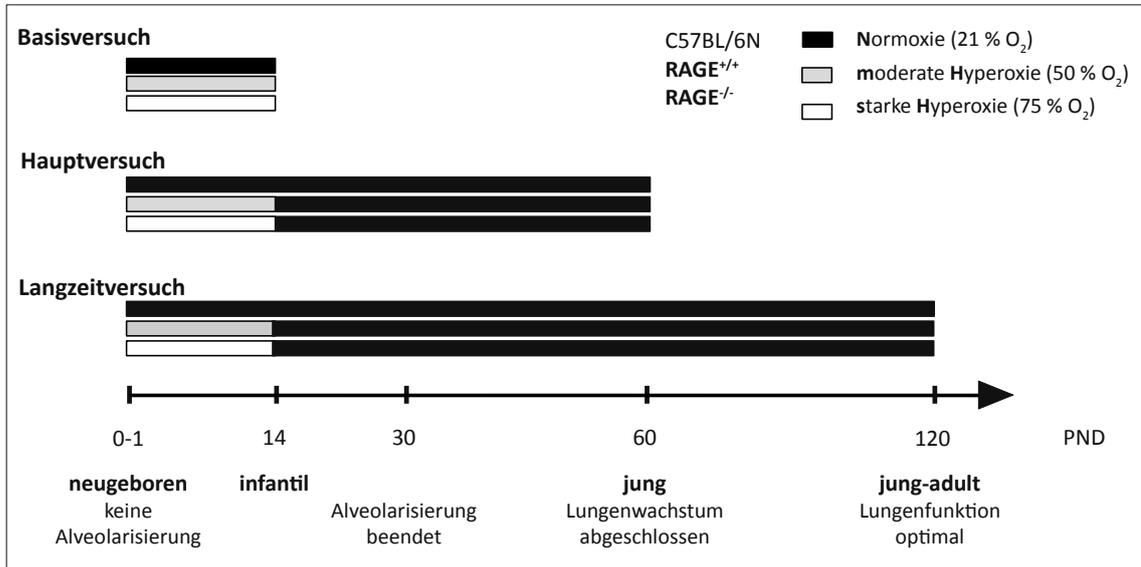


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Die neugeborene RAGE^{+/+}- und RAGE^{-/-}-Mäuse wurden in drei Gruppen eingeteilt: Kontrollgruppe (21 % O₂), moderate Hyperoxie (50 % O₂) und starke Hyperoxie (75 % O₂). Im Basisversuch erfolgten die Analysen direkt nach der Hyperoxie-Exposition an PND14, im Hauptversuch nach zusätzlichen 45 Tagen Normoxie an PND60 und im Langzeitversuch an PND120.

3.3 Analyse der bronchoalveolären Lavage

Die Lunge wurde intrathorakal dreimal mit 300 µl PBS gespült und die gewonnene bronchoalveoläre Lavage (BAL) in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gesammelt. Anschließend wurde die BAL für 10 min bei 400 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde für weitere Analysen (BCA, ELISAs) bei -20 °C gelagert. Das Zellpellet wurde für zytologische Analysen verwendet.

3.3.1 Zytologische Analyse

Das Zellpellet wurde in 200 µl PBS resuspendiert. Davon wurden 50 µl genutzt, um die Zellzahl (n/BAL) mittels Neubauer-Zählkammer zu ermitteln. Es wurden pro Tier vier Großquadrate (je 0,1 mm³) ausgezählt und die Zellzahl wie folgt berechnet (Formel 1):

Formel 1: Berechnung der Gesamtzellzahl pro BAL

$$\frac{n}{\text{BAL}} = \frac{n_1 + n_2 + n_3 + n_4}{4} \times 10 \times 200 \quad (1)$$

Die restlichen 150 µl der Zellsuspension wurden für die zytologische Analyse mittels Cytospin (Cyto[®]-System, Heraeus Holding GmbH, Hanau, D) verwendet. Dazu wurden zweimal je 75 µl

Zellsuspension auf einen Objektträger (Süsse Labortechnik GmbH & Co. KG, Gudensberg, D) zentrifugiert und im Anschluss mit dem HemaDiff Schnellfärbungs-Kit (Bioanalytic GmbH, Umkirch, D) nach dem Protokoll für Blutausstriche des Herstellers fixiert und gefärbt. Für die mikroskopisch Auswertung wurde ein Axiovert Mikroskope mit Axio Cam ICC1 Kamera (Carl Zeiss, Jena, D) für Farbbilder verwendet. Insgesamt wurden pro Präparat 200 Zellen ausgezählt, die anhand ihrer spezifischen Färbung differenziert wurden.

3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration in der BAL wurde mittels Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) bestimmt. Die Herstellung der *working solution* und der BCA-Standardreihe, sowie die Verdünnung der Proben erfolgten nach Herstellerangaben. Die Inkubation wurde für 30 min bei 60 °C durchgeführt. Die Messung der Absorption erfolgte direkt im Anschluss mit dem TECAN Infinite® M1000 (TECAN Infinite® M1000, Tecan Trading AG, Männedorf, CH) bei 562 nm. Die Auswertung wurde in Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA) und anhand der Standardreihe vorgenommen.

3.3.3 Albumin-ELISA

Die Albuminkonzentration in der BAL wurde mittels Mouse Albumin ELISA Kit (Bethyl Laboratories, Montgomery, USA) sowie dem ELISA Starter Accessory Kit (Bethyl Laboratories, Montgomery, USA) bestimmt. Die Herstellung der Puffer und der Standardreihe erfolgten nach Herstellerangaben. Die BAL-Proben wurden unverdünnt und der sekundäre Antikörper (AK) 1 : 100.000 verdünnt eingesetzt. Die Messung der Absorption erfolgte mit dem TECAN Infinite® M1000 (TECAN Infinite® M1000, Tecan Trading AG, Männedorf, CH) bei 450 nm. Die Auswertung erfolgte anhand der Standardreihe.

3.3.4 IgM-ELISA

Die IgM-Konzentration in der BAL wurde mittels Mouse IgM ELISA Kit (Bethyl Laboratories, Montgomery, USA) und dem ELISA Starter Accessory Kit (Bethyl Laboratories, Montgomery, USA) bestimmt. Die Herstellung der Puffer und der Standardreihe erfolgten nach Herstellerangaben. Die BAL-Proben wurden 1 : 200 und der sekundäre AK 1 : 200.000 verdünnt eingesetzt. Die Messung der Absorption und die Auswertung erfolgten wie unter 3.3.3 beschrieben.

3.3.5 sRAGE-ELISA

Die sRAGE-Konzentration in der BAL wurde mittels Kit Duo Set ELISA Mouse RAGE (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA) bestimmt. Die Präparation der Puffer und der Standardreihe erfolgten nach Herstellerangaben. Als Substrat wurde das 1-Step™ Ultra TMB-ELISA (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) benutzt. Die BAL-Proben wurden unverdünnt und der Streptavidin-HRP AK 1 : 200 verdünnt eingesetzt. Als Negativ-Kontrolle diente die BAL von RAGE^{-/-}-Mäusen. Die Messung und Auswertung erfolgten wie unter 3.3.3 beschrieben.

3.4 Erstellung der Hämatogramme

Zur Gewinnung des Blutes wurde der Bauchraum eröffnet und die *Vena cava caudalis* (untere Hohlvene, beim Menschen *Vena cava inferior*) durchtrennt und das arteriovenöse, heparinisierte Mischblut aufgefangen. Von 12 µl des so gewonnenen Blutes wurden Hämatogramme mittels dem Scil Vet Animal blood counter (scil animal care company GmbH, Viernheim, D) erstellt. Die Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel.

3.5 Präparation der murinen Lunge

Die Lungenpräparation erfolgte nach den Vorgaben von Prof. Dr. phil. nat. Johannes Schittny (Institut für Anatomie, Universität Bern, CH). Nach dem Öffnen des Thorax wurde der rechte Lungenflügel abgebunden und der linke Lungenlappen intratracheal für 10 min mit einer 20 cm Wassersäule aus 4 % PBS-gepuffertem Formaldehyd fixiert. Nach der Inkubationszeit wurde der linke Lungenlappen abgebunden, aus dem Thorax heraus präpariert, in PBS gespült und in 4 % PBS-gepuffertes Formaldehyd überführt. Der linke Lungenlappen wurde für 36 h bei Raumtemperatur (RT) auf einem Taumelrollenmischer fixiert und anschließend in 70 %iges Ethanol überführt und bei 4 °C gelagert.

Die Lungenlappen der rechten Lunge wurden anschließend ebenfalls aus dem Thorax präpariert und wie folgt verwendet: der craniale Lappen für Proteinanalysen, der mittlere Lappen für ROS-Analysen, der caudale für RNA-Analysen (diese wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert) und der akzessorische Lappen zur Bestimmung der *wet-to-dry*-Ratio.

3.6 *Water-to-dry-weight*-Ratio

Die *water-to-dry-weight*-Ratio (*wet-to-dry*-Ratio) gilt als Parameter für die Ödembildung und wurde für den akzessorischen Lungenlappen der rechten Lunge bestimmt. Nach dessen Präparation aus dem Thorax wurde dieser mit PBS gespült, trocken getupft und in ein vorher gewogenes 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Im Anschluss wurde das gesamt 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gewogen, um das Feuchtgewicht (*water weight*) des Lungenlappens zu ermitteln. Der Lungenlappen wurde 24 h bei 60 °C getrocknet und anschließend erneut gewogen, um das Trockengewicht (*dry weight*) zu ermitteln. Aus beiden Werten wurde dann die *wet-to-dry*-Ratio wie folgt berechnet (Kitamura et al. 2001) (Formel 2):

Formel 2: Berechnung der *wet-to-dry-weight*-Ratio

$$\text{wet-to-dry-weight-Ratio} = \frac{LG_{\text{wet}}}{LG_{\text{dry}}} \quad (2)$$

3.7 Proteinbiochemische Analyse des Lungengewebes

Für die Proteinanalysen wurde der craniale Lungenlappen des rechten Lungenflügels verwendet. Nach dessen Präparation aus dem Thorax wurde der craniale Lungenlappen mit PBS gespült, trocken getupft, in Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.7.1 Herstellung der Proteinlysate aus murinen Lungengewebe

Die Lungenproben wurden auf Eis aufgetaut und gewogen. Pro 10 mg Lungengewebe wurde 30 µl Lysispuffer in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß vorgelegt und das aufgetaute Gewebe dazugegeben. Die Homogenisierung erfolgte mit verschiedenen großen Pellet Pestles und dem Pellet Pestle® Cordless Motor (DWK Life Sciences Kontes™ Pellet Pestle™, Wertheim, D). Das Homogenisat wurde für 15 min auf Eis gelagert und anschließend ein zweites Mal homogenisiert. Weitere 20 µl Lysispuffer pro 10 mg Lungengewebe wurden vorsichtig untergemischt und das Lysat weitere 15 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein DNA-Verdau mit 1 µl Benzonase für 10 min bei 37 °C. Das Lysat wurde dann für 10 min bei 16.000 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand, das fertige Proteinlysate, in ein neues 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Lungenlysate erfolgte wie in Kapitel 3.3.2 für die BAL beschrieben.

3.7.2 Western Blot-Analyse

Für die Natriumdodecylsulfat(SDS)-Polyacrylamidgelelektrophorese wurden je Hofer-Apparatur zwei Polyacrylamid-Gele eingesetzt. Dazu wurden verschiedene prozentige Trenngele und ein 5 % Sammelgel hergestellt (Tab. 4). 20 µg Proteinlysate wurden mit 1 x Laufpuffer mit 0,1 % SDS bei 120 V elektrophoretisch aufgetrennt. Als Molekulargewichtsmarker dienten 5 µl des *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA). Der Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf die Amersham™Protran™ 0,2 µm Nitrocellulose Blotting Membran (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK) erfolgte mittels Trans-Blot®Turbo™Transfer System (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA). Für den Transfer wurde das Programm „Mixed MW“ (7 min bei 2,5 A), für Protein mit einer Größe zwischen 5 - 150 kDa gewählt. Nach dem Transfer wurde die Membran mit ddH₂O gewaschen und die Übertragung der Proteine auf die Membran durch Anfärbung mit Amidoschwarz B10 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA) kontrolliert. Die Fotos der gefärbten Membranen dienten zur Normalisierung der Ergebnisse. Anschließend wurde die Membran mit 5 % BSA (Albumin Fraktion V, AppliChem GmbH, Darmstadt, D) oder 5 % Milchpulver (Carl Roth, Karlsruhe, D) in PBST für 1 h bei RT inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu blockieren.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele. Die Volumina der entsprechenden Komponenten reichen für zwei 0,75 mm Polyacrylamid-Gele á 3 ml.

Komponenten	5 % Sammelgel	10 % Trenngel	12,5 % Trenngel	15 % Trenngel
Trenngelpuffer	500 µl	2,25 ml		
40 % Acrylamid	520 µl	1,5 ml	1,9 ml	2,25 ml
ddH ₂ O	2,9 ml	2,14 ml	1,75 ml	1,4 ml
10 % SDS	40 µl	60 µl		
10 % APS	25 µl	50 µl		
TEMED	5 µl	5 µl		

Danach erfolgte die Antikörperhybridisierung. Dazu wurde der primäre Antikörper (Tab. 5) in einer 5%igen BSA- bzw. Milchlösung verdünnt und die Membran üN bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 3 x 5 min mit je 50 ml PBST gewaschen. Anschließend

erfolgte die Antikörperhybridisierung mit dem entsprechenden sekundären Antikörper (Tab. 5) für 1 h bei RT auf dem Schüttler. Es schloss sich erneut ein 3 x 5-minütiger Waschschrift mit je 50 ml PBST an.

Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte unter Verwendung der Western Blot Luminol Reagenz (Santa Cruz, Santa Cruz, USA). Dafür wurde die ECL-Lösung nach Herstellerangaben hergestellt und gleichmäßig über die Membran verteilt. Die absorbierte Chemilumineszenz wurde mit dem LAS-3000 Computer-gestützten Image-System (Fuji Film, Tokyo, J) detektiert. Die Auswertung der Signale erfolgte mit der Software AIDA 2.0 (Raytest, Straubenhardt, D).

Wurde die Membran mit mehreren Antikörpern inkubiert, musste nach dem Nachweis des ersten Antikörpers dieser zusammen mit dem sekundären Antikörper von der Membran entfernt werden. Dazu wurde die Membran für 30 min bei 60 °C mit Stripping-Puffer inkubiert. Im Folgenden wurde die Membran mit ddH₂O und im Anschluss daran 3 x 10 min mit 50 ml PBST gewaschen. Danach wurde die Membran, wie oben beschrieben, geblockt und anschließend mit dem neuen Antikörper hybridisiert.

Tabelle 5: Zusammenstellung der verwendeten Antikörper für die Western Blot-Analysen.

Antikörper	Beschreibung	Firma	Bestellnummer	Verdünnung
<i>Primäre Antikörper</i>				
AQP5	pc, rabbit α-mouse	Sigma	A4979	1 : 1.000
RAGE	pc, rabbit α-mouse	Abcam	ab65965	1 : 2.000
SP-B	pc, rabbit α-mouse	Santa Cruz	sc-13978	1 : 400
SP-C	pc, rabbit α-mouse	Santa Cruz	Sc-13979	1 : 500
<i>Sekundärer Antikörper</i>				
α-rabbit	pc, goat α-rabbit, HRP-konjugiert	Cell Signaling	7074	1 : 20.000

pc = polyklonal, HRP = *horseradish peroxidase*, α = anti

Die Gewebepreparate der älteren Tiere (PND270 und PND720) für die Proteinanalysen waren bereits vorhanden und stammen aus dem Tierversuchsprojekt 203.m-42502-5-30MLU.

3.7.3 Dot Blot-Analyse

Für die Dot Blot-Analyse wurden 2 µg Protein in 200 µl PBS verdünnt und mittels Whatmann™ Mini-fold I™ Slot-Blot System/Arcyl (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK) auf eine Amersham™ Protran™ 0,2 µm Nitrocellulose Blotting Membran (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK) aufgetragen. Zur Kontrolle der Proteinbeladung wurde die Membran mit Amidoschwarz B10 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA) gefärbt und fotografiert. Das Foto diente anschließend zur Normalisierung der Ergebnisse.

Nachdem die Membran mit PBST gewaschen wurde, folgte die Blockierung in PBST + 5 % BSA + 3 % H₂O₂ für 1 h bei RT. Direkt daran schloss sich die Hybridisierung mit dem primären Antikörper (Tab. 6) in PBST + 1 % BSA üN bei 4 °C an. Am nächsten Tag wurde die Membran 3 x 10 min mit PBST gewaschen, bevor die Hybridisierung mit dem sekundären AK für 1 h bei RT erfolgte (Tab. 6). Nach erneutem Waschen der Membran wurde das Western Blot Luminol Reagenz (Santa Cruz, Santa Cruz, USA) verwendet und die Signale mit dem LAS-3000 Computer-gestützten Image-System (Fuji

Film, Tokyo, J) detektiert. Die Auswertung der Signale erfolgte mit der Software AIDA 2.0 (Raytest, Straubenhardt, D).

Tabelle 6: Zusammenstellung der verwendeten Antikörper für die Dot Blot-Analysen.

Antikörper	Beschreibung	Firma	Bestellnummer	Verdünnung
<i>Primäre Antikörper</i>				
AQP5	pc, rabbit α -mouse	Sigma	A4979	1 : 2.000
Katalase	pc, rabbit α -mouse	Abcam	ab16731	1 : 1.000
CuZn-SOD	pc, rabbit α -mouse	Abcam	ab88404	1 : 1.000
Mn-SOD	pc, rabbit α -mouse	Biomol (Rockland)	600-401-G13	1 : 2.000
RAGE	pc, rabbit α -mouse	Abcam	ab65965	1 : 2.000
<i>Sekundärer Antikörper</i>				
α -rabbit	pc, goat α -rabbit , HRP-konjugiert	Cell Signaling	7074	1 : 20.000

pc = polyklonal, HRP = *horsradish peroxidase*, α = anti

3.8 RNA-Analyse des Lungengewebes

Für die Analyse der RNA wurde der caudale Lungenlappen der rechten Lunge der Mäuse verwendet.

3.8.1 RNA-Präparation und Konzentrationsbestimmung

Die Gesamt-RNA aus dem Lungengewebe wurde mittels TRIzol™ Reagent (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) isoliert. Dazu wurde 1 ml Trizol in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß vorgelegt, das mechanisch pulverisierte Lungengewebe hinzugegeben und der Ansatz für 5 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden 200 μ l Chloroform hinzugefügt und die Lösung für 15 s geschüttelt. Anschließend wurde das Gemisch für 15 min auf Eis inkubiert und für weitere 15 min bei 4 °C und 12.000 x g zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Die weitere Präparation der RNA aus diesem Überstand erfolgte mit dem InviTrap® Spin Cell RNA Mini Kit (Stratec Molecular GmbH, Berlin, D) nach Herstellerangaben. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde die Konzentration der so gewonnenen RNA mittels Nano Drop ND-1000 Spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) bei einer Absorption von 260 nm und 280 nm gemessen. Die 260/280-Ratio sollte zwischen 1,85 - 2,10 liegen, um Verunreinigungen mit Proteinen oder andere Kontaminationen ausschließen zu können. Zur Kontrolle der RNA-Menge und -Qualität wurde diese auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

3.8.2 Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription wird die zuvor präparierte RNA mittels der reversen Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dafür wurden gleiche Mengen RNA mit den Komponenten der 1. Reaktion vermischt und für 5 min bei 70 °C denaturiert (Tab. 7). Anschließend wurde der Ansatz auf 10 °C abgekühlt und der Ansatz der 2. Reaktion hinzugegeben (Tab. 7).

Der gesamte Ansatz wurde gut gemischt und für 50 min bei 42 °C inkubiert. Um die *First strand*-Reaktion zu inaktivieren, wurde der Ansatz für 1 min auf 95 °C erhitzt. Für alle Inkubations- und Denaturierungsschritte wurde der Thermocycler (icycler™, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA) verwendet.

Tabelle 7: Zusammenstellung der Reaktionsansätze für die reverse Transkription.

Komponente	Konzentration	Volumen in µl	Endkonzentration
<i>1. Reaktion</i>			
RNA	50 ng/µl	12	600 ng
First strand Puffer	5 x	4	1 x
Random Primer	25 ng/µl	2	50 ng
dd DEPC-H ₂ O		2	
Gesamtvolumen		20	
<i>2. Reaktion</i>			
First strand Puffer	5 x	2	1 x
dNTP	10 mM	1	250 nmol
M-MLV-RT	200 U/µl	0,5	100 U/µl
dd DEPC-H ₂ O		1,5	
Gesamtvolumen		5	

3.8.3 Quantitative Polymerasekettenreaktion

Die quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) wurde mittels iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, USA) und der GoTaq® qPCR Mastermix (Promega, Mannheim, D) durchgeführt. Die Anweisungen zur Herstellung der Reaktionsansätze sowie die verwendeten Zyklusparameter wurden dem Herstellerprotokoll entnommen. Zur Kalkulierung des mRNA-Gehaltes wurde eine externe cDNA-Standardreihe verwendet. Die verwendeten Primer sind in Tab. 8 dargestellt.

Tabelle 8: Zusammenstellung der Primer für die qPCR.

Gen	Forward Primer	Reverse Primer
SP-B	5'-AGTTCTCTGCTAGACGCAC-3'	5'-CTGTTCACTTTGCTGTC-3
SP-C	5'-TCCTGATGGAGAGTCCACCG-3'	5'-CAGAGCCCCTACAATCACCAC-3'
ELN	5'-TCCTGG AGCCACTTACAG-3'	5'-CTCTCTCTCCCAATTAGCC-3'

3.9 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie

Für die ROS-Analyse mittels Elektronenspinresonanz(ESR)-Spektroskopie wurde der mittlere Lungenlappen der rechten Lunge verwendet. Nach der Präparation wurde der rechte Lungenlappen mit PBS gespült, trocken getupft, in Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Das Protokoll zur ESR-Spektroskopie-Messung im Lungengewebe der Maus wurde anhand der Publikation von Adam *et al.* (2010) für die Messung in Nierengewebe von Ratten etabliert.

3.9.1 Herstellung der Lungenlysate für die ESR-Analyse

Die Proben wurden gewogen und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Pro 1 mg Gewebe wurden 5 ml Präparationspuffer hinzugegeben. Die Proben wurden mit dem Pellet Pestles und dem Pellet Pestle® Cordless Motor (DWK Life Sciences Kontes™ Pellet Pestle™, Wertheim, D) homogenisiert und anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein zweiter Homogenisierungsschritt. Das Lysat wurde anschließend für 10 min bei 600 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und erneut auf Eis gelagert. Vom Beginn der Aufarbeitung bis zum Beginn der Messung müssen 90 min vergehen, da erst dann die systembedingte ROS-Bildung im Lungengewebe beendet ist und die CPH-bedingte ROS-Detektion beginnen kann.

3.9.2 Messung mit ESR-Spektrometer

Die ESR-Messung wurde mittels Elektronenspektrometer Mini Scope MS100 (Magnetech GmbH, Berlin, D) und der Software Mini Scope Control 6.73 durchgeführt. Für die Messung wurden 10 µl des Lungenlysats zu 90 µl der 1 mM CPH-Lösung (1-Hydroxy-3-Carboxy-2,2,5,5-Tetramethyl-Pyrrolidin; Noxygen, Elzach, D), ein *spin trap* für $O_2^{\bullet-}$, hinzugegeben, gut gemischt und in eine Glaskapillare (Blaurand®intraMARK Mikropipette, Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, D) aufgezogen. Das untere Ende der Kapillare wurde sorgfältig mit Knetgummi (Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, D) verschlossen und die Kapillare in das Gerät eingesteckt. Die Messung des entstehenden 3-Carboxy-2,2,5,5-Tetra-Methyl-Pyrrolin-1-Oxyl (\bullet CP) erfolgte im 10 min-Takt für 1 h bei RT. Pro Messzeitpunkt wurden drei Messwerte generiert, aus denen der Mittelwert gebildet wurde. Diese wurden in einem zeitabhängigen xy-Diagramm aufgetragen. Der Anstieg m , der sich ergebenen Trendlinie ist der ermittelte ROS-Wert der Probe. Als Blank wurde PBS mitgeführt und der Blank-Messwert als Hintergrundrauschen von den Messwerten der Proben abgezogen. Als Kontrolle wurde eine Standardkurve mit dem \bullet CP-Radikal von 0 - 90 µM mitgeführt.

3.10 Histologische Lungenanalysen

3.10.1 Paraffineinbettung

Für die Paraffineinbettung wurde der bei 20 cm Wassersäule fixierte linke Lungenlappen für 36 h in 4 % PBS-gepuffertes Formaldehyd (Merck KGaA, Darmstadt, D) final fixiert, anschließend in 70 %iges Ethanol überführt und bei 4 °C gelagert. Am Tag der Einbettung wurden die Präparate dehydriert, indem diese für 60 min in 96 %igem Ethanol bei 40 °C inkubiert wurde. Anschließend erfolgte ein weiterer 1 h Inkubationsschritt bei 40 °C in 100 %igem Ethanol. Die Präparate wurden daraufhin in einen oberen, mittleren und unteren Abschnitt geteilt, wobei der mittlere Teil, der die großen Bronchien und Blutgefäße beinhaltet, verworfen wurde. Nur der obere und untere Teil wurden eingebettet, indem sie in Einbettkassetten gelegt und erneut für 90 min in 100 %igem Ethanol bei 40 °C dehydriert wurden. Im Anschluss folgte ein 1 h Inkubationsschritt in Neoclear (Xylen-Ersatz, Merck KGaA, Darmstadt, D) bei RT. Anschließend wurden die Lungenstücke in flüssigem Paraffin (Roti Plast, Carl Roth, Karlsruhe, D) in Disposable Base Molds (Leica Biosystems, Nussloch, D) platziert und 1 h bei 65°C inkubiert. Als letzter Einbettungsschritt wurde das Paraffin erneuert

und die Proben ein letztes Mal für 1 h bei 65 °C mit Paraffin infiltriert. Anschließend konnten die Präparate üN auskühlen und am nächsten Tag die Disposable Base Molds entfernt werden. Die eingebetteten Präparate wurden bei RT gelagert.

3.10.2 Herstellung der Gewebeschnitte

Die Paraffinblöcke wurden vor dem Schneiden für mindestens 20 min bei -20 °C eingefroren. Mit dem Leica Mikrotom (Leica®RM2125RT, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, D) wurden von den gefrorenen Paraffinblöcken 4 µm dicke Serien-Schnitte angefertigt. Diese wurden in einem 45 °C warmen Wasserbad gestreckt und auf Objektträger (Süsse Labortechnik GmbH & Co. KG, Gudensberg, D; Menzel Gläser Superfrost®Plus Objektträger, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) aufgezogen. Anschließend wurden die Objektträger üN getrocknet.

3.10.3 Hämatoxylin- und Eosinfärbung

Die hergestellten Präparate auf den Süsse-Objektträgern wurden für die Strukturanalyse der Lungen benutzt und mittels Hämatoxylin und Eosin (Carl Roth, Karlsruhe, D) gefärbt (HE-Färbung). Dazu mussten die Schnitte nach dem Trocknen deparaffinisiert werden, indem sie für 2 x 5 min in Neoclear inkubiert wurden. Daran schloss sich eine absteigende Ethanolreihe (100, 96, 80, 70, 50 %iger Ethanol) an, wobei die Schnitte jeweils 2 min (bei 100 % Ethanol 3 min) inkubiert wurden. Anschließend wurden die Schnitte vorsichtig mit Leitungswasser gespült und für 3 min mit Hämalaun (Hämatoxylin) inkubiert. Danach wurden die Schnitte erneut 5 min mit Leitungswasser und anschließend mit ddH₂O gespült, bevor die Gegenfärbung für 5 min mit Eosin erfolgte. Anschließend wurden die Schnitte ein weiteres Mal mit ddH₂O gespült, bevor die Entwässerung über eine aufsteigende Ethanolreihe (50, 70, 80, 96, 100 %iger Ethanol) erfolgte. Die Schnitte wurden für mindestens 30 min getrocknet und mit Entellan (Merck KGaA, Darmstadt, D) eingedeckelt. Die Gewebepreparate der älteren Tiere (PND270 und PND720) für die histologischen Analysen waren bereits vorhanden und stammen aus dem Tierversuchsprojekt 203.m-42502-5-30MLU.

3.10.4 Strukturanalyse des Lungengewebes

Pro HE-gefärbtem Präparat wurden sechs Fotos bei 200- und 630-facher Vergrößerung mit dem Axiovert Mikroskop und der ICC1-Kamera (Carl Zeiss, Jena, D) aufgenommen. Die Auswertung der Fotos erfolgte mit der Software ImageJ 1.47v (Schneider *et al.* 2012). Als Richtlinien für die Analyse der Lungenstruktur dienen die Publikationen der *Official American Thoracic Society* (Hsia *et al.* 2010; Matute-Bello *et al.* 2011). Es wurden die Gesamtgewebefläche, der *Mean Linear Intercept* (MLI), die Anzahl der Alveolen bis zum Lungenrand (*radial alveolar count* (RAC)) (Cooney und Thurlbeck 1982), die Alveolengröße und die Wanddicke der Alveolen ermittelt. Für die Normalisierung der Ergebnisse wurde die Gesamtgewebefläche der Fotos herangezogen.

3.11 Analyse der elastischen Fasern

3.11.1 Elastin-Färbung nach Hart

Die elastischen Fasern wurden mit der Methode nach Hart gefärbt. Dafür wurden die Lungenpräparate auf den Süss-Objektträgern, wie unter Kapitel 3.10.3 beschrieben, deparaffiniert und anschließend mit Leitungswasser gespült. Anschließend wurden die Objektträger 5 min in einer 0,25 %igen KMnO_4 -Lösung inkubiert und mit einer 5 %igen Oxalsäurelösung gereinigt. Die Färbung mit der Weigert Resorcin-Fuchsin-Lösung erfolgte üN. Am nächsten Tag wurden die Präparate gründlich mit Leitungswasser gespült, bevor sie mit Tartrazin für 5 min gegengefärbt wurden. Anschließend erfolgte die Entwässerung mit einer aufsteigenden Ethanolreihe und nach dem Trocknen das Eindeckeln mit Entellan, wie unter 3.10.3 beschrieben.

3.11.2 Auswertung der Elastinfärbung

Für die Auswertung der Elastin-Färbung wurden pro Tier sechs Fotos der nach Hart gefärbten Präparate bei 200-facher Vergrößerung mit dem Axiovert Mikroskop und der ICC1-Kamera (Carl Zeiss, Jena, D) aufgenommen. Die Farbbilder wurden anschließend in 8-bit Graustufenbilder umgewandelt und der Kontrast verstärkt. Da größere Luftwege und Gefäße viele elastische Fasern enthalten, die das Ergebnis verfälscht hätten, wurde schon beim Aufnehmen der Fotos darauf geachtet, dass diese weitestgehend nicht fotografiert wurden. Zusätzlich erfolgte eine manuelle Korrektur der Fotos, bei der größere Luftwege und Gefäße entfernt wurden (Abb. 11, Schwellenwertverfahren). Die serienmäßige Auswertung der Fotos erfolgte mittels Schwellenwertverfahren mit der Software ImageJ 1.47v und eigens dafür entwickelten Macros. Zur Detektion der elastischen Fasern wurde ein Binär-Threshold verwendet, ähnlich dem von Escolar *et al.* (1997) für die Quantifizierung von Kollagen. Zur Normalisierung der Ergebnisse wurde die Gesamtgewebefläche der Fotos herangezogen.

3.12 Immunhistologische RAGE-Färbung

3.12.1 Vorbereitung der Präparate

Die auf Superfrost-Objektträger aufgezogenen Lungenpräparate wurden üN getrocknet und über eine absteigende Ethanolreihe, wie unter Kapitel 3.10.3 beschrieben, entwässert. Anschließend erfolgte die 45-minütige Hitze-induzierte Epitopendemaskierung mittels Dako Target Retrieval Solution (Dako North America Inc., Carpinteria, USA). Im Anschluss wurden die Objektträger auf RT abgekühlt und die endogene Peroxidase durch einen 10-minütigen Inkubationsschritt mit 3 % H_2O_2 in PBS bei RT blockiert. Anschließend wurden die Objektträger für 5 min mit PBS gewaschen.

3.12.2 Spezifische RAGE-Färbung

Der RAGE-Antikörper (RAGE-AK) für die immunhistologischen Untersuchungen wurde freundlicherweise durch Prof. Dr. rer. nat. Michael Kasper (Anatomisches Institut der TU Dresden) zur Verfügung gestellt (Demling *et al.* 2006). Es wurde das ImmPRESS™ REAGENT Anti-Goat IgG (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA) verwendet. Die Präparate wurden für 20 min bei RT in einer feuchten Kammer mit 2,5 %igem Pferde-Serum blockiert, bevor sie mit dem 1:200 verdünnten RAGE-AK für 2 h bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert wurden. Die Reste des AK wurden durch zweimaliges Waschen für 5 min mit PBS entfernt und die Präparate für 30 min mit dem ImmPRESS Reagent bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger zweimal für 5 min mit PBS gespült. Als letzter Schritt erfolgte die Inkubation mit 50 μl DAB Substrat-Chromogen-Lösung (Dako North America Inc., Carpinteria, USA) für 3 bis maximal 20 min. Dabei wurde die Einfärbung der Präparate unter dem Mikroskop kontrolliert. Um die Färbereaktion zu stoppen, wurden die Präparate mit H_2O gespült. Anschließend wurden die Objektträger üN getrocknet und am nächsten Tag mit Entellan eingedeckelt. Nach dem Trocknen wurden mit dem Axiovert Mikroskop und der ICC1-Kamera (Carl Zeiss, Jena, D) Fotos des spezifisch-gefärbten Lungengewebes aufgenommen.

3.13 Analyse der Lungenfunktion

Die Untersuchung der Atemmechanik erfolgte mit dem System der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslunge (Hugo Sachs, Elektronik-Harvard-Apparatus GmbH, March-Hustätten, D). Die Ventilation erfolgte dabei in einer künstlichen Thoraxkammer über eine Trachealkanüle mittels Überdruckbeatmung (90 Atemzüge/min). Über eine Kanülierung der Pulmonalarterie und des linken Herzvorhofs wurde ein konstanter Perfusionsfluss (1 ml/min bei 37 °C) der Lungengefäße sicher gestellt. Als Perfusionspuffer wurde das Phenolrot-freie RPMI 1640 Medium (Thermo Fisher, Waltham, USA) verwendet, das permanent mit 5 % CO_2 / 95 % N_2 gereinigt wurde, um den pH bei 7,4 und pO_2 bei 20 mmHg konstant zu halten. Die Ventilation wurde auf Unterdruckbelüftung mit einem konstanten minimalen Pleuradruck (-2 cm H_2O), einem konstanten maximalen Pleuradruck (-12 cm H_2O) und Wiederholungen von erweiterten Atemzügen (-20 cm H_2O maximaler Pleuradruck alle 3 min) umgestellt, um das Tidalvolumen zu stabilisieren. Nach einer

Anpassungsphase von 20 min wurden die Lungen-physiologischen Parameter bei einem konstanten Tidalvolumen von 10 μ l/min aufgezeichnet. Dazu wurde die Software PULMODYN® für die Erfassung der pulmonalmechanischen Daten verwendet. Die Experimente wurden freundlicherweise von Frau PD Dr. rer. nat. Babett Bartling durchgeführt und die Daten zur Auswertung zur Verfügung gestellt.

3.14 Statistische Auswertung

Die statistische Kalkulation und die Präsentation der Daten erfolgte mit SigmaStat 3.5 sowie SigmaPlot 10 (Systat Software Inc., San Jose, USA). Die Daten wurden mittels ANOVA auf Signifikanz getestet. Als Post-hoc-Test wurden der Holm-Sidak-Test bzw. der Dunn-Test verwendet. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Ein P-Wert $\leq 0,05$ zeigte dabei signifikante Unterschiede an, wohin gegen ein P-Wert $\leq 0,10$ nur für einen tendenziellen Unterschied steht. Die Signifikanzen sind wie folgt angegeben: * P $\leq 0,05$ vs. Kontrollgruppe (Normoxie), # P $\leq 0,05$ vs. Genotyp mit gleicher Behandlung, \$ P $\leq 0,05$ vs. Altersgruppe mit gleicher Behandlung.

4 Ergebnisse

4.1 RAGE-abhängige Lungenentwicklung bei der Maus

Entwicklungsabhängige Untersuchungen zur RAGE-Menge in der Mauslunge zeigen einen stetigen Anstieg von RAGE bis zu PND120 (Abb. 6, RAGE). Dies ist kongruent mit der Expression von Aquaporin-5 (AQP5), das ebenfalls im Alveolarepithel exprimiert wird (Abb. 6, AQP5). Ab PND60 ist die AQP5-Proteinmenge in den $RAGE^{-/-}$ -Tieren signifikant verringert (Abb. 6, AQP5).

Immunhistochemische Analysen bestätigten die primäre Lokalisation von RAGE in den alveolären Zellen vom Typ I (AT-I-Zellen) (Abb. 6, Spezifische RAGE-Färbung).

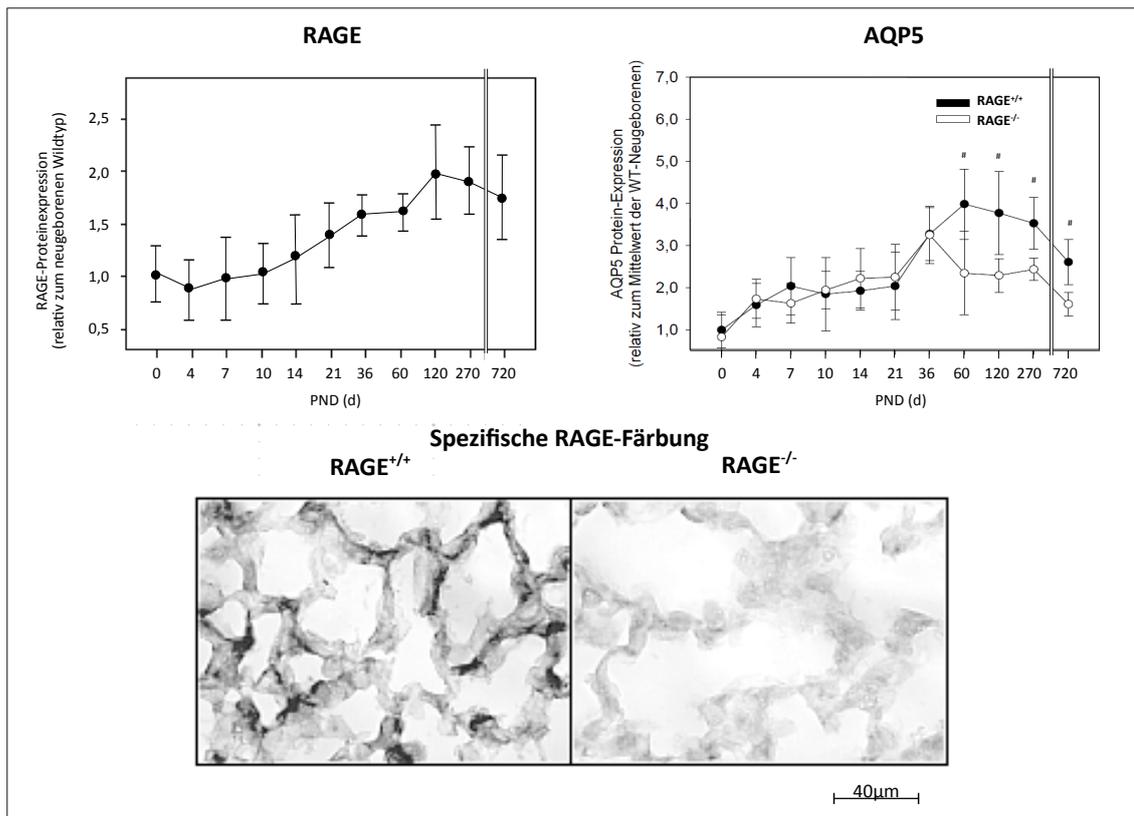


Abbildung 6: PND-abhängige Proteinexpression von RAGE (Immunoblot, Immunhistochemie) sowie PND- und RAGE-abhängige Proteinexpression von Aquaporin-5 (Immunoblot) in der Mauslunge. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung mit P-Wert: # $P \leq 0,05$ vs. Genotyp mit gleicher Behandlung.

Histologische Untersuchungen von Lungen unterschiedlich alter Mäuse weisen entwicklungsabhängige Unterschiede in der Alveolarstruktur zwischen den $RAGE^{+/+}$ - und $RAGE^{-/-}$ -Mäusen auf (Abb. 7, Lungenparenchym). Ins besonders die Alveolenwände der PND0 $RAGE^{+/+}$ -Tieren sind signifikant dünner als die der gleichaltrigen $RAGE^{-/-}$ -Mäuse, was sich in der weiteren Entwicklung jedoch angleicht (Abb. 7, Alveolare Wanddicke). Auch lässt sich in den histologischen Aufnahmen die kammerartige Struktur der primären Septen bei den neugeborenen $RAGE^{+/+}$ -Tieren deutlich erkennen, die die Voraussetzung für die sich anschließende postnatale Alveolarisierung bilden (Abb. 7, Lungenparenchym, Pfeile).

Es war wichtig, den Gehalt an antioxidativen Enzymen bzw. Radikalen zum Zeitpunkt PND0 und PND14 zu kennen, da in den späteren Versuchen Neugeborene mit Hyperoxie behandelt werden

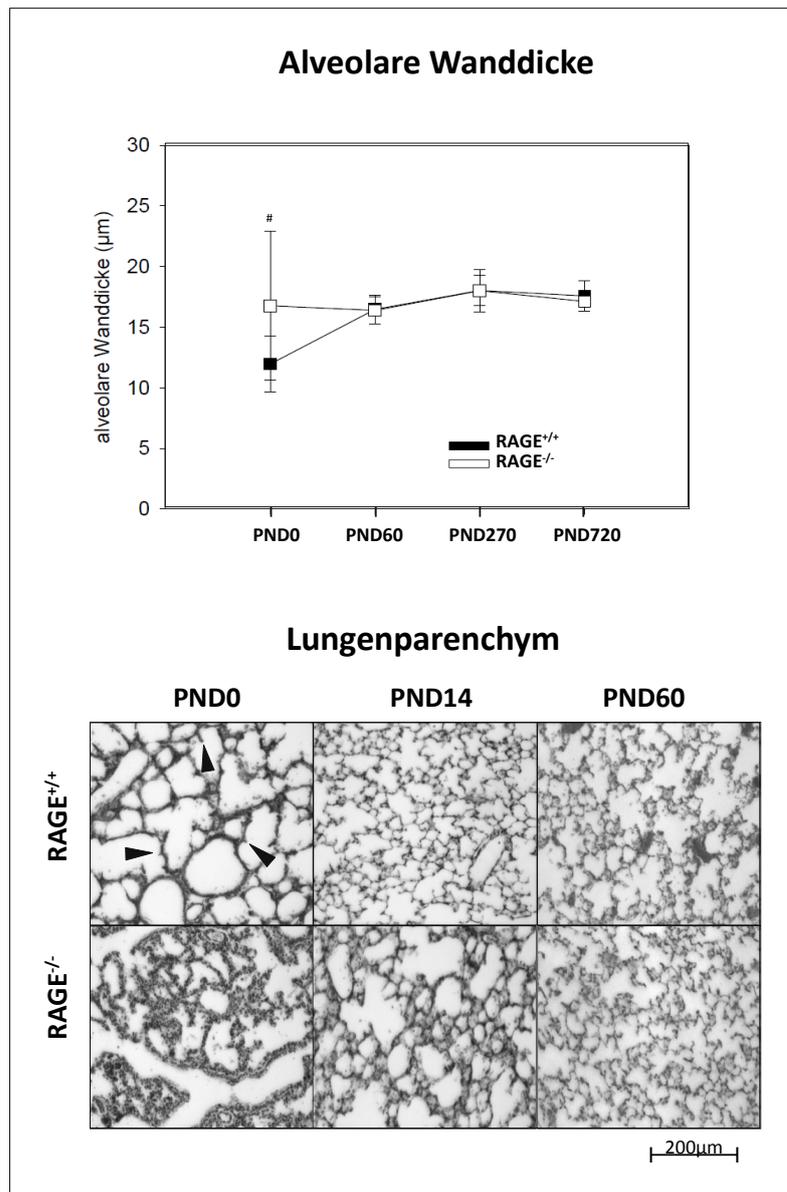


Abbildung 7: PND- und RAGE-abhängige Entwicklung des Lungenparenchyms (Histochemie mit HE) inklusive der alveolaren Wanddicke in der Maus. Die Pfeile markieren die kammerartigen Strukturen der primären Septen. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung mit: # $P \leq 0,05$ vs. Genotyp mit gleicher Behandlung.

sollten. Die Untersuchungen zur mitochondrialen und cytoplasmatischen Bildung von $O_2^{\bullet-}$, als ein Beispiel für ROS, zeigen keine RAGE-abhängigen Unterschiede in der Lunge zum Zeitpunkt PND0 und PND14 (Abb. 8). Auch die Proteinmenge der ausgewählten antioxidativ-wirkenden Enzyme ist durch RAGE unverändert (Abb. 8). Jedoch nimmt die Proteinmenge der Katalase entwicklungsabhängig von PND0 bis PND14 sowohl bei RAGE^{+/+}- als auch RAGE^{-/-}-Mäusen zu, wohingegen die Proteinmengen der MnSOD und Cu/ZnSOD unverändert bleiben (Abb. 8).

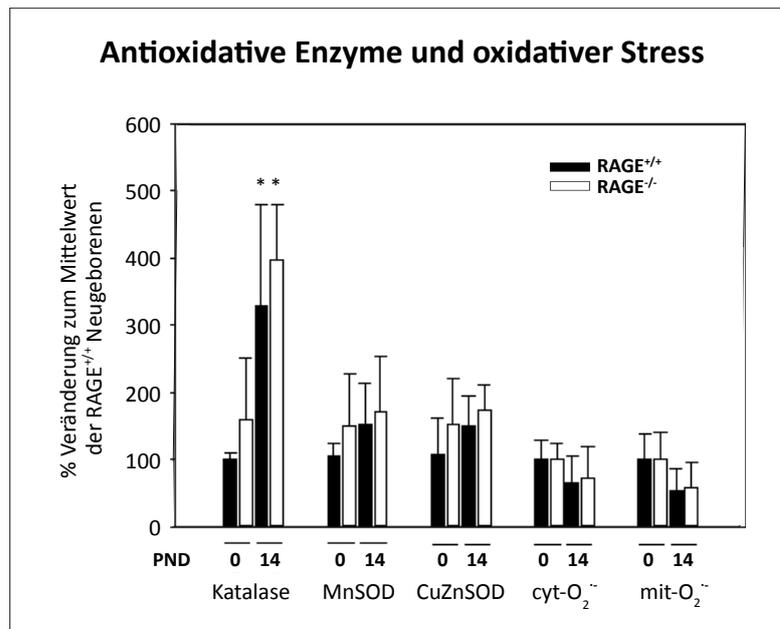


Abbildung 8: PND- und RAGE-abhängige Expression ausgewählter antioxidativer Enzyme (Immunoblot bzw. Immunodotplot) sowie Gehalt an O₂^{•-} in der zytoplasmatischen (cyt) oder mitochondrialen (mit) Zellfraktion (ESR-Analyse) muriner Lungen. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte + Standardabweichung mit: * P ≤ 0,05 vs. Kontrollgruppe (Normoxie).

4.2 Einfluss neonataler Hyperoxie auf das Überleben und weitere Parameter der Mäuse

Die Überlebensanalysen der RAGE^{+/+}-Mäuse weisen keinen Einfluss der moderaten (mH) und starken neonatalen Hyperoxie (sH) auf das Überleben unmittelbar nach der Behandlung an PND14 auf (Tab. 9). An PND60 waren auch andere Parameter der RAGE^{+/+}-Mäuse, wie Körpergewicht, Lungengewicht, Proteinmenge sowie Albumin- und IgM-Gehalt der BAL, Leukozyten und Erythrozyten durch die Behandlung mit mH und sH nicht beeinflusst (Tab. 9). Die zytologische Untersuchung der in der BAL enthaltenen Immunzellen zeigt keine Veränderung in der Anzahl der Immunzellen bei den RAGE^{+/+}-Mäusen an PND60 insgesamt, sowie separat nach Zelltyp (Monozyten-ähnliche Zellen, Makrophagen, Granulozyten, EPC, nicht gezeigt). Die Überlebenswahrscheinlichkeit der RAGE^{+/+}-Mäusen nimmt an PND60 unter mH signifikant ab (Tab. 9). An PND60 nimmt bei den RAGE^{+/+}-Mäusen nach sH die *wet-to-dry-ratio* der Lunge signifikant zu (Tab. 9). Außerdem nimmt die Zellzahl der BAL bei den RAGE^{+/+}-Mäusen an PND60 unter mH signifikant zu, nicht jedoch bei sH (Tab. 9). Die Anzahl der Thrombozyten nimmt bei den RAGE^{+/+}-Tieren an PND14 unter mH nur tendenziell, unter sH jedoch signifikant zu (Tab. 9).

Bei den RAGE^{-/-}-Mäusen zeigen sich bei den allgemeinen Parametern, wie Körper- und Lungengewicht keine Veränderungen unter Hyperoxie (Tab. 9). Auch die BAL-spezifischen Parameter, wie Zellzahl, Proteinmenge, Albumin und IgM sind nicht verändert (Tab. 9). Die Überlebensanalysen der RAGE^{-/-}-Mäusen weisen eine signifikante Verminderung des Überlebens bei sH, sowohl an PND14 als auch PND60 auf (Tab. 9). Im Hämogramm der RAGE^{-/-}-Tiere an PND14 sind die Leukozyten bei mH signifikant verringert (Tab. 9). An PND60 zeigt sich hingegen keine Veränderung. Die Anzahl der Erythrozyten ist bei den RAGE^{-/-}-Mäusen an PND14 sowohl bei mH als auch bei sH signifikant verringert (Tab. 9). Hingegen ist die Anzahl der Thrombozyten bei den RAGE^{-/-}-Tieren an PND14 bei sH signifikant höher. AN PND60 tritt der gleiche Effekt bei den RAGE^{-/-}-Tieren ausschließlich bei mH auf.

In den allgemeinen Messdaten und Hämatogramm finden sich keine Unterschiede zwischen RAGE^{+/+}- und RAGE^{-/-}-Mäusen (Tab. 9). Differentielle Effekte zwischen den Genotypen finden sich nur in den zellbiologischen und biochemischen Daten für die BAL. So ist die Zellzahl in der BAL bei den RAGE^{-/-}-Mäusen bei moderater Hyperoxie unverändert und bei RAGE^{+/+}-Mäuse signifikant erhöht (Tab. 9). Die Protein- und Albuminmenge sowie die Zellzahl der BAL sind generell bei den RAGE^{-/-}-Mäusen signifikant höher als bei den RAGE^{+/+}-Mäusen, ebenso wie der IgM-Gehalt (Tab. 9).

Tabelle 9: Einfluss postnataler Hyperoxie auf allgemeine Parameter, BAL und Hämatogramm in der Maus in Abhängigkeit vom Grad der Hyperoxie und RAGE-Genotyp.

	RAGE ^{+/+}				RAGE ^{-/-}			
	N	mH	sH		N	mH	sH	
Allgemeine Parameter								
Überleben	PND14	93	85	82	92	89	70*	
	PND60	83	66*	70	85	84	65*	
Körpergewicht (g)	PND14	5,97 ± 0,96	6,11 ± 0,99	5,66 ± 0,97	5,93 ± 1,47	6,11 ± 0,91	6,40 ± 1,41	
	PND60	19,3 ± 2,78	19,7 ± 2,66	19,2 ± 2,86	19,2 ± 3,13	18,9 ± 2,58	19,9 ± 3,26	
Lungengewicht/Körpergewicht	PND60	1,29 ± 0,28	1,28 ± 0,26	1,37 ± 0,28	1,37 ± 0,23	1,35 ± 0,30	1,35 ± 0,27	
Lungen wet-to-dry-Ratio	PND60	8,32 ± 1,43	7,84 ± 1,66	8,80* ± 1,38	8,32 ± 1,48	8,19 ± 1,79	8,07 ± 3,25	
Zellbiologische und biochemische Daten der bronchoalveolären Lavage (BAL)								
Zellen (n · 10 ³)	PND60	52,6 ± 32,9	101* ± 59,1	58,2 ± 40,7	65,6# ± 39,9	88,5# ± 46,9	79,3 ± 51,2	
Proteinmenge (µg · ml ⁻¹)	PND60	88,9 ± 34,5	80,5 ± 36,7	96,2 ± 38,7	151* ± 66,8	138# ± 70,2	133# ± 41,1	
Albumin (µg · ml ⁻¹)	PND60	51,9 ± 32,2	45,6 ± 21,0	48,3 ± 25,5	66,9# ± 29,7	67,8# ± 26,6	72,8# ± 34,5	
IgM (ng · ml ⁻¹)	PND60	15,1 ± 13,2	16,0 ± 9,53	18,9 ± 14,7	21,3# ± 10,0	24,2* ± 9,95	26,2# ± 12,5	
Hämatogramm								
Leukozyten (n · 10 ³ · mm ⁻³)	PND14	10,1 ± 3,74	6,66 ± 2,80	6,87 ± 2,76	10,8 ± 4,98	6,09* ± 2,92	8,23 ± 3,21	
	PND60	10,2 ± 2,58	7,89 ± 2,64	8,95 ± 3,02	9,44 ± 2,53	10,5 [§] ± 3,88	10,6 ± 2,20	
Erythrozyten (n · 10 ³ · mm ⁻³)	IPND14	5,73 ± 0,89	4,86 ± 1,16	5,49 ± 0,33	6,72 ± 1,25	4,65 [§] ± 1,15	5,39* ± 0,95	
	PND60	6,66 ± 0,96	8,01 [§] ± 0,40	7,12 [§] ± 1,13	7,23 ± 1,07	8,04 [§] ± 0,65	7,34 [§] ± 0,55	
Thrombozyten (n · 10 ⁶ · mm ⁻³)	PND14	0,23 ± 0,18	0,68 ± 0,51	1,02* ± 0,18	0,24 ± 0,15	0,46 ± 0,46	0,93* ± 0,24	
	PND60	0,16 ± 0,10	0,37 ± 0,44	0,23 [§] ± 0,18	0,16 ± 0,08	0,47* ± 0,36	0,23 [§] ± 0,25	

Mittelwerte ± Standardabweichung mit: * P ≤ 0,05 vs. Kontrollgruppe, # P ≤ 0,05 vs. Genotyp mit gleicher Behandlung, § P ≤ 0,05 vs. Altersgruppe mit gleicher Behandlung Normoxie (N), moderate Hyperoxie (mH), starke Hyperoxie (sH), postnataler Tag (PND)

4.3 Einfluss neonataler Hyperoxie auf die Lungenstruktur

Detaillierte histologische Analysen dienen der Bewertung von Alveolenzahl sowie der Alveolenwanddicke und Zellzahl. Die Behandlung der RAGE^{+/+}-Mäusen mit sH nicht aber mit mH führt an PND60 zu einer verminderten Anzahl an Alveolen (Abb. 9). Die Anzahl der Alveolen ist an PND60 in den RAGE^{-/-}-Mäusen generell vermindert und wird durch die Behandlung mit neonataler Hyperoxie nicht beeinflusst (Abb. 9). Die durchschnittliche alveoläre Wanddicke nimmt sowohl bei den RAGE^{+/+}- als auch bei den RAGE^{-/-}-Mäusen unter sH zu (Abb. 9). Generell ist die durchschnittliche alveolare Wanddicke in den RAGE^{-/-}-Mäusen größer als in den RAGE^{+/+}-Mäusen (Abb. 7 und 9). Durch sH nimmt die durchschnittliche Anzahl an Zellkernen pro Gewebefläche bei den RAGE^{+/+}-Mäusen signifikant ab (Abb. 9). Bei den RAGE^{-/-}-Mäusen ist dieser Effekt nur tendenziell erkennbar.

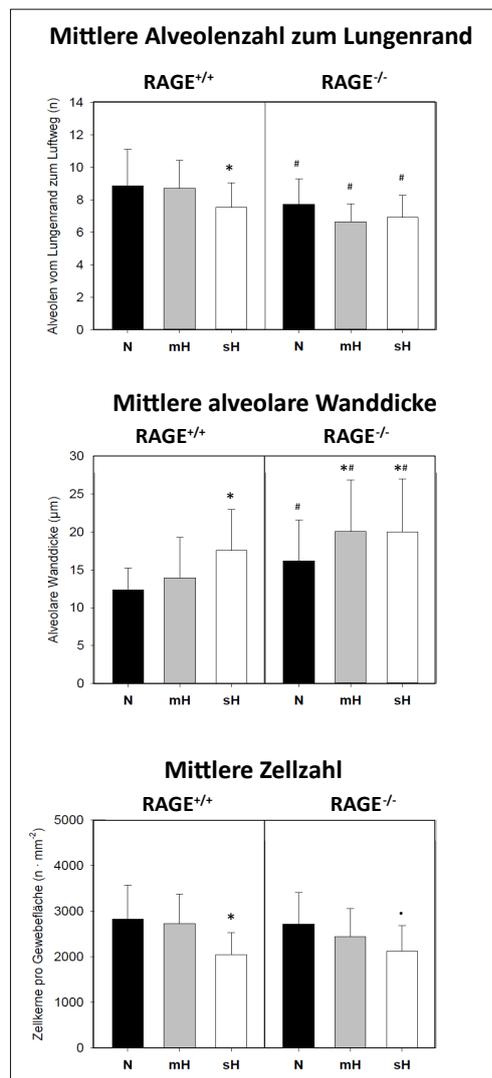


Abbildung 9: Einfluss neonataler Hyperoxie auf Anzahl der Alveolen, alveolare Wanddicke und Zellzahl in der Mauslunge (PND60) in Abhängigkeit vom Grad der Hyperoxie und RAGE-Genotyp. Die Analysen beruhen auf den histologischen Auswertungen der HE-Färbungen. Die Zellzahl wurde durch Auszählung der Zellkerne ermittelt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte + Standardabweichung mit: * $P \leq 0,05$ vs. Kontrollgruppe (Normoxie), # $P \leq 0,05$ vs. Genotyp mit gleicher Behandlung.

Als Messparameter für die Größe der Lufträume im Lungenparenchym wurde der *mean linear intercept* (MLI) ermittelt. Dazu wurde ein Messgitter mit 10 Linien auf die Fotos projiziert (Abb. 10, Messgitter). Gezählt wurden alle Alveolen, die von einer Linie angeschnitten wurden. Der Mittelwert aller Linien ist der ermittelte MLI pro Tier.

In den RAGE^{+/+}-Tieren nimmt der MLI durch sH an PND60 zu (Abb. 10, MLI). Die Quartil-abhängige Analysen des mittleren MLI zeigen, dass dieser Effekt mehr durch die Erweiterung der großen Lufträumen bewirkt wird (Abb. 10, Quartil-abhängiger MLI).

In den RAGE^{-/-}-Mäusen ist der mittlere MLI der großen Lufträume im Lungenparenchym an PND60 im Vergleich zu den RAGE^{+/+}-Tieren basal erhöht (Abb. 10, MLI), wofür die größeren Lufträumen verantwortlich sind (Abb. 10, Quartil-abhängiger MLI). Die Behandlung mit mH führt in den RAGE^{-/-}-Mäusen zur Zunahme des MLI (Abb. 10, MLI), welche ebenfalls mit der Erweiterung der großen Lufträume zu begründen ist (Abb. 10 Quartil-abhängiger MLI). Generell sind an PND60 die großen Lufträume der RAGE^{-/-}-Mäuse größer als die der RAGE^{+/+}-Tiere (Abb. 10, Quartil-abhängiger MLI).

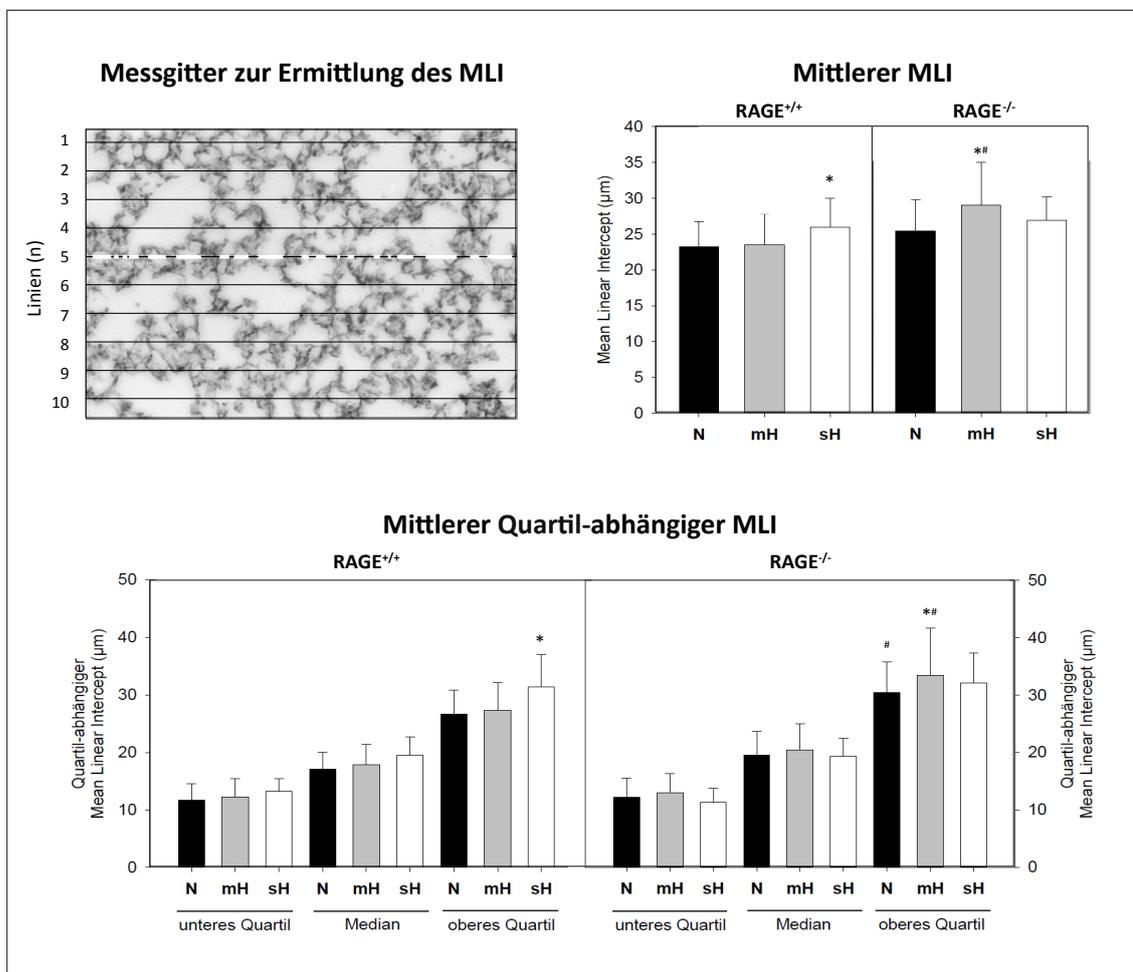


Abbildung 10: Einfluss neonataler Hyperoxie auf den *mean linear intercept* (MLI) in der Mauslunge (PND60) in Abhängigkeit vom Grad der Hyperoxie und RAGE-Genotyp. Die Analysen beruhen auf den histologischen Auswertungen der HE-Färbungen mittels Messgitter. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte + Standardabweichung mit: * $P \leq 0,05$ vs. Kontrollgruppe (Normoxie), # $P \leq 0,05$ vs. Genotyp mit gleicher Behandlung.

4.4 Einfluss neonataler Hyperoxie auf Quantität und Qualität der elastischen Fasern

Anhand der Binarisierung konnte mittels Schwellenwert kein Einfluss von mH und sH auf die Elastin-Proteinmenge an PND60 in RAGE^{+/+}- oder RAGE^{-/-}-Mäusen festgestellt werden (Abb. 11, Elastin-Proteinmenge). Auch die mRNA-Menge von Elastin ist in den Lungen von Hyperoxie-behandelten RAGE^{+/+}- und RAGE^{-/-}-Mäusen an PND120 unverändert (Abb.11, Elastin mRNA-Menge). Basal zeigen jedoch RAGE^{-/-}-Mäuse an PND60 eine geringere Elastin mRNA-Menge als RAGE^{+/+}-Mäuse. An PND120 gibt es diesen Unterschied nicht mehr (Abb.11, Elastin mRNA-Menge). Zudem ist die Elastin mRNA-Menge stark durch das Alter der Tiere beeinflusst. So weisen RAGE^{+/+}-Mäuse an PND60 eine signifikant höhere Menge an Elastin-mRNA auf als an PND120 (Abb.11, Elastin mRNA-Menge).

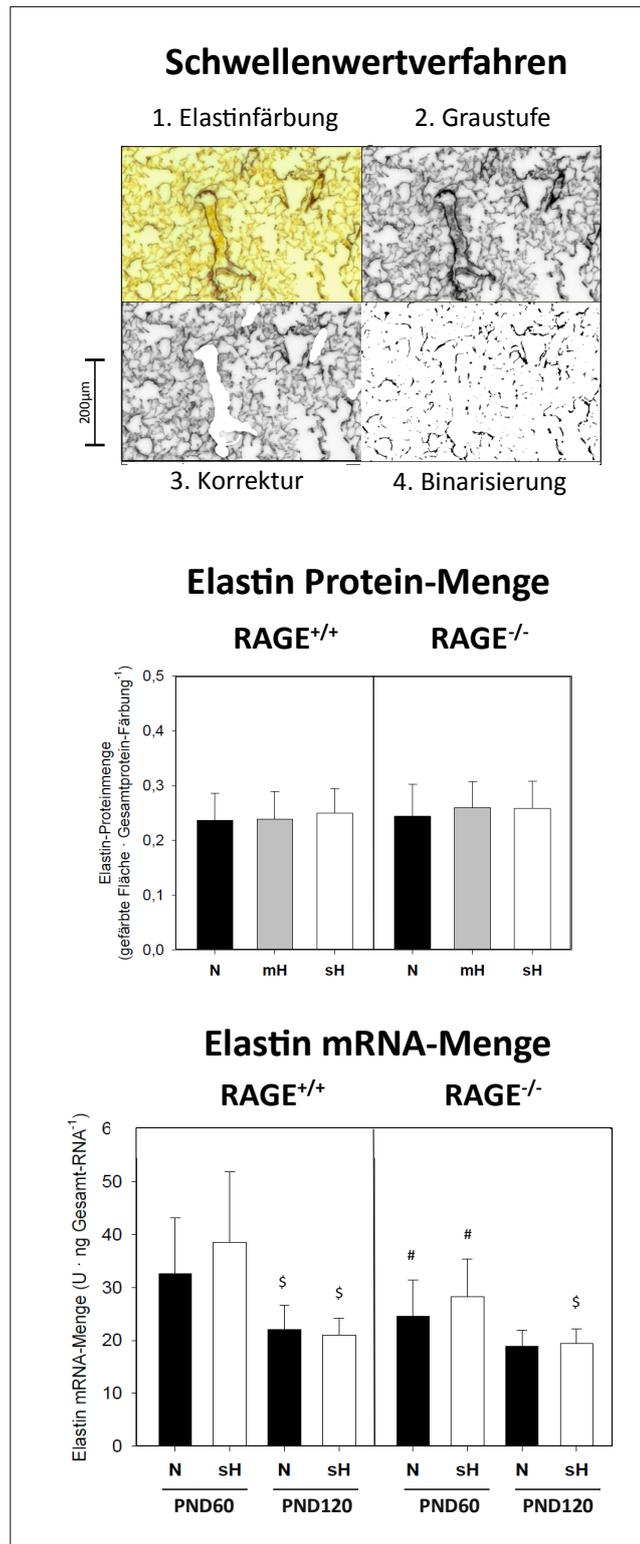


Abbildung 11: Einfluss neonataler Hyperoxie auf die Proteinmenge von Elastin (histologische Auswertung der Hart-Färbung im sog. Schwellenwertverfahren, PND60) sowie der mRNA-Menge (RT-qPCR, PND60 und PND120). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte + Standardabweichung mit: # $P \leq 0,05$ vs. Genotyp mit gleicher Behandlung, \$ $P \leq 0,05$ vs. Altersgruppe mit gleicher Behandlung.

Des Weiteren wurde die Qualität der Elastinfasern mittels Score-Systems eingeschätzt (Abb. 12, Elastin-Färbung und Score-System). Dabei zeigt sich, dass die Behandlung mit sH zu einer Verkürzung der elastischen Fasern in den Lungen von RAGE^{+/+}-Mäusen, nicht aber in denen von RAGE^{-/-}-Mäusen führt (Abb.12, Mittlerer Elastin-Score).

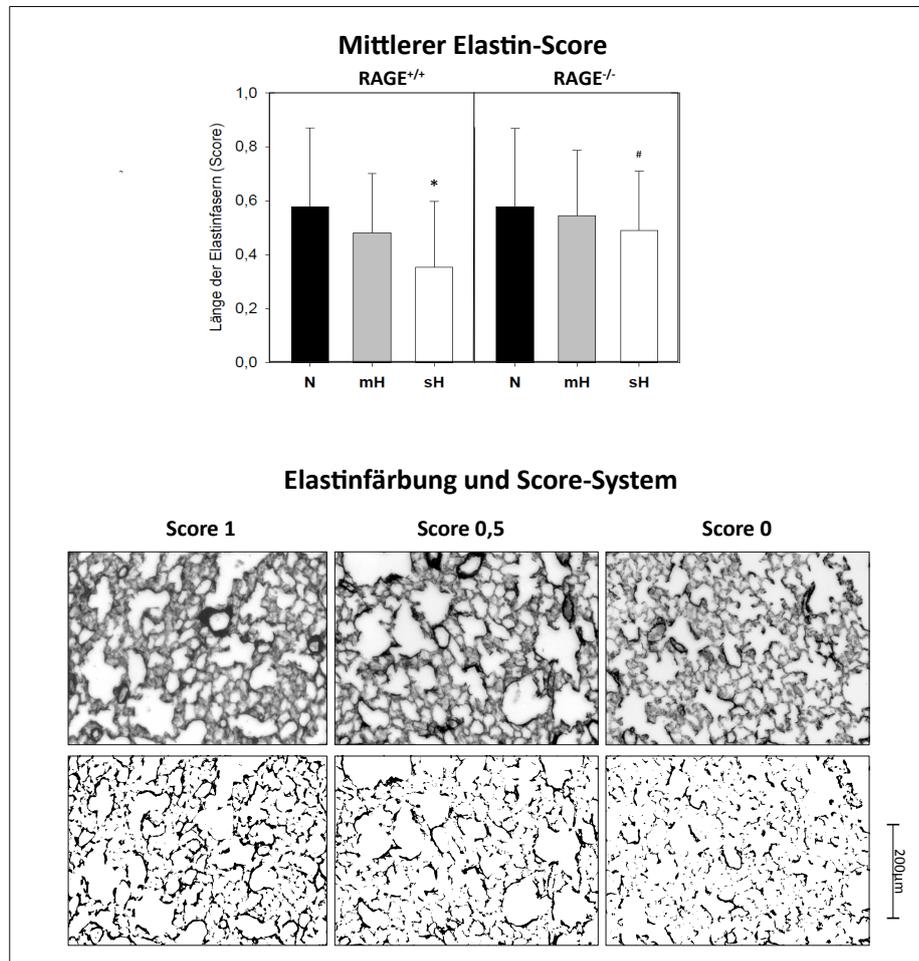


Abbildung 12: Einfluss neonataler Hyperoxie auf die Proteinqualität von Elastin (histologische Auswertung der Hart-Färbung im sog. Schwellenwertverfahren, PND60). Dazu wurde ein Score-System entwickelt: Score 1 - überwiegend lange Elastinfasern, Score 0,5 - lange und kurze Elastinfasern und Score 0 - überwiegend kurze Elastinfasern. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte + Standardabweichung mit: * $P \leq 0,05$ vs. Kontrollgruppe (Normoxie), # $P \leq 0,05$ vs. Genotyp mit gleicher Behandlung.

4.5 Einfluss neonataler Hyperoxie auf Faktoren des Alveolarepithels

Es wurden Faktoren ausgewählt, die relativ spezifisch von Alveolarepithelzellen vom Typ I bzw. Typ II gebildet werden, um die Hyperoxie-vermittelten Veränderungen im Alveolarepithel zu untersuchen. Während die Typ I-Zellen primär sRAGE und Aquaporin-5 (AQP5) bilden, exprimieren die Typ II-Zellen die Surfactant-Proteine (SP) B und C. sRAGE ist die proteolytische Variante von RAGE und kann daher nur in der BAL der RAGE^{+/+}-Mäuse nachgewiesen werden. Einen Einfluss durch mH oder sH wurde an PND60 nicht festgestellt (Abb. 13, BAL sRAGE Protein-Menge).

Da sRAGE unverändert blieb und die vorangegangenen histologischen Analysen einen negativen Einfluss der sH, nicht aber der mH auf die Lungenstruktur zeigten (Abb. 9 und 10), wurden Aquaporin-5 (AQP5) sowie die Surfactant-Proteine (SP) B und C nur in den Lungen der Mäuse untersucht, die zuvor mit sH behandelt wurden. Die Ergebnisse der AQP5-Expression zeigen keinen Einfluss der Behandlung mit sH an PND60 und PND120 in RAGE^{+/+}-Mäusen, weder auf Protein- noch auf RNA-Ebene (Abb. 13, AQP5 Protein-Menge und AQP5 mRNA-Menge). Dagegen sinkt der Proteingehalts von AQP5 bei den Mäusen an PND120 deutlich (Abb. 13, AQP5 Protein-Menge). Auffällig ist, dass die Proteinmenge von AQP5 bei den RAGE^{-/-}-Mäusen an PND120 stark vermindert (Abb.13, AQP5 Protein-Menge), hingegen die mRNA-Menge erhöht ist (Abb. 13, AQP5 mRNA-Menge). Umgekehrt ist es bei den RAGE^{+/+}-Mäusen an PND60 (Abb. 13, AQP5 Protein-Menge und AQP5 mRNA-Menge). Die RAGE^{-/-}-Mäuse reagieren auf sH zwar mit einer Zunahme der AQP5-Menge an PND60, eine vergleichbar hohe Proteinmenge wie in den RAGE^{+/+}-Mäusen wird jedoch nicht erreicht (Abb. 13, AQP5 Protein-Menge).

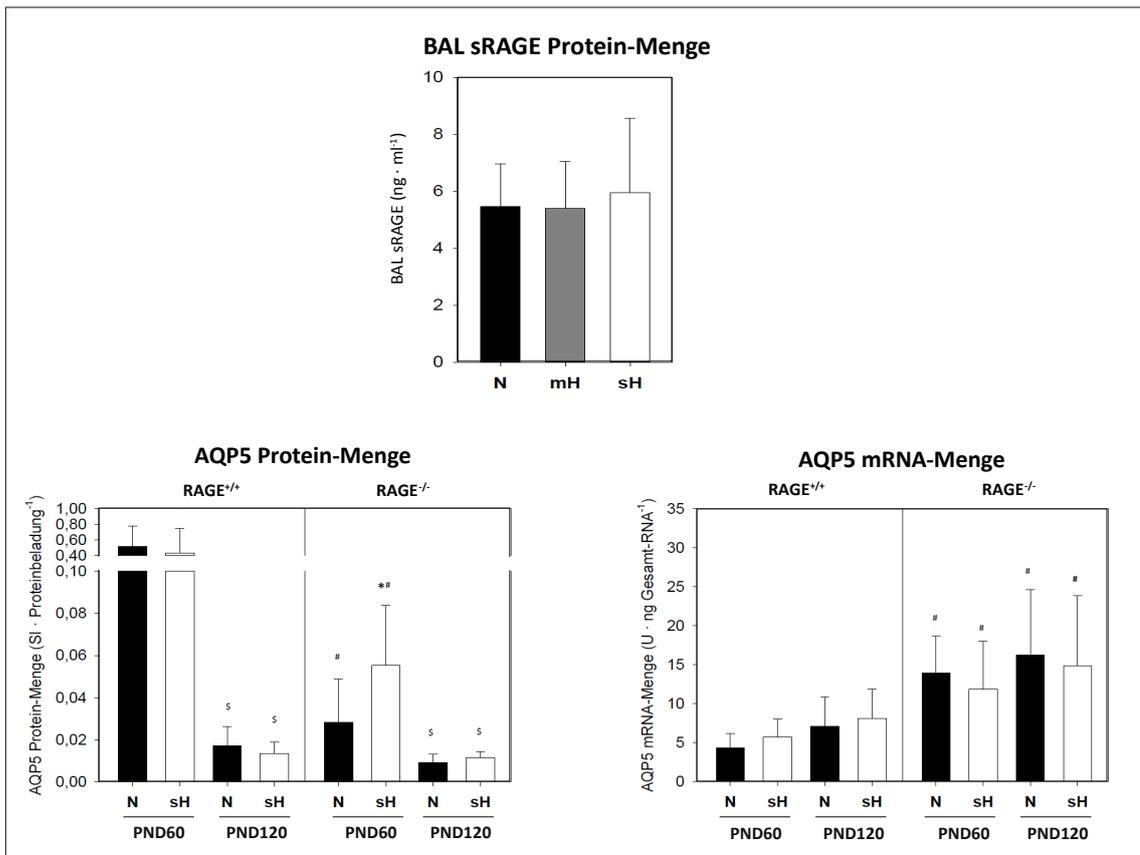


Abbildung 13: Einfluss neonataler Hyperoxie auf die mRNA- und Protein-Menge AT I-spezifischer Faktoren. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte + Standardabweichung mit: * $P \leq 0,05$ vs. Kontrollgruppe (Normoxie), # $P \leq 0,05$ vs. Genotyp mit gleicher Behandlung, \$ $P \leq 0,05$ vs. Altersgruppe mit gleicher Behandlung.

Untersuchungen zur Expression von SP-B und -C zeigen den primären Einfluss des Alters und RAGE-Knockout, nicht jedoch durch eine Behandlung mit sH (Abb. 14). Auf die Protein-Menge von SP-B hat weder sH, das Alter der Tiere noch der RAGE^{-/-} einen Einfluss (Abb. 14, SP-B Protein-Menge). Die mRNA-Expression von SP-B ist in RAGE^{-/-}-Mäusen an PND60 basal höher, nicht jedoch an PND120 (Abb. 14, SP-B mRNA-Menge).

Die Protein-Menge von SP-C ist stark Alters-abhängig, da sie sowohl in den RAGE^{+/+}- als auch RAGE^{-/-}-Mäusen an PND60 deutlich höher ist als an PND120 (Abb. 14, SP-C Protein-Menge). Bei den RAGE^{+/+}-Tieren ist die SP-C Proteinmenge an PND60 basal größer als bei den RAGE^{-/-}-Mäusen (Abb. 14, SP-C Protein-Menge). Ähnlich wie bei AQP5 ist die SP-C mRNA-Menge in den RAGE^{+/+}-Tieren gegensätzlich, d.h. an PND60 deutlich geringer als an PND120 (Abb. 14, SP-C mRNA-Menge). Die mRNA-Menge von SP-C von RAGE^{-/-}-Mäuse an PND60 und PND120 ist vergleichbar mit der von RAGE^{+/+}-Mäusen an PND120 (Abb. 14, SP-C mRNA-Menge).

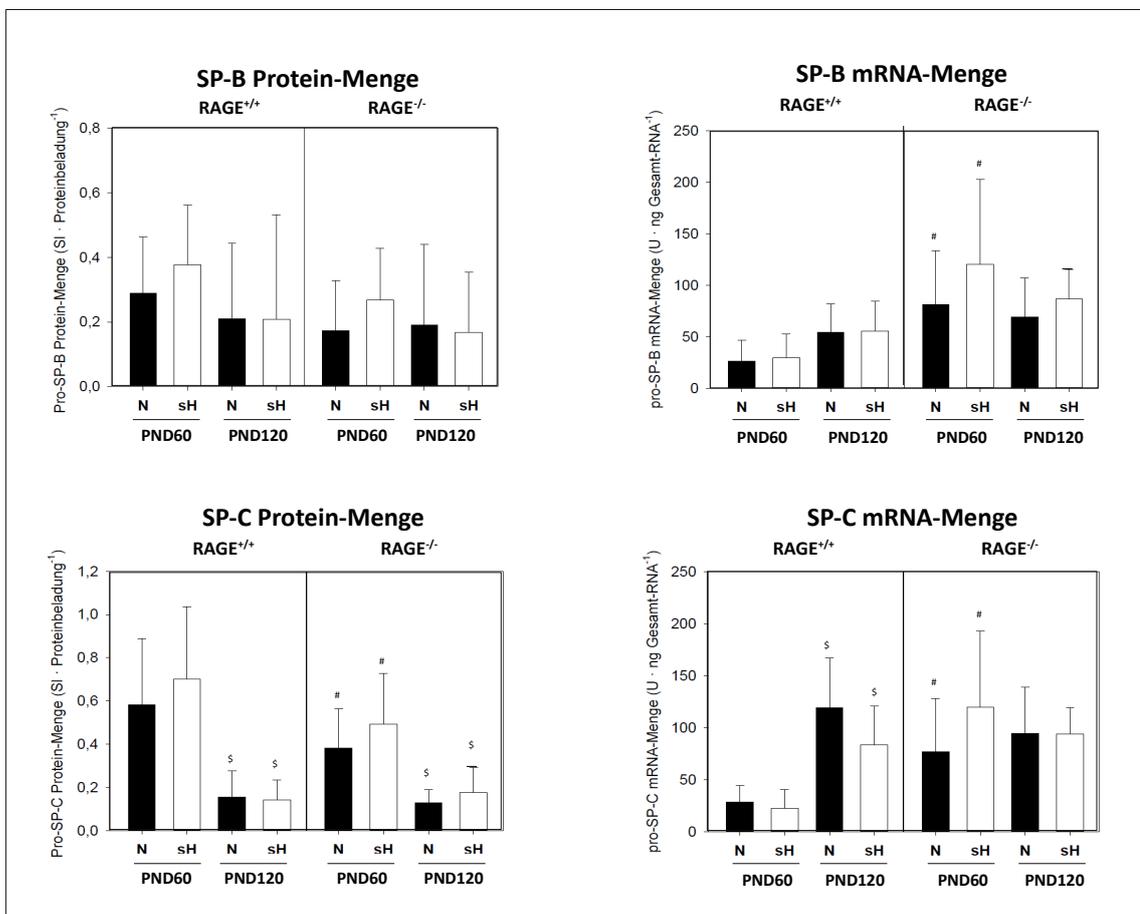


Abbildung 14: Einfluss neonataler Hyperoxie auf die mRNA- und Protein-Menge AT II-spezifischer Faktoren. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte + Standardabweichung mit: # $P \leq 0,05$ vs. Genotyp mit gleicher Behandlung, \$ $P \leq 0,05$ vs. Altersgruppe mit gleicher Behandlung.

4.6 Einfluss neonataler Hyperoxie auf die Funktion der Lunge

Die Lungenfunktion der mit neonataler Hyperoxie behandelten Mäuse wurde erst an PND120 untersucht, da die Analysen eine ausreichende Größe der Tiere voraussetzt. Aufnahmen der Druck-Volumen-Kurve bei den RAGE^{+/+}-Mäusen zeigen, dass es zu einer Hyperoxie-abhängigen Verschiebung der Kurve nach oben kommt (Abb. 15). Bei einem durchschnittlichen Tidalvolumen von 10 μl je g KG (Bissonnette *et al.* 2001; Palmer *et al.* 2013) muss das zuvor mit neonataler Hyperoxie-behandelte Tier zunehmend weniger Pleuraldruck aufbauen, um das Tidalvolumen zu erreichen (Abb. 15). Die Druck-Volumen-Kurve der RAGE^{-/-}-Mäuse wurde durch die Hyperoxie nicht signifikant beeinflusst (Abb. 15). Die RAGE^{-/-}-Mäuse müssen bereits basal weniger Pleuraldruck aufbauen, um ein Tidalvolumen von 10 μl je g KG einzuatmen, als die RAGE^{+/+}-Mäusen - ein Effekt, der sich bei den zuvor mit mH, nicht aber mit sH behandelten Tiere verstärkt (Abb. 15).

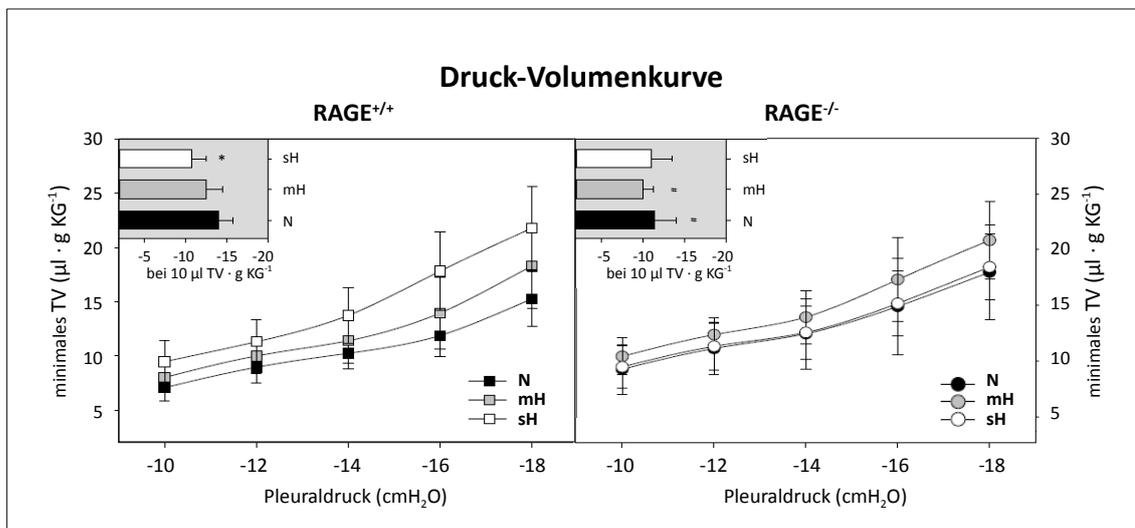


Abbildung 15: Einfluss neonataler Hyperoxie auf die Lungenfunktion (PND120). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung mit: * $P \leq 0,05$ vs. Kontrollgruppe (Normoxie), # $P \leq 0,05$ vs. Genotyp mit gleicher Behandlung.

Die Veränderungen im Pleuraldruck-Tidalvolumen-Verhältnis spiegeln sich analog in den Werten zur Lungencompliance wider (Tab. 10). Die dynamische Compliance steigt bei den RAGE^{+/+}-Tieren mit zunehmender Hyperoxie an. Bei den RAGE^{-/-}-Mäusen tritt dieser Effekt nur bei mH auf. Basal weisen RAGE^{-/-}-Mäuse eine größere dynamische Compliance auf, als die RAGE^{+/+}-Tiere (Tab. 10). sH hat bei den RAGE^{+/+}-Tieren an PND120 einen negativen Effekt auf die in- und expiratorischen Spitzenflüsse, jedoch nicht auf die Atemwegsresistenz. Die in- und expiratorischen Spitzenflüsse werden bei den RAGE^{-/-}-Mäusen durch Hyperoxie nicht beeinflusst (Tab. 10). Jedoch wird die Atemwegsresistenz durch moderate Hyperoxie verringert (Tab. 10)

Unter experimentellen Bedingungen geben die Lungen von RAGE^{+/+}-Tieren, die mit sH behandelt wurden, weniger CO₂ ab (Δ pH vermindert), wohingegen die O₂-Aufnahme unbeeinflusst blieb. Bei den RAGE^{-/-}-Mäusen wird die CO₂-Abgabe unter Hyperoxie noch erhöht. Auch hier bleibt die O₂-Aufnahme unverändert (Tab. 10). Nur RAGE^{+/+}-Tiere, die mit sH behandelt worden waren, zeigen eine Erhöhung der *wet-to-dry*-Ratio nach *ex vivo*-Analysen der Lunge (Tab. 10).

Tabelle 10: Einfluss postnataler Hyperoxie auf die *ex vivo*-Dynamik und -Stabilität der Mauslunge (PND120) in Abhängigkeit vom Grad der Hyperoxie und RAGE-Genotyp.

	RAGE ^{+/+}			RAGE ^{-/-}		
	N	mH	sH	N	mH	sH
Messdaten zur Lungendynamik						
Dynamische Compliance (cmH ₂ O · μl ⁻¹)	21,2 ± 2,82	25,4* ± 3,44	27,4* ± 6,77	28,6# ± 5,44	35,0*# ± 4,54	33,7# ± 7,19
durchschnittlicher inspiratorischer Spitzenfluss (μl · s ⁻¹)	3612 ± 547	3730 ± 608	3237* ± 557	3426 ± 571	3552 ± 295	3460 ± 725
durchschnittlicher expiratorischer Spitzenfluss (μl · s ⁻¹)	-3475 ± 499	-3642 ± 373	-3011* ± 572	-3372 ± 418	-3426 ± 374	-3153 ± 636
Resistance (cmH ₂ O · ml ⁻¹ · s ⁻¹) bei 10 μl TV · g KG ⁻¹	1,23 ± 0,26	1,16 ± 0,11	1,25 ± 0,16	1,26 ± 0,13	1,10* ± 0,07	1,35 ± 0,28
Messdaten zur Lungenstabilität						
Δ pO ₂ (mmHg) bei 10 μl TV · g KG ⁻¹	52,0 ± 9,76	52,6 ± 12,7	51,2 ± 8,47	53,4 ± 9,45	51,7 ± 7,58	54,1 ± 7,74
Δ pH-Wert in CO ₂ -eingestellten Perfusionspuffer	0,40 ± 0,12	0,43 ± 0,10	0,33* ± 0,11	0,47 ± 0,11	0,58*# ± 0,11	0,49# ± 0,06
Lungen <i>wet-to-dry</i> -Ratio	6,44 ± 0,60	6,61 ± 0,88	7,73* ± 1,28	6,87 ± 1,11	6,64 ± 0,46	6,73# ± 0,42

Tidalvolumen (TV), Körpergewicht (KG)
Mittelwerte ± Standardabweichung mit: * P ≤ 0,05 vs. Kontrollgruppe (Normoxie), # P ≤ 0,05 vs. Genotyp mit gleicher Behandlung

5 Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass ein RAGE-Knockout zu keiner offensichtlichen Einschränkung in der allgemeinen Entwicklung führt. Es zeigen sich jedoch RAGE-abhängige Unterschiede in der Lungenentwicklung. Die Limitation der Alveolarisierung in der Lunge von RAGE^{-/-}-Mäusen ist durch weniger, aber größere und dickere Alveolen gekennzeichnet, wobei die Durchlässigkeit der alveolo-kapillären Membran erhöht ist. Die Unterschiede im Lungenparenchym von RAGE^{-/-}-Mäusen werden durch die reduzierten Protein-Mengen von SP-C und AQP5 deutlich, wohingegen die RAGE-abhängigen Unterschiede nur auftreten bevor die Mäuse voll ausgewachsen sind.

Schwere neonatale Hyperoxie hat negative Effekte auf die Struktur und Funktion der adulten Lunge, die auf die Entstehung eines Lungenemphysems hinweisen. In den adulten Tieren zeigen sich keine Hinweise auf das Vorhandensein von oxidativem Stress oder Inflammationen im Lungenparenchym. Analysen der Länge der elastischen Fasern und vergleichende Analysen des mRNA- und Protein-Menge von Elastin weisen auf eine zentrale Rolle der starken neonatalen Hyperoxie auf langlebige extrazelluläre Matrixstrukturen in der adulten Lunge hin. Im Gegensatz zur starken Hyperoxie verursacht moderate neonatale Hyperoxie im Erwachsenenalter kaum signifikante Veränderungen in der Lungenhistologie und -funktion.

RAGE-abhängige Unterschiede zeigen sich auch in der Sensitivität gegenüber neonataler Hyperoxie. Dabei finden sich in den Lungen von RAGE^{-/-}-Mäusen weniger Hyperoxie-induzierte Langzeitschäden, wie sie durch Veränderungen in der Alveolenzahl und -struktur, der Verkürzung der elastischen Fasern und der Limitierung der Spitzenatemströme bei den RAGE^{+/+}-Mäusen deutlich werden.

5.1 RAGE fördert die Abdichtung der alveolo-kapillären Membran

RAGE-Molekülen zeigen homophile Interaktionen und besitzen dadurch die Fähigkeit parallele und anti-parallele Homodimere zu bilden (Al-Robaiy *et al.* 2013). Durch diese Eigenschaft spielt RAGE als Adhäsionsmolekül eine wichtige Rolle in der Lunge und trägt entscheidend zur Abdichtung der alveolo-kapillären Membran bei (Sessa *et al.* 2014). In den basalen Untersuchungen zeigte sich die erhöhte Durchlässigkeit der alveolo-kapillären Membran bei RAGE^{-/-} in der signifikant höheren Protein-, Albumin- und IgM-Menge sowie der erhöhten Zellzahl der BAL. Bereits andere Studien konnten eine Erhöhung der Albuminmenge in der BAL bei RAGE^{-/-} (Wolf *et al.* 2017) sowie eine erhöhte Durchlässigkeit der alveolo-kapillären Membran zeigen (Shivanna *et al.* 2015; Ota *et al.* 2016; Al-Robaiy *et al.* 2018). Ursächlich dafür könnte der Verlust von RAGE selbst als Adhäsionsmolekül sein, aber auch das niedrigere Expressionslevel von Proteinen in RAGE^{-/-}-Mäusen, die für die Barrierefunktion des Alveolarepithels wichtig sind (Wolf *et al.* 2017), wie etwa Claudin-18, das *tight junctions* in Epithelzellen ausbildet. Bei fehlenden Inflammationszeichen ist die Erhöhung von IgM ausschließlich durch die erhöhte Durchlässigkeit der alveolo-kapillären Membran zu erklären. RAGE hat demnach eine wichtige Bedeutung bei der Abdichtung der alveolo-kapillären Membran in der Lunge.

5.2 RAGE hat keinen Einfluss auf den neonatalen entwicklungsabhängigen Gehalt an ROS-Bildung in der Lunge

Die Rolle von RAGE als membranständiger Multiliganden-Rezeptor und zentrales Signalmolekül des angeborenen Immunsystems sowie die RAGE-induzierten intrazellulären Signalpathways, wie z.B. die Aktivierung von p21ras, der MAP-Kinase und NF- κ B, sind mittlerweile gut untersucht. Über den NF- κ B-Pathway lassen sich mittels Expressionsregulation eine Vielzahl an unterschiedlichen Zellaktivitäten, wie z.B. inflammatorische Prozesse, Zelladhäsion, Apoptose bis hin zum Zellzyklus steuern (Swarup *et al.* 2013). Dabei hat intrazelluläres ROS als Signalmolekül eine große Bedeutung. Auch die Liganden-RAGE-Interaktion führt zur Erzeugung von ROS (Daffu *et al.* 2013). Eine AGE-Infusion induziert bei endothelialen Zellen einen Anstieg des oxidativen Stress- und des NF- κ B-Levels, wobei RAGE-Antikörper diesen Effekt unterdrücken (Yan *et al.* 1994). Die *in vivo*-Versuche von Coughlan *et al.* (2009) zeigen, dass AGE-RAGE-Interaktionen zur initialen Generierung von ROS mittels zytosolischem NADPH (reduziertes Nicotinamidadenindinukleotidphosphat) führen. Die folgende Aktivierung der NADPH-Oxidase führt zu einer veränderten Genexpression in Makrophagen (Wautier *et al.* 2001) und neutrophilen Granulozyten (Omori *et al.* 2008). In den durchgeführten Analysen zeigte sich basal keine Unterschiede in Hinblick auf das Vorhandensein bzw. Fehlen von RAGE auf das oxidative Stresslevel. RAGE alleine hat demnach keinen Einfluss auf das oxidative Stresslevel. Dafür muss sehr wahrscheinlich eine RAGE-Aktivierung z.B. mittels Liganden vorliegen.

5.3 RAGE hat keinen Einfluss auf den neonatalen entwicklungsabhängigen Gehalt an anti-oxidativen Enzymen in der Lunge

Das fetale Level an körpereigenen antioxidativen Enzymen steigt zum Ende der Schwangerschaft kontinuierlich an (Asikainen und White 2005; Poggi und Dani 2014). Auch postnatal nimmt ihre Menge in der Lunge von Mäusen weiter zu (Berkelhamer *et al.* 2013). In der vorliegenden Arbeit wurden die drei antioxidativen Enzyme Katalase (CAT), Mangan-Superoxid-Dismutase (Mn-SOD) und Kupfer-Zink-Superoxid-Dismutase (Cu/Zn-SOD) in der frühen Entwicklungsphase von Mäusen untersucht. RAGE hat dabei keinen Einfluss auf den neonatal entwicklungsabhängigen Gehalt an anti-oxidativen Enzymen in der Lunge.

Frühgeborene, die an BPD erkranken, zeigen ein verringertes Plasma-Level an Glutathion (Smith *et al.* 1993). Dies deutet auf eine Unreife der antioxidativen Abwehr bei Frühgeborenen hin, die in Kombination mit Hyperoxie die Wahrscheinlichkeit für zelluläre Verletzungen durch oxidativen Stress erhöht (Yee *et al.* 2009). In Frühgeborenen-Tiermodellen konnte eine Erhöhung der Expression von SODs und GPx (Frank und Sosenko 1991; Morton *et al.* 1999) sowie CAT (Bouch *et al.*, 2017) durch Hyperoxie nicht induziert werden. Dies deckt sich z.T. mit den Ergebnissen dieser Arbeit (Daten nicht gezeigt), die zeigen, dass die relativen Protein-Mengen der untersuchten SODs durch neonatale Hyperoxie in der frühen Entwicklungsphase nicht verändert waren. Einzig CAT war an PND14 hochreguliert. Ursache dafür könnte eine unzureichende Hyperoxie-induzierte Stimulation der antioxidativen Mechanismen sein, welche sich auch in dem Level der freien ROS in der Lunge widerspiegelt. Im Falle einer aktivierten antioxidativen Abwehr direkt nach der Hyperoxie hätte das endogene Level der freien ROS zu diesem Zeitpunkt deutlich reduziert sein müssen. Die Zusammenstellung von Asikainen und White (2005) gibt einen Hinweis darauf, dass

die Fähigkeit zur Hyperoxie-induzierten Aktivierung von antioxidativen Enzymen Spezies-abhängig sein könnte.

5.4 RAGE fördert in der frühen neonatalen Entwicklung die Stabilisierung des AT-Zell-relevanten Proteins AQP5 in der Lunge

Neben RAGE gehört Aquaporin-5 (AQP5) zu den spezifischen Oberflächenproteinen der AT I-Zellen (Nielsen *et al.* 1997; Flodby *et al.* 2017). AQP5 ist ein klassisches Wasserkanalprotein, das sich an der apikalen Membran von AT I-Zellen befindet (Verkman *et al.* 2014) und durchgängig für H₂O, aber auch für Ionen und Gase ist, welche passiv entlang eines osmotischen Gradienten transportiert werden (Delporte *et al.* 2016).

Basal zeigen RAGE^{-/-}-Mäuse eine geringe AQP5 Protein-Menge bei einer erhöhten mRNA-Menge gegenüber RAGE^{+/+}-Mäusen. (s)RAGE hat demnach einen positiven Effekt auf die Stabilität und damit den Umsatz des AQP5-Proteins. Die RAGE-abhängigen Unterschiede beim AQP5-Protein sind zudem bei jungen Mäusen signifikant höher als bei erwachsenen Mäusen. Die Herunterregulierung mit zunehmendem Alter macht deutlich, dass die RAGE-abhängigen Unterschiede in der Expression von AQP5 nach der Alveolarisierungsphase der Maus (PND120) beendet sind. Dies deutet zudem auf eine verstärkte Anfälligkeiten der jungen und RAGE-exprimierenden Mäusen bezüglich der Entstehung von Lungenödemen bei akuten Lungenverletzungen hin, da die erhöhte Expression von AQP5 bei akuten Lungenschäden eine Rolle bei der Entstehung von Lungenödemen spielt (Zhang *et al.* 2011). In der Studie von Fu *et al.* (2008) konnte an frühgeborenen Ratten gezeigt werden, dass die mRNA-Expression von AQP5 nach Hyperoxiebehandlung (90 % O₂ für 21 d) verringert ist. Dem entgegen konnte an Mäusen eine Zunahme der AQP5-mRNA nach Hyperoxiebehandlung (100 % O₂ für 10 d) nachgewiesen werden (Yee *et al.* 2014). Dabei erfolgte die Analyse direkt nach der Hyperoxiebehandlung. In der vorliegenden Arbeit, nach der 45-tägigen Erholungsphase bei Raumluft, konnte keine Verminderung der AQP5 mRNA-Expression durch Hyperoxie festgestellt werden. Dies deutet auf einen geringen Langzeiteffekt der neonatalen Hyperoxie auf zelluläre Komponenten hin.

5.5 RAGE fördert in der frühen neonatalen Entwicklung die Stabilisierung des AT-Zell-relevanten Proteins SP-C in der Lunge

Die Tensidproteine SP-B und SP-C werden von AT II-Zellen synthetisiert. SP-B bildet Homodimere und bindet an die Zellmembran, deren Oberflächenspannung es herabsetzt (Simonato *et al.* 2011). Des Weiteren ist SP-B an der posttranslationalen Modifikation von SP-C beteiligt, so dass ohne SP-B kein reifes SP-C entstehen kann (Wert *et al.* 2009). *In vitro* führt ein RAGE-Knockout zu einer Verringerung der mRNA-Menge von SP-C (Wolf *et al.* 2017). Die in dieser Arbeit durchgeführten *in vivo*-Untersuchungen zeigen jedoch bei den RAGE^{-/-}-Tieren an PND60 eine Zunahme der mRNA-Menge, sowohl bei SP-B als auch bei SP-C. An PND120 finden sich diese Unterschiede zwischen RAGE^{+/+}- und RAGE^{-/-}-Tieren nicht mehr. Nur bei der SP-C Protein-Menge konnte eine Verringerung bei einem RAGE-Knockout ermittelt werden. Es gilt zu beachten, dass die Ergebnisse von *in vitro*- und *in vivo*-Studien schwerlich miteinander zu vergleichen sind, da die Rahmenbedingungen extrem voneinander abweichen. Es ist gut möglich, dass die „isolierten“ *in vitro*-Bedingungen nicht

die komplexen Regulationsmechanismen eines vollständigen Organismus widerspiegeln und die Ergebnisse deshalb voneinander abweichen.

In den Analysen hat das Alter der Tiere einen sehr großen Einfluss auf den Proteinumsatz und damit die Stabilität des Tensidproteins SP-C. Die Zusammenstellung von Basisty *et al.* (2018) gibt eine Übersicht über den Einfluss des Alterns auf den Proteinumsatz u.a. in Mäusen, wobei der Fokus auf (mitochondrialen) Stoffwechselprozessen liegt und dabei ausschließlich Herz-, Muskel- und Lebergewebe analysiert wurde. Dabei war der globale Proteinumsatz mit dem Alter bei vielen einzelnen Proteinen signifikant verändert, in der Summe jedoch leicht erhöht oder nicht signifikant verändert. In einigen Studien ging ein geringerer Proteinumsatz bei alten Tieren mit einer verbesserten Protein-Qualität einher (Dai *et al.* 2014; Karunadharma *et al.* 2015; Basisty *et al.* 2016). Junge RAGE^{+/+}-Tiere zeigen eine relativ hohe SP-C Proteine-Menge und eine relativ geringe SP-C mRNA-Menge und damit einen geringeren Proteinumsatz von SP-C als ältere Tiere. Davon ausgehend verringert sich bei älteren Tieren die Stabilität von SP-C. Bei SP-B ist dieser Effekt nicht erkennbar. RAGE^{-/-}-Tieren weisen schon im jungen Alter einen hohen SP-C Proteinumsatz auf, woraus eine RAGE-abhängige Regulation der Proteinstabilität von SP-C geschlossen werden kann, da sich RAGE positiv auf die Stabilität von SP-C auswirkt. Da AT II-Zellen keine allgemeine Quelle für die RAGE-Expression in der Lunge sind, wird dieser Effekt eventuell durch sRAGE über parakrine Signalwege verursacht. Der primäre Einfluss des Alters, aber nicht der neonatalen Hyperoxie auf die RAGE-abhängige Genexpression von AQP5 als AT I-Zell-assoziiertes Protein, SP-B und -C als AT II-Zell-assoziierte Proteine und Elastin als Fibroblasten-assoziiertes Protein weist zudem auf eine signifikante Erholung der alveolären Zelltypen im Erwachsenenalter hin.

Frühgeborene mit BPD zeigen eine Surfactant-Dysfunktion, von der vor allem die Surfactantproteine B und C betroffen sind (Merrill *et al.* 2004). Merrill *et al.* (2004) geht davon aus, dass es infolge der Surfactant-Dysfunktion zu einer Verschlechterung der Atmung kommt und dass die dann notwendige O₂- bzw. Beatmungsunterstützung in Kombination mit auftretenden Inflammationen zur Entwicklung einer BPD beitragen. In der Studie von Yee *et al.* (2014) führt neonatale Hyperoxie (100 % O₂) bei Mäusen an PND4 zu einer Verringerung der pro-SP-C Protein-Menge und an PND10 wieder zu einer Zunahme. In frühgeborenen Ratten ist die mRNA-Menge von SP-B nach Hyperoxiebehandlung (90 % O₂ für 21d) erhöht (Fu *et al.* 2008). Fu *et al.* (2008) sieht darin die Störung der Differenzierung der AT II-Zellen durch Hyperoxie. In der vorliegenden Arbeit hat neonatale Hyperoxie (50 bzw. 75 % O₂) keinen Einfluss auf die Protein- und mRNA-Menge der Tensidproteine SP-B und -C. Ursache für die Diskrepanz der Ergebnisse könnte in dem unterschiedlichen Studiendesign zu finden sein, da geringere O₂-Konzentrationen sehr wahrscheinlich nicht zu einer Störung der Zelldifferenzierung führen und somit keine Veränderungen auf Protein- und mRNA-Ebene sichtbar werden.

5.6 (s)RAGE und Inflammationen

sRAGE entsteht durch proteolytische Abspaltung aus dem membranständigen RAGE-Protein u.a. durch Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und besitzt keine transmembranäre und cytosolische Domäne (Fritz 2011). Ein erhöhter Gehalt an MMPs, wie er z.B. bei Diabetes und Atherosklerose vorkommt, führt zu einem Anstieg der sRAGE-Konzentration (Raucci *et al.* 2008; Yamakawa *et al.* 2011). Bei Lungenerkrankungen, wie COPD und ARDS zeigt sich ebenfalls eine Erhöhung der

sRAGE-Konzentration in der BAL (Uchida *et al.* 2006; Su *et al.* 2007; Sukkar und Postma 2013). Dabei fungiert sRAGE als „Köder-Molekül“ im extrazellulären Raum für die RAGE-Liganden und führt zur Unterdrückung des intrazellulären RAGE-Pathways und damit einhergehenden Inflammationen (Park *et al.* 1998). sRAGE hat demnach eine zytoprotektive Wirkung und spielt eine wichtige Rolle bei der Eindämmung von Inflammationen in der Lunge. Die sRAGE-Ergebnisse dieser Arbeit decken sich mit den Ergebnissen für IgM, dessen Menge nach der Hyperoxiebehandlung ebenfalls unverändert war. Dies deutet auf einen geringen Langzeiteffekt der neonatalen Hyperoxie auf zelluläre Komponenten hin. Die basalen RAGE-abhängigen Unterschiede in der alveolären Wandstärke und der Alveolenzahl lassen sich durch den Einfluss von sRAGE auf die Genregulation extrazellulärer Matrixproteine in Lungenfibroblasten erklären (Al-Robaiy *et al.* 2013).

In den sRAGE-Analysen dieser Arbeit konnte kein Einfluss von Hyperoxie auf die sRAGE-Konzentration und keine direkten Nachweise für inflammatorische Reaktionen gefunden werden. Ursächlich dafür könnte entweder das Fehlen von inflammatorischen Prozessen oder bereits deren Abklingen zum Zeitpunkt der Analysen sein. Einen Hinweis auf das Bestehen einer Inflammation kann die Anzahl der Leukozyten im Hämatogramm an PND14 geben. Diese ist bei RAGE^{-/-}-Tieren, die mit moderater Hyperoxie behandelt wurden, signifikant verringert. Bei allen anderen behandelten Tieren ist die Verringerung der Leukozytenzahl nur tendenziell erkennbar. Leukozyten, auch weiße Blutkörperchen genannt, finden sich im Blut, im Knochenmark oder den lymphatischen Organen und sind Teil der spezifischen und unspezifischen Immunabwehr (Janeway *et al.* 2002). Eine Verringerung der Leukozyten, eine sog. Leukopenie, kann auf eine Inflammation hindeuten, da dies einen erhöhten Verbrauch an Leukozyten und damit die Aktivierung des Immunsystems anzeigt. Eine andere Möglichkeit zur Verringerung der Leukozyten, nämlich eine verringerte Leukozytenproduktion im KM kann im Hinblick auf das Alter und die Behandlung der Tiere ausgeschlossen werden. In der Studie von Siddique *et al.* (2019) wird eine Leukopenie bei C57BL/6N-Mäusen mit Werten zwischen $4,5 - 5,0 \text{ n} \cdot 10^3 \cdot \text{mm}^{-3}$ Leukozyten beschrieben. Der vorliegende Minimumwert lag bei $6,1 \text{ n} \cdot 10^3 \cdot \text{mm}^{-3}$ Leukozyten (normal ca. $10 \text{ n} \cdot 10^3 \cdot \text{mm}^{-3}$), sodass in diesem Fall zwar noch nicht von einer Leukopenie gesprochen werden kann, der Trend dazu jedoch klar erkennbar ist. Außerdem ist zu beachten, dass Leukozyten in bestimmten Organen, wie z.B. Lymphknoten, Thymus oder Milz gespeichert werden und, dass es zu einer zeitlichen Verzögerung kommt, bis diese Speicher geleert sind und sich die Leukozytenzahl im Blut verringert. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass der inflammatorische Prozess in den infantilen Tieren schon längere Zeit andauert hat und eine Adaptation stattgefunden hat, so dass zum Zeitpunkt der Hauptanalyse keine Anzeichen bzw. direkten Nachweise für einen inflammatorischen Prozesse zu finden sind. Bei den jungen-adulten Tieren ist diese Tendenz weniger stark ausgeprägt. Ursächlich hat die 45-tägige Erholungsphase bei Raumluft zum Abklingen der Inflammation geführt.

5.7 RAGE fördert die Alveolarisierung

Die basolaterale Lokalisation von RAGE auf der Oberfläche der AT I-Zellen ist sehr wahrscheinlich von Bedeutung für die parakrine Signalwirkung zwischen dem Alveolarepithelzellen und den darunter liegenden mesenchymalen und/oder vaskulären Zellen (Reynolds *et al.* 2008). Zudem könnte die Co-Lokalisation von RAGE mit anderen basolateralen Proteinen eine Rolle bei der Epithelorganisation spielen (Bryant und Huwe 2000).

Generell scheinen Zell-Zell-Interaktion in der Lungenentwicklung von besonderer Bedeutung zu sein. Kapillare induzieren in der kanalikulären Phase die Abflachung der darüber liegenden Epithelzellen sowie die Differenzierung dieser in AT I-Zellen durch regulatorische Faktoren (Smith *et al.* 2010). *In vitro*-Analysen an isolierten murinen Alveolarzellen zeigen, dass auch RAGE die Differenzierung von AT II- zu AT I-Zellen fördert (Reynolds *et al.* 2008; Wolf *et al.* 2017). Dies würde auch die Korrelation der RAGE-Menge mit der murinen Alveolarisierungsphase erklären, wie sie auch in Ratten nachgewiesen wurde (Lizotte *et al.* 2007).

RAGE^{-/-}-Mäuse zeigen eine Limitierung der Alveolarisierung, die charakterisiert ist durch weniger, dafür größere Alveolen mit dickeren Alveolarwänden. Diese Veränderungen sind auch die Ursachen für die veränderte Atemmechanik der RAGE^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu den RAGE^{+/+}-Mäusen. (s)RAGE hat zudem eine wichtige Bedeutung für die Genexpression, besonders für die Expression extrazellulärer Matrix-Komponenten in Lungenfibroblasten (Bartling *et al.* 2005). Darin könnte die Ursache für die dickeren alveolären Zellwände, die ELN-Veränderung sowie die veränderte Alveolenzahl in RAGE^{-/-}-Mäuse liegen. Die größeren parenchymalen Lufträume und die verringerte Alveolenzahl in RAGE^{-/-}-Mäuse sind zudem der Beweis für den Einfluss von RAGE auf die Unterteilung der primitiven Alveolen (Alveolarsack) in reife Alveolen durch sekundäre Septenbildung während der Alveolarisierungsphase. RAGE hat demnach einen positiven Effekt auf die Alveolarisierung.

5.8 Neonatale Hyperoxie führt zur Störung der Alveolarisierung

Die Behandlung von Mäusen mit Hyperoxie mit einer O₂-Konzentration von 75 % bis zum Ende der sakkulären Phase (etwa PND15) (Chao *et al.* 2015) ist ausreichend, um typische Langzeitveränderungen in der Lunge zu induzieren, die dem klinischen Bild der BPD ähneln (Wong *et al.* 2008; Tipple *et al.* 2009; Velten *et al.* 2010; Gough *et al.* 2014; Um-Bergström *et al.* 2017; Kumar *et al.* 2018). Dazu gehört die Verringerung der Alveolarisierung der Lunge, welche mit dickeren Alveolarwänden und erweiterten parenchymalen Lufträumen einhergeht. Wie schon in anderen Studien mit vergleichbarem Studiendesign (Bozyk *et al.* 2012; James *et al.* 2013; Lee *et al.* 2013; Ramani *et al.* 2015; Kumar *et al.* 2016, 2018; Namba *et al.* 2016; Cox *et al.* 2017; Willis *et al.* 2018) zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine Verringerung der Alveolarisierung in Form von erweiterten parenchymalen Lufträumen und dickeren Alveolarwänden durch schwere neonatale Hyperoxie. Diese strukturellen Veränderungen der Lunge deuten auf ein Lungenemphysem hin, wie es auch bei Computertomographie-basierten Untersuchungen von Überlebenden der schweren BPD zu finden ist (Wong *et al.* 2008, 2011). Ursächlich dafür sind die Hyperoxie-induzierten inflammatorischen Veränderungen des Lungengewebes (Kallet und Matthay 2013; Bhandari *et al.* 2016), in dessen Folge sich vermehrt zelluläre Infiltrate in den Alveolen akkumulieren (Bouch *et al.* 2015; Kumar *et al.* 2018). Die darin enthaltenen neutrophilen Granulozyten sezernieren Proteasen u.a. auch Elastasen, welche die elastischen Fasern des Lungengewebes zerstören (Han *et al.* 2017a). Des Weiteren führen Sauerstoffradikale zur vermehrten Inaktivierung von u.a. Alpha-1-Antitrypsin, das dazu dient, Elastasen und andere Proteasen zu inaktivieren (Siddiqui *et al.* 2016). Die fortschreitende Zerstörung der elastischen Fasern in der Lunge führt zur Zunahme der Compliance und damit zur Verringerung der Fähigkeit der Lunge, sich bei der Expiration zusammenzuziehen, was langfristig zu einer Überblähung des Lungengewebes, dem sog. *gas-trapping* führt. In den

histologischen Analysen der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass vorrangig die großen Lufträume von der Vergrößerung nach der Behandlung mit Hyperoxie betroffen sind. Dies deutet auf einen starken Langzeiteffekt der starken neonatalen Hyperoxie auf den *Ductus alveolares* hin, aus denen die Alveolen während der Alveolarisierungsphase entstehen. Ebenfalls können die erhöhte Stärke der Alveolarwände und die daraus resultierende verringerte Zellzahl pro Gesamtfläche des Lungengewebes Ausdruck einer anormalen Expression von Elastin und anderer extrazellulärer Matrixmoleküle sein (Silva *et al.* 2015). Starke neonatale Hyperoxie führt demnach zur Störung der Alveolarisierung und zur Bildung eines Lungenemphysems.

5.9 Neonatale Hyperoxie führt zu RAGE-abhängigen Strukturveränderungen von Elastinfasern

Elastin (ELN) gehört zu den extrazellulären Matrixmolekülen und wird von Myofibroblasten gebildet (Boström *et al.* 1996; Lindahl *et al.* 1997). Elastin erlaubt der Lunge, sich bei der Inspiration auszu dehnen und bei der Expiration wieder zusammenzuziehen, diese Fähigkeit wird auch als *recoiling* bezeichnet. Direkt nach der Geburt findet eine Ummodellierung der vorhandenen elastischen Fasern statt, bei der aus den vorhandenen dünnen, verstreut liegenden Elastinfasern dicke Bündel entstehen (PND2 - PND14), welche die Alveolaröffnungen umgeben und im weiteren Verlauf an Dichte zunehmen (ab PND15) (Branchfield *et al.* 2016).

Neonatale Hyperoxie hat einen Einfluss auf das extrazelluläre ELN, da sich nach einer 14-tägigen Hyperoxie-Exposition bei neugeborenen Mäusen neben den normalen Elastinbündeln dichte Netze aus ELN ausbilden (Branchfield *et al.* 2016). Die Studie von Bozyk *et al.* (2012) konnte zudem eine Zunahme der mRNA-Expression sowie der Proteinmenge von ELN nach Hyperoxiebehandlung nachweisen. Jedoch erfolgten die Analysen in beiden Studien jeweils direkt nach der 14-tägigen Hyperoxie-Behandlung. In der vorliegenden Arbeit, bei der die Aufarbeitung erst 45 Tage nach der Behandlung erfolgte, wurde die mRNA-Expression und die Protein-Menge von ELN durch neonatale Hyperoxie nicht beeinflusst. Die Gesamtmenge an Elastin gilt als Marker für Fibroblasten (Mariani *et al.*, 1998). Bei adulten Mäusen, die mit schwerer neonataler Hyperoxie behandelt wurden, blieb sie jedoch unverändert, weshalb von einem geringen Langzeiteffekt auf die zellulären Komponenten ausgegangen werden kann.

Es zeigten sich jedoch deutliche Veränderungen der elastischen Fasern bei RAGE^{+/+}-Mäusen nach der Behandlung mit neonataler Hyperoxie, wie sie auch in der Studie von Kumar *et al.* (2018) beschrieben wurden. Die in dieser Arbeit beschriebene Hyperoxie-induzierte Fragmentierung der elastischen Fasern ist die Ursache für die verringerte Lungenelastizität, die durch eine Zunahme der neutrophilen Elastase nach Hyperoxie (Han *et al.* 2017a) und durch eine erhöhte Bildung extrazellulärer ROS-Moleküle mittels NADPH-Oxidasen der NOX-Familie verursacht wird (Brandes *et al.* 2014). Bei fehlenden inflammatorischen Prozessen und ausbleibendem oxidativem Stress im Lungengewebe adulter Mäuse kann eine anhaltende Fragmentierung der elastischen Fasern nach der Behandlung mit neonataler Hyperoxie jedoch ausgeschlossen werden.

Darüber hinaus haben Peptidfragmente aus elastischen Fasern eine Bedeutung als Matrikine. Dabei handelt es sich um Fragmente, die proteolytisch aus extrazellulären Matrix-Makromolekülen entstehen und Zellaktivitäten beeinflussen können, da sie u.a. Einfluss auf die Proliferation, Migration, Proteaseproduktion und Apoptose haben (Maquart *et al.* 2004). Besonders die Elastinpeptidfragmente, die durch elastolytische Enzyme wie z.B. MMPs entstehen, haben Auswirkungen auf chronisch

obstruktive Lungenerkrankungen (Wells *et al.* 2015). Die Studie von Hilgendorff und O'Reilly (2015) zeigt, dass Kinder, die später an BPD erkranken, eine Zunahme der Proteaseaktivität und damit verbunden eine erhöhte Harnausscheidung von Desmosin, einem Abbauprodukt reifer Elastinfasern, aufweisen. In der Studie von Houghton *et al.* (2006) schützte die Suppression von MMPs vor der Entwicklung eines Zigarettenrauch-induzierten Emphysems und Makrophagen-Akkumulationen im Lungenparenchym adulter Mäusen. Es zeigte sich zudem, dass ROS-vermittelte Schäden an elastischen Fasern aufgrund der geringen Umsatzrate und einer damit sehr geringen Ersatzleistung langanhaltend sind (Shapiro *et al.* 1991). Die Emphysem-bedingte oxidative Fragmentierung der extrazellulären Matrix der murinen Lunge kann durch Überexpression der EC-SOD abgeschwächt werden (Yao *et al.* 2010). Da Elastinfragmente eine chemotaktische Wirkung auf Immunzellen ausüben (Houghton *et al.* 2006), jedoch in den vorliegenden Analysen keine inflammatorischen Prozesse nachgewiesen werden konnten, kann davon ausgegangen werden, dass die entstandenen Elastinfragmente für die Induktion der Chemotaxis unwirksam sind.

RAGE scheint unter Hyperoxiebedingungen einen negativen Einfluss auf die Struktur der Elastinfasern zu haben, da RAGE^{-/-}-Tiere keine so starke Fragmentierung der Elastinfasern aufweisen. Dies könnte auch die Ursache für die RAGE-abhängige Hyperoxie-induzierte Veränderungen der Lungenfunktion sein. Die Studie von Lee *et al.* (2015) zeigt zudem, dass RAGE eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung und Migration von Myofibroblasten spielt. Des Weiteren wird das, von den Myofibroblasten in den extrazellulären Raum sezernierte Tropoelastin (lösliches ELN) mittels Lysyloxidase (LOX) vernetzt, dessen Genexpression ebenfalls über den RAGE/NF- κ B-Pathway reguliert wird (Papachroni *et al.* 2010; Adamopoulos *et al.* 2016). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Elastin mRNA-Expression in jungen RAGE^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu RAGE^{+/+}-Mäusen verringert ist. Dieses Ergebnis deckt sich mit früheren Studienergebnissen der Arbeitsgruppe von PD Dr. rer. nat. Babett Bartling, die zu dem gleichen Ergebnis kommen und darüber hinaus in *Gene array*-Analysen zeigen konnten, dass in jungen RAGE^{-/-}-Mäusen die mRNA-Expression von LOX im Vergleich zu RAGE^{+/+}-Mäusen reduziert ist und eine Überexpression von RAGE bzw. sRAGE in Lungenfibroblasten und murinem Lungenparenchym zu einem erhöhten ELN mRNA-Level führt (Stogsdill *et al.* 2013; Al-Robaiy *et al.* 2013). Dies weist darauf hin, dass RAGE einen direkten Einfluss auf die Myofibroblasten und damit auf die mRNA-Expression von Elastin hat und eine Rolle bei der Vernetzung von Tropoelastin mittels LOX spielt.

Eine weitere Ursache für die RAGE-abhängigen Unterschiede bei den Hyperoxie-induzierten Schädigungen der elastischen Fasern der Lunge könnte das geringere Vorkommen von Apoptose-induzierten Inflammationen durch das Fehlen von RAGE selbst sein (Reynolds *et al.* 2011; Robinson *et al.* 2012; Ota *et al.* 2016). Ebenso könnten die dickere Alveolarwände in RAGE^{-/-}-Mäusen und die damit verbundene höhere Gesamtmenge an extrazellulärer Matrix indirekt die elastischen Fasern der Lunge schützen, da Hyperoxie-induziertes ROS durch Matrixkomponenten mit höheren Umsatzraten als Elastin abgefangen werden.

5.10 BPD durch starke neonatale Hyperoxie wird durch RAGE verstärkt

In der Studie von Wolf *et al.* (2017) zeigen RAGE^{-/-}-Mäusen ein Erhöhung der Compliance und Verringerung der Elastizität der Lunge, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden

konnten, ohne kritische Einschränkung der Expiration. Darin ist auch die Ursache begründet, warum RAGE^{-/-}-Mäusen basal weniger Atemarbeit leisten müssen als RAGE^{+/+}-Tiere. Damit lässt sich auch die in früheren Studien beschriebene veränderte Atmungsmechanik bei RAGE^{-/-}-Mäusen erklären (Al-Robaiy *et al.* 2013, 2018). Bei RAGE^{+/+}-Tieren tritt dieser Effekt erst nach der Behandlung mit neonataler Hyperoxie auf. Ursächlich für diese funktionellen Unterschiede ist die Verringerung der Alveolarisierung in RAGE^{-/-}-Mäusen, die durch eine verringerte Alveolenzahl, dickere Alveolarwände und größere parenchymale Lufträume gekennzeichnet ist.

Verringerte Werte bei Atemtests von jungen Erwachsenen, die an schwerer BPD erkrankt waren, geben Hinweise auf funktionelle Folgen von emphysemartigen Veränderungen in der Lunge (Wong *et al.* 2008; Gough *et al.* 2014; Um-Bergström *et al.* 2017). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten verringerte Spitzenatemströme bei RAGE^{+/+}-Mäusen, die mit starker postnataler Hyperoxie behandelt wurden. Andere Studien kommen nicht zu diesem Ergebnis, was darin begründet sein könnte, dass andere Instrumente, hauptsächlich Plethysmographen zur Beurteilung der Lungenfunktion verwendet wurden (McGrath-Morrow *et al.* 2011; O'Reilly *et al.* 2014; Ramani *et al.* 2015; Sozo *et al.* 2015; Kumar *et al.* 2016).

Die Resistance, auch Atemwegswiderstand genannt, wird neben der glatten Muskulatur der konduktiven Atemwege auch von elastischen Fasern beeinflusst. Eine Verringerung der elastischen Fasern würde zu einem Kollaps der kleineren Alveolen und letztendlich zu einer Zunahme des Atemwegswiderstands führen. Wie in einer früheren Arbeit der Arbeitsgruppe gezeigt, beeinflusst RAGE den Atemwegswiderstand nicht (Al-Robaiy *et al.* 2013). Eine starke neonatale Hyperoxie führt zu reduzierten inspiratorischen Spitzenflüssen ohne Veränderungen des Atemwegswiderstandes, was auf eine allgemeine Beeinträchtigung der Lungenelastizität im Erwachsenenalter hindeutet. In anderen Studien führt eine starke Hyperoxie hingegen zu erhöhten Atemwegswiderständen aufgrund von Schädigungen der konduktiven Atemwege (Ramani *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2016), was in den vorliegenden Analysen jedoch nicht beobachtet werden konnte. Die beobachteten funktionellen Veränderungen weisen auf Mängel im elastischen Recoiling der Lunge hin, die durch die *in situ* beobachtete Fragmentierung der elastischen Fasern verursacht werden könnten.

RAGE^{-/-}-Mäuse sind weniger sensitiv für Langzeitschäden durch neonatale Hyperoxie, da sich keine oder kaum Veränderung bei der Anzahl und Größe der Alveolen, Elastinfragmentierung und eine Reduzierung der Spitzenatemströme zeigen. Bei RAGE^{-/-}-Mäusen verursacht neonatale Hyperoxie demnach weniger langfristige Veränderungen der Lungenhistologie und -funktion als bei RAGE^{+/+}-Mäusen. Die nachteilige Wirkung von RAGE bei der Hyperoxie-induzierten Lungenschädigung neugeborener RAGE^{+/+}-Mäuse wird in den Lungenfunktionsanalysen sichtbar, die durch eine signifikante Erhöhung der Lungencompliance in Kombination mit reduzierten Spitzenatemströmen im Erwachsenenalter charakterisiert sind. Diese Ergebnisse stimmen mit Daten von adulten Mausmodellen überein, die zeigen, dass RAGE zu einer akuten Lungenschädigung durch Hyperoxie beiträgt (Reynolds *et al.* 2010; Ota *et al.* 2016). Eine Hyperoxie-induzierte BPD wird demnach durch RAGE noch verstärkt.

5.11 Neonatale Hyperoxie verändert konzentrationsabhängig die Konzentration der Thrombozyten

Thrombozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Blutgerinnung und entstehen durch Abspaltung aus Megakaryozyten (MK), die im Knochenmark (KM) gebildet werden und dort heranreifen. MK kommen nicht nur im KM, sondern auch in der Milz und in Lungenkapillaren vor (Slater *et al.* 1983; Zucker-Franklin und Philipp 2000; Kaushansky 2008) und reifen vorrangig in KM-Sinusoiden heran (Junt *et al.* 2007). Dabei handelt es sich um spezielle Blutgefäße, die aus einem diskontinuierlichen Endothelverband bestehen und u.a. für Blutzellen durchlässig sind. In der hämatopoetischen Nische des KM liegt der durchschnittliche partielle O₂-Gehalt (pO₂) bei ca. 5 %, in den KM-Sinusoiden bei 8 % und in den Lungenkapillaren bei 16 % (Eliades *et al.* 2012). Ein pO₂ von 20 % führt zu einem Anstieg der MK im peripheren Blut im Vergleich zu 5 % (Laluppa *et al.* 1998). Auch die MK-Reifung ist unter einem pO₂ von 20 % forciert (Mostafa *et al.* 2000). Direkt nach der Behandlung mit starker postnataler Hyperoxie zeigten die jungen Mäuse eine Zunahme der Thrombozytenzahl. Bei adulten Mäusen war dies nur nach Behandlung mit moderater Hyperoxie zu beobachten. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Reifung der MK sowie die Freisetzung von Thrombozyten aus MK O₂-abhängig sind. Es gibt Hinweise darauf, dass diese O₂-Abhängigkeit wiederum auf ROS-vermittelte Prozesse zurückzuführen ist (Chen *et al.* 2013). Murine Thrombozyten werden hauptsächlich aus Megakaryozyten im Lungengewebe gebildet (Lefrançais *et al.* 2017) und sind zudem an der Regulation der Lungenentwicklung beteiligt (Tsukiji *et al.* 2018). Daher könnte ihr Anstieg auch auf eine erhöhte zelluläre Aktivität hindeuten, um die Hyperoxie-induzierten Schäden zu kompensieren. Die mögliche Rolle der Thrombozyten bei der Reduktion Hyperoxie-induzierter Schäden in der neonatalen Lunge ist jedoch noch unbekannt.

5.12 Starke neonatale Hyperoxie, aber nicht moderate Hyperoxie, induziert eine BPD in der Maus

Bei der Analyse der Ergebnisse fällt auf, dass es Faktoren gibt, die sehr stark von Hyperoxie beeinflusst werden und andere Faktoren, auf die neonatale Hyperoxie kaum, bis keinen Einfluss hat. Keine Hyperoxie-bedingten Effekte zeigen sich auf die Expression von AQP5 und die Tensidproteine SP-B und SP-C. Hingegen wird die Anzahl der Thrombozyten, die Struktur der elastischen Fasern und die Compliance sehr stark durch Hyperoxie beeinflusst. Auch auf die histologische Lungenstruktur und -funktion hat eine neonatale Hyperoxiebehandlung starke Auswirkungen. Starke Effekte werden dabei auch meistens durch eine hohe O₂-Konzentration ausgelöst. Starke neonatale Hyperoxie führt bei adulten Mäusen zu emphysematösen Lungen ohne Anzeichen für oxidativen Stress und Inflammationen. Moderate neonatale Hyperoxie führt hingegen nicht zu Emphysemen in der murinen Lunge. Die Langzeiteffekte der neonatalen Hyperoxie zeigen sich hauptsächlich in Auswirkungen auf langandauernde Prozesse, wie z.B. die Thrombopoese oder extrazelluläre Matrixkomponenten, jedoch nicht auf zellulärer Ebene. Schnell zu regulierende Prozesse wie z.B. die Expression von Tensidproteinen weisen bei adulten Mäusen, die mit neonataler Hyperoxie behandelt wurden, keine Effekte durch die Hyperoxie auf. Die O₂-Konzentration muss zudem groß genug sein, um Auswirkungen auf die Lungenstruktur zu haben. Eine moderate neonatale Hyperoxie hat kaum einen negativen Einfluss auf die Lunge und führt zu keiner Störung der Alveolarisierung, starke neonatale Hyperoxie hingegen schon.

Trotzdem darf die Aussage „starke Hyperoxie gleich starke Auswirkung“ nicht pauschalisiert werden. Ein Blick in die Literatur zeigt, dass ähnliche Studiendesigns verschiedene, ja sogar widersprüchliche Ergebnisse liefern können. Ein Beispiel ist die Analyse des *radial alveolar count* (RAC) bei C57/BL6-Mäusen, die für 7 d mit neonataler Hyperoxie behandelt und an PND21 analysiert wurden: bei Dylag *et al.* (2017) haben 50 % O₂ keinen Einfluss auf den RAC, bei Wang *et al.* (2014a) zeigt sich hingegen schon bei 40 % O₂ eine signifikante Abnahme des RAC. Die vergleichende Studie von Yee *et al.* (2009) zeigt deutlich, dass es sowohl beim pro-SP-C, dem MLI sowie der Compliance und Elastizität der Lunge dosis-abhängige Effekte bei O₂-Konzentrationen zwischen 21 - 100 % gibt. Trotz der zum Teil unterschiedlichen Ergebnisse zeigt sich jedoch deutlich, dass hohe O₂-Konzentrationen, ob mit oder ohne Erholungsphase, zu Störungen der Alveolarisierung und Auswirkungen auf die Lunge führen. Bei geringeren Konzentrationen sind die Ergebnisse nicht eindeutig. Bei diesen Fällen scheint die individuelle Sensitivität der Tiere, die in starkem Zusammenhang mit der Stärke der körpereigenen antioxidativen Systeme steht, eine sehr viel entscheidendere Rolle zu spielen als bei hohen O₂-Konzentrationen. Schlussfolgernd lässt sich mit Blick auf die vorliegenden Ergebnisse feststellen, dass starke neonatale Hyperoxie, aber nicht moderate neonatale Hyperoxie, eine BPD in der Maus induziert.

5.13 Limitationen des Hyperoxie-induzierten Tiermodells

Die Lungenentwicklung bei Mensch und Maus verläuft sehr ähnlich (Chao *et al.* 2015) und eine Behandlung neonataler Mäuse mit Hyperoxie zeigt eine Ähnlichkeit zu der Hyperoxie-induzierten Lungenpathologie überlebender Frühgeborener. Es gilt jedoch zu beachten, dass die sakkuläre Lunge einer reifen neonatalen Maus darauf ausgerichtet ist, ihre physiologische Funktion zu erfüllen, wohingegen die sakkuläre Lunge eines frühgeborenen Menschen dies noch nicht vollständig kann. Demzufolge können adaptive Mechanismen, als Antwort auf eine Hyperoxie-Exposition, zwischen Mensch und Maus in dieser Phase der Lungenentwicklung sehr unterschiedlich ausfallen (Buczynski *et al.* 2013).

Die Behandlungsdauer wurde auf 14 d angesetzt, da dies laut Literatur für die verwendete O₂-Konzentration eine optimale Dauer mit gut ersichtlichen Versuchsergebnissen darstellte, ohne ein unnötig hohes Leid für die Tiere mit sich zu bringen (Popova 2013; Sozo *et al.* 2015). Es bleibt jedoch die Kritik, dass eine 14-tägige Hyperoxiebehandlung bei einer Maus einer 2-jährigen Behandlungsdauer beim Menschen entsprechen würde (Amy *et al.* 1977). Zudem werden in der Klinik die O₂-Konzentrationen und die Beatmungsdauer individuell anhand der Blutgaswerte der Frühgeborenen angepasst und verändern sich dadurch sukzessiv. Damit kann das BPD-Mausmodell die Bedingungen, welche zur Entwicklung einer BPD bei Frühgeborenen führt, nicht vollständig nachahmen. Kürzere Behandlungsdauern würden bei den relativ niedrigen O₂-Konzentrationen zu keinen Veränderungen in der Lungenstruktur führen (Lee *et al.* 2013). An dieser Stelle stößt das Tiermodell an seine Grenzen.

Für den Versuchsaufbau wurde die offene Käfighaltung gewählt, da durch die einfache Handhabung und schnelle Zugänglichkeit der Tiere ein unkomplizierter Versuchsablauf gewährleistet werden konnte. Dabei besteht jedoch ein erhöhtes Risiko für die Ausbreitung von Krankheitserregern durch die Luft. Mittels Zugangsrestriktion und strikter Hygienemaßnahmen, wie z.B.

das Anlegen von Schutzkleidung und regelmäßiger Einstreuwechsel wurde die Gefahr einer Ausbreitung von Infektionskrankheiten so gering wie möglich gehalten. Trotzdem kann ein gewisser Selektionsprozess nicht gänzlich ausgeschlossen werden, da kranke und geschwächte Tiere vor dem Versuchsende verstarben und bei der Analyse nicht mit einbezogen wurden. Dadurch könnte es zu einer „Abschwächung“ der Effekte kommen, da unter extremen Bedingungen nur die gesünderen und weniger beeinträchtigten Tiere überlebten und deren Daten in die Analysen einfließen.

5.14 Aussichten

Jüngste Forschungsergebnisse deuten auf NTproBNT (*N-terminal pro-B-type natriuretic peptide*) als einen frühen Biomarker für BPD hin, da er bei extrem Frühgeborenen, die später eine BPD entwickeln, um den 14. Geburtstag signifikant erhöht ist (Méndez-Abad *et al.* 2019). Momentan gibt es kaum Medikamente zur direkten Behandlung von BPD. Da inflammatorische Prozesse ein wesentlicher Bestandteil der Pathologie der BPD sind, liegt der aktuelle Fokus auf der Behandlung entzündlicher Reaktionen mittels entzündungshemmender Medikamente wie z.B. inhalative Steroide. Andere Studien zeigen gute Behandlungsergebnisse durch die intratracheale Instillation von Surfactant-basiereten Budesonid, einem synthetisch hergestellten Glukokortikoid (Bassler 2015). Weitere Behandlungserfolge wurden durch hohe intramuskuläre Dose von Vitamin A, Caffein-Therapien und Antioxidantien erzielt (Greenough 2008; Ghanta *et al.* 2013; Tiwari *et al.* 2014). Auch bestimmte Arten von microRNA und mesenchymalen Stammzellen könnten vielversprechende neue Therapieansätze darstellen (van Haaften *et al.* 2009; Lal *et al.* 2018). Richtungsweisend könnte auch die Studie von Partridge *et al.* (2017) sein, in der die Entwicklung von zu früh geborenen Lämmern in einem extrauterinen Beutel, dem sog. Bio-Bag fortgesetzt wurde. In den Lungen-histologischen Analysen fanden sich keine Unterschiede zwischen Lämmern aus dem Bio-Bag und gleichaltrigen intrauterin entwickelten Lämmern. Diese Studie könnte vielversprechend für die zukünftige medizinische Versorgung von extrem Frühgeborenen sein.

Ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit könnte im nächsten Ansatz die simultane Instillation von rekombinantem sRAGE und Surfactant im Hyperoxie-induzierten BPD-Mausmodell überprüft werden. Zu erwarten wäre, dass sRAGE die pro-inflammatorischen Liganden von RAGE abfängt. Denkbar wäre auch die Kombination von rekombinaten extrazellulären SODs mit Surfactant, um die Elastinfragmentierung zu reduzieren. Diese experimentellen Ansätze ließen sich auch relativ unkompliziert in klinische Studien übertragen. Da eine RAGE-Überexpression in klinischen Studien so gut wie unmöglich ist und RAGE auf der Grundlage der vorliegenden Ergebnisse dazu führen würde, die Hyperoxie-induzierten Lungenschäden noch zu verstärken, bliebe letztendlich nur die Inhibition von RAGE, um die Lungenpathologie durch neonatale Hyperoxie zu reduzieren.

Die Fragmentierung der elastischen Fasern scheint eine zentrale Rolle bei der Entwicklung des emphysematösen Lungenphänotyps nach neonataler Hyperoxie-Exposition zu spielen, daher sollte der Fokus der zukünftigen Forschung darauf ausgerichtet sein nützliche Elastin-schützende Verbindungen zu identifizieren, die in Zukunft zusätzlich zur Surfactant-Therapie eingesetzt werden können.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit sollte die Rolle von RAGE in der Lunge und bei der Hyperoxie-induzierten BPD untersuchen. Für die Studie wurden neugeborene RAGE^{+/+}- und RAGE^{-/-}-Mäuse 14 Tage einer moderaten (50 % O₂) und starken Hyperoxie (75 % O₂) ausgesetzt. An PND60 und PND120 wurden die Lunge *in situ* und *ex vivo* untersucht sowie die Hämatogramme analysiert.

Die in der Zielstellung formulierten Fragen können wie folgt beantwortet werden:

1. Welche Bedeutung hat RAGE bei der Lungenentwicklung?

In den durchgeführten Analysen zeigt sich deutlich die Bedeutung von RAGE für die Abdichtung der alveolo-kapillären Membran. Außerdem wirkt sich RAGE positiv auf die Alveolarisierung aus und fördert in der frühen neonatalen Entwicklung die Stabilisierung einiger AT-Zell-relevanter Proteine wie AQP5 und SP-C in der Lunge. Auf den neonatal entwicklungsabhängigen Gehalt an anti-oxidativen Enzymen und die ROS-Bildung in der Lunge hat RAGE hingegen keinen Einfluss.

2. Welche Bedeutung hat RAGE bei der Hyperoxie-induzierten BPD?

Die vorliegende Arbeit bestätigt, dass starke neonatale Hyperoxie zu einer Störung der Alveolarisierung führt, wobei erstmals gezeigt werden konnte, dass davon vorrangig die größeren Lufträume im Lungenparenchym betroffen sind. Neonatale Hyperoxie verändert zudem konzentrationsabhängig das Blutbild, vor allem jedoch die Konzentration der Thrombozyten. Moderate und schwere hyperoxische Zustände bei neugeborenen Mäusen verursachen im Erwachsenenalter unterschiedliche Lungenphänotypen. Emphysematöse Lungen ohne anhaltenden oxidativen Stress und Inflammationen sind das Ergebnis einer schweren neonatalen Hyperoxie. Nicht-emphysematöse Lungen sind das Ergebnis einer moderaten neonatalen Hyperoxie. Damit induziert ausschließlich eine starke neonatale Hyperoxie eine BPD in der Maus. BPD, die durch starke neonatale Hyperoxie induziert wurde, wird durch RAGE noch verstärkt. Die zentrale Rolle dabei spielt die RAGE-abhängige Hyperoxie-induzierte Fragmentierung der elastischen Fasern.

Tabelle 11: Zusammenfassung der Effekte von RAGE und neonataler Hyperoxie sowie deren Zusammenwirken. Das Pluszeichen (+) zeigt einen positiven Effekt an, das Minuszeichen einen negativen Effekt (-), die Anzahl der Symbole gibt die Stärke des Effekts wieder.

	RAGE	neonatale Hyperoxie	RAGE + neonatale Hyperoxie
Abdichtung der alveolo-kapillären Membran	++	o	o
Stabilität AT-Zell-relevanter Proteine (AQP5, SP-C)	+	o	o
Alveolarisierung	+	--	-
Lungenemphysem	o	-	--
Elastinstruktur	o	o	--
Thrombozytenzahl	o	-	o

+ = positiver Effekt; - = negativer Effekt; o = kein Einfluss

Durch die Fülle an Untersuchungen ist eine Übersichtsarbeit über die Auswirkungen von neonataler Hyperoxie auf verschiedene Bereiche der Lunge entstanden. Moderate neonatale Hyperoxie führt kaum zur Entstehung von Lungenschäden, wohingegen starke neonatale Hyperoxie zu Lungenemphysemen und Störungen der parenchymalen Struktur der Lunge führt. Im Zentrum steht dabei die Fragmentierung der elastischen Fasern, die sowohl die strukturellen als auch die funktionellen Veränderungen der Lunge nach hyperoxischen Zuständen begründet. RAGE hat in der Lunge sowohl positive Effekte als auch negative Effekte. RAGE dichtet die alveolo-kapilläre Membran ab, fördert die Alveolarisierung und trägt zur Stabilität bestimmter AT-Zell-relevanter Proteine bei. Hingegen verstärkt RAGE die Hyperoxie-induzierte BPD sowie die Sensitivität der sich entwickelnden Lunge auf hyperoxische Zustände und trägt zur Fragmentierung der elastischen Fasern der Lunge bei.

Das ausbalancierte Zusammenspiel antioxidativer Enzyme und intra- wie auch extrazellulären ROS, als wichtiges Signalmolekül, ist unerlässlich für die physiologische Funktionalität der Lunge. Bei Störungen dieses minutiösen Gleichgewichts, wie es bei einer neonatalen Hyperoxie-Exposition der Fall ist, kommt es auf zellulärer Ebene zu überschießenden Reaktionen und Zellantworten, welche zu inflammatorischen Reaktionen und Schädigungen der zellulären, wie auch extrazellulären Strukturen führen. Anhaltend mündet dies in einer dauerhaften Störung und Remodellierung der alveolären Struktur, was letztendlich Langzeitauswirkungen auf die physiologische Funktionalität der Lunge hat, wie sie bei BPD auftritt.

Die Fortschritte in der intensivmedizinischen Versorgung von extrem Frühgeborenen haben dazu geführt, dass sich das Bild der BPD in den vergangenen Jahren verändert hat und immer mehr Kinder mit einem extrem geringen Geburtsgewicht überleben. Trotz umfangreicher und individuell angepasster Therapien bleibt die Problematik der unreifen Lunge und des damit verbundenen Risikos an BPD zu erkranken weiterhin bestehen. Die Langzeitfolgen der BPD-Erkrankung auf die erste Generation Überlebender mit einem extrem geringen Geburtsgewicht lassen sich immer noch nicht vollständig absehen (Bassler 2015). Neue BPD-Therapieansätze und -Früherkennungsmöglichkeiten sind jedoch vielversprechend. Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen dazu bei, die Pathologie der BPD und die daran beteiligten molekularen Vorgänge besser zu verstehen und darauf basierend neue Therapieansätze zu entwickeln.

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation sind bereits 2019 erfolgreich publiziert worden:

Kindermann, A., Baier, J., Simm, A., Haase, R. and Bartling, B. (2019) 'Receptor for advanced glycation end-products modulates lung development and lung sensitivity to hyperoxic injury in newborn mice', *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*. doi: 10.1007/s00424-019-02267-2.

Kindermann, A., Binder, L., Baier, J., Gündel, B., Simm, A., Haase, R. and Bartling, B. (2019) 'Severe but not moderate hyperoxia of newborn mice causes an emphysematous lung phenotype in adulthood without persisting oxidative stress and inflammation', *BMC pulmonary medicine*, 19(1), p. 245. doi: 10.1186/s12890-019-0993-5.

7 Literaturverzeichnis

- Adam S, Loertzer H, Fornara P, Brömme HJ (2010) The carboxyproxyl-derived spin trap (CP-H) is an appropriate detector-compound for oxidative stress. *Urol Res* 38:179–186. <https://doi.org/10.1007/s00240-010-0256-7>
- Adamopoulos C, Piperi C, Gargalionis AN, et al (2016) Advanced glycation end products upregulate lysyl oxidase and endothelin-1 in human aortic endothelial cells via parallel activation of ERK1/2–NF- κ B and JNK–AP-1 signaling pathways. *Cell Mol Life Sci* 73:1685–1698. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2091-z>
- Alejandre-Alcázar MA, Kwapiszewska G, Reiss I, et al (2007) Hyperoxia modulates TGF-beta/BMP signaling in a mouse model of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292:L537–549. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00050.2006>
- Alexiou P, Chatzopoulou M, Pegklidou K, Demopoulos VJ (2010) RAGE: a multi-ligand receptor unveiling novel insights in health and disease. *Curr Med Chem* 17:2232–2252
- Allen J, Zwerdling R, Ehrenkranz R, et al (2003) Statement on the care of the child with chronic lung disease of infancy and childhood. *Am J Respir Crit Care Med* 168:356–396. <https://doi.org/10.1164/rccm.168.3.356>
- Al-Robaiy S, Kindermann A, Wodischek S, et al (2018) Long-term endurance running activity causes pulmonary changes depending on the receptor for advanced glycation end-products. *Pflugers Arch* 470:1543–1553. <https://doi.org/10.1007/s00424-018-2175-3>
- Al-Robaiy S, Weber B, Simm A, et al (2013) The receptor for advanced glycation end-products supports lung tissue biomechanics. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 305:L491–500. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00090.2013>
- Amy RW, Bowes D, Burri PH, et al (1977) Postnatal growth of the mouse lung. *J Anat* 124:131–151
- Anderson PJ, Doyle LW (2006) Neurodevelopmental Outcome of Bronchopulmonary Dysplasia. *Seminars in Perinatology* 30:227–232. <https://doi.org/10.1053/j.semperi.2006.05.010>
- Asikainen TM, White CW (2005) Antioxidant defenses in the preterm lung: role for hypoxia-inducible factors in BPD? *Toxicol Appl Pharmacol* 203:177–188. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.07.008>
- Baker CD (2019) Long-term ventilation for children with chronic lung disease of infancy. *Curr Opin Pediatr*. <https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000757>
- Barazzone C, Horowitz S, Donati YR, et al (1998) Oxygen toxicity in mouse lung: pathways to cell death. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19:573–581. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.19.4.3173>
- Barker GF, Manzo ND, Cotich KL, et al (2006) DNA damage induced by hyperoxia: quantitation and correlation with lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35:277–288. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2005-0340OC>
- Bartling B, Demling N, Silber R-E, Simm A (2006) Proliferative stimulus of lung fibroblasts on lung cancer cells is impaired by the receptor for advanced glycation end-products. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34:83–91. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2005-0194OC>
- Bartling B, Hofmann H-S, Weigle B, et al (2005) Down-regulation of the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) supports non-small cell lung carcinoma. *Carcinogenesis* 26:293–301. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgh333>
- Basappa, Rangappa KS, Sugahara K (2014) Roles of glycosaminoglycans and glycanmimetics in tumor progression and metastasis. *Glycoconj J* 31:461–467. <https://doi.org/10.1007/s10719-014-9551-9>
- Basisty N, Dai D-F, Gagnidze A, et al (2016) Mitochondrial-targeted catalase is good for the old mouse proteome, but not for the young: “reverse” antagonistic pleiotropy? *Aging Cell* 15:634–645. <https://doi.org/10.1111/accel.12472>

- Basisty N, Meyer JG, Schilling B (2018) Protein Turnover in Aging and Longevity. *Proteomics* 18:e1700108. <https://doi.org/10.1002/pmic.201700108>
- Bassler D (2015) Inhalation or Instillation of Steroids for the Prevention of Bronchopulmonary Dysplasia. *Neonatology* 107:358–359. <https://doi.org/10.1159/000381132>
- Bavis RW, Young KM, Barry KJ, et al (2010) Chronic hyperoxia alters the early and late phases of the hypoxic ventilatory response in neonatal rats. *J Appl Physiol* 109:796–803. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00510.2010>
- Benipal B, Feinstein SI, Chatterjee S, et al (2015) Inhibition of the phospholipase A2 activity of peroxiredoxin 6 prevents lung damage with exposure to hyperoxia. *Redox Biol* 4:321–327. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.011>
- Benjamin JT, van der Meer R, Slaughter JC, et al (2018) Inverse Relationship between Soluble RAGE and Risk for Bronchopulmonary Dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 197:1083–1086. <https://doi.org/10.1164/rccm.201707-1445LE>
- Benz-Bohm G (2005) Thorax im Neugeborenen- und Säuglingsalter. In: *Kinderradiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp 140–42
- Berkelhamer SK, Kim GA, Radder JE, et al (2013) Developmental differences in hyperoxia-induced oxidative stress and cellular responses in the murine lung. *Free Radic Biol Med* 61:51–60. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.003>
- Bhandari A, Carroll C, Bhandari V (2016) BPD Following Preterm Birth: A Model for Chronic Lung Disease and a Substrate for ARDS in Childhood. *Front Pediatr* 4:60. <https://doi.org/10.3389/fped.2016.00060>
- Bhandari V, Choo-Wing R, Lee CG, et al (2006) Hyperoxia causes angiopoietin 2–mediated acute lung injury and necrotic cell death. *Nat Med* 12:1286–1293. <https://doi.org/10.1038/nm1494>
- Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, et al (2005) Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Mol Med* 83:876–886. <https://doi.org/10.1007/s00109-005-0688-7>
- Bierhaus A, Schiekofer S, Schwaninger M, et al (2001) Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *Diabetes* 50:2792–2808. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.12.2792>
- Bissonnette JM, Knopp SJ, Wright DM, MacMillan LB (2001) Respiratory pattern and hypoxic ventilatory response in mice functionally lacking alpha2A-adrenergic receptors. *Adv Exp Med Biol* 499:201–208. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1375-9_31
- Bland RD, Coalson JJ (eds) (2000) *Chronic lung disease in early infancy*. M. Dekker, New York
- Bokov A, Chaudhuri A, Richardson A (2004) The role of oxidative damage and stress in aging. *Mech Ageing Dev* 125:811–826. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2004.07.009>
- Bongarzone ER, Pasquini JM, Soto EF (1995) Oxidative damage to proteins and lipids of CNS myelin produced by in vitro generated reactive oxygen species. *J Neurosci Res* 41:213–221. <https://doi.org/10.1002/jnr.490410209>
- Boström H, Willetts K, Pekny M, et al (1996) PDGF-A signaling is a critical event in lung alveolar myofibroblast development and alveogenesis. *Cell* 85:863–873
- Bouch S, O'Reilly M, de Haan JB, et al (2017) Does lack of *glutathione peroxidase 1* gene expression exacerbate lung injury induced by neonatal hyperoxia in mice? *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 313:L115–L125. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00039.2016>
- Bouch S, O'Reilly M, Harding R, Sozo F (2015) Neonatal exposure to mild hyperoxia causes persistent increases in oxidative stress and immune cells in the lungs of mice without altering lung structure. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 309:L488–L496. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00359.2014>

- Bozyk PD, Bentley JK, Popova AP, et al (2012) Neonatal Periostin Knockout Mice Are Protected from Hyperoxia-Induced Alveolar Simplification. *PLoS ONE* 7:e31336. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031336>
- Branchfield K, Li R, Lungova V, et al (2016) A three-dimensional study of alveologenesis in mouse lung. *Developmental Biology* 409:429–441. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2015.11.017>
- Brandes RP, Weissmann N, Schröder K (2014) Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Free Radic Biol Med* 76:208–226. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.046>
- Britt RD, Velten M, Tipple TE, et al (2013) Cyclooxygenase-2 in newborn hyperoxic lung injury. *Free Radic Biol Med* 61:502–511. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.04.012>
- Bryant PJ, Huwe A (2000) LAP proteins: what's up with epithelia? *Nat Cell Biol* 2:E141-143. <https://doi.org/10.1038/35019616>
- Buczynski BW, Maduekwe ET, O'Reilly MA (2013) The role of hyperoxia in the pathogenesis of experimental BPD. *Semin Perinatol* 37:69–78. <https://doi.org/10.1053/j.semperi.2013.01.002>
- Burri PH (2006) Structural Aspects of Postnatal Lung Development – Alveolar Formation and Growth. *Neonatology* 89:313–322. <https://doi.org/10.1159/000092868>
- Chao C-M, El Agha E, Tiozzo C, et al (2015) A Breath of Fresh Air on the Mesenchyme: Impact of Impaired Mesenchymal Development on the Pathogenesis of Bronchopulmonary Dysplasia. *Front Med* 2: <https://doi.org/10.3389/fmed.2015.00027>
- Chavakis T, Bierhaus A, Al-Fakhri N, et al (2003) The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment. *J Exp Med* 198:1507–1515. <https://doi.org/10.1084/jem.20030800>
- Chen S, Su Y, Wang J (2013) ROS-mediated platelet generation: a microenvironment-dependent manner for megakaryocyte proliferation, differentiation, and maturation. *Cell Death Dis* 4:e722–e722. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.253>
- Chetty A, Cao G-J, Severgnini M, et al (2008) Role of matrix metalloprotease-9 in hyperoxic injury in developing lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295:L584-592. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00441.2007>
- Coalson JJ (2006) Pathology of bronchopulmonary dysplasia. *Semin Perinatol* 30:179–184. <https://doi.org/10.1053/j.semperi.2006.05.004>
- Cooney TP, Thurlbeck WM (1982) The radial alveolar count method of Emery and Mithal: a reappraisal 2–intrauterine and early postnatal lung growth. *Thorax* 37:580–583. <https://doi.org/10.1136/thx.37.8.580>
- Coughlan MT, Thorburn DR, Penfold SA, et al (2009) RAGE-induced cytosolic ROS promote mitochondrial superoxide generation in diabetes. *J Am Soc Nephrol* 20:742–752. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008050514>
- Cox AM, Gao Y, Perl A-KT, et al (2017) Cumulative Effects of Neonatal Hyperoxia on Murine Alveolar Structure and Function. *Pediatr Pulmonol* 52:616–624. <https://doi.org/10.1002/ppul.23654>
- Crump C, Sundquist K, Sundquist J, Winkleby MA (2011a) Gestational age at birth and mortality in young adulthood. *JAMA* 306:1233–1240. <https://doi.org/10.1001/jama.2011.1331>
- Crump C, Sundquist K, Winkleby MA, Sundquist J (2011b) Preterm birth and risk of epilepsy in Swedish adults. *Neurology* 77:1376–1382. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318231528f>
- Daffu G, del Pozo CH, O'Shea KM, et al (2013) Radical roles for RAGE in the pathogenesis of oxidative stress in cardiovascular diseases and beyond. *Int J Mol Sci* 14:19891–19910. <https://doi.org/10.3390/ijms141019891>

- Dai D-F, Karunadharma PP, Chiao YA, et al (2014) Altered proteome turnover and remodeling by short-term caloric restriction or rapamycin rejuvenate the aging heart. *Aging Cell* 13:529–539. <https://doi.org/10.1111/accel.12203>
- Dattilo BM, Fritz G, Leclerc E, et al (2007) The extracellular region of the receptor for advanced glycation end products is composed of two independent structural units. *Biochemistry* 46:6957–6970. <https://doi.org/10.1021/bi7003735>
- de Jong F, Monuteaux MC, van Elburg RM, et al (2012) Systematic Review and Meta-Analysis of Preterm Birth and Later Systolic Blood Pressure. *Hypertension* 59:226–234. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.181784>
- Delporte C, Bryla A, Perret J (2016) Aquaporins in Salivary Glands: From Basic Research to Clinical Applications. *IJMS* 17:166. <https://doi.org/10.3390/ijms17020166>
- Demling N, Ehrhardt C, Kasper M, et al (2006) Promotion of cell adherence and spreading: a novel function of RAGE, the highly selective differentiation marker of human alveolar epithelial type I cells. *Cell Tissue Res* 323:475–488. <https://doi.org/10.1007/s00441-005-0069-0>
- Dumpa V, Nielsen L, Wang H, Kumar VHS (2019) Caffeine is associated with improved alveolarization and angiogenesis in male mice following hyperoxia induced lung injury. *BMC Pulm Med* 19:138. <https://doi.org/10.1186/s12890-019-0903-x>
- Dylag AM, Mayer CA, Raffay TM, et al (2017) Long-term effects of recurrent intermittent hypoxia and hyperoxia on respiratory system mechanics in neonatal mice. *Pediatr Res* 81:565–571. <https://doi.org/10.1038/pr.2016.240>
- Eliades A, Matsuura S, Ravid K (2012) Oxidases and reactive oxygen species during hematopoiesis: A focus on megakaryocytes. *J Cell Physiol* 227:3355–3362. <https://doi.org/10.1002/jcp.24071>
- Endesfelder S, Strauß E, Scheuer T, et al (2019) Antioxidative effects of caffeine in a hyperoxia-based rat model of bronchopulmonary dysplasia. *Respir Res* 20:88. <https://doi.org/10.1186/s12931-019-1063-5>
- Escolar JD, Tejero C, Escolar MA, et al (1997) Methodological contributions for the morphometric study of the lung: approximation to the ideal sample size and quantification of collagen fiber. *Anat Rec* 247:501–511. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199704\)247:4<501::AID-AR9>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199704)247:4<501::AID-AR9>3.0.CO;2-T)
- Fanburg BL, Massaro DJ, Gerutti PA, et al (1992) Regulation of gene expression by O₂ tension. *Am J Physiol* 262:L235–241. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1992.262.2.L235>
- Faraci FM, Didion SP (2004) Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:1367–1373. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000133604.20182.cf>
- Fechtner L, Ali ME, Sattar A, et al (2015) Fentanyl effects on breath generation in C57BL/6J and A/J mouse strains. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 215:20–29. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2015.04.011>
- Fehrenbach H, Kasper M, Tschernig T, et al (1998) Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) exhibits highly differential cellular and subcellular localisation in rat and human lung. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 44:1147–1157
- Fiaturi N, Russo JW, Nielsen HC, Castellot JJ (2018) CCN5 in alveolar epithelial proliferation and differentiation during neonatal lung oxygen injury. *J Cell Commun Signal* 12:217–229. <https://doi.org/10.1007/s12079-017-0443-1>
- Flodby P, Li C, Liu Y, et al (2017) Cell-specific expression of aquaporin-5 (Aqp5) in alveolar epithelium is directed by GATA6/Sp1 via histone acetylation. *Sci Rep* 7:3473. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03152-7>
- Frank L, Sosenko IR (1991) Failure of premature rabbits to increase antioxidant enzymes during hyperoxic exposure: increased susceptibility to pulmonary oxygen toxicity compared with term rabbits. *Pediatr Res* 29:292–296. <https://doi.org/10.1203/00006450-199103000-00014>

- Freeman BA, Crapo JD (1981) Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria. *J Biol Chem* 256:10986–10992
- Fritz G (2011) RAGE: a single receptor fits multiple ligands. *Trends Biochem Sci* 36:625–632. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.08.008>
- Fritzell JA, Mao Q, Gundavarapu S, et al (2009) Fate and Effects of Adult Bone Marrow Cells in Lungs of Normoxic and Hyperoxic Newborn Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 40:575–587. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0176OC>
- Fu J, Xue X, Pan L, Xu W (2008) [Expression of HoxB5 mRNA and their effect on lung development in premature rats with hyperoxia-induced chronic lung disease]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 46:540–543
- Ghanta S, Tropea Leeman K, Christou H (2013) An update on pharmacologic approaches to bronchopulmonary dysplasia. *Seminars in Perinatology* 37:115–123. <https://doi.org/10.1053/j.semperi.2013.01.008>
- Gough A, Linden M, Spence D, et al (2014) Impaired lung function and health status in adult survivors of bronchopulmonary dysplasia. *Eur Respir J* 43:808–816. <https://doi.org/10.1183/09031936.00039513>
- Greenough A (2008) Emerging drugs for the prevention of bronchopulmonary dysplasia. *Expert Opin Emerg Drugs* 13:537–546. <https://doi.org/10.1517/14728214.13.3.537>
- Han RN, Buch S, Tseu I, et al (1996) Changes in structure, mechanics, and insulin-like growth factor-related gene expression in the lungs of newborn rats exposed to air or 60% oxygen. *Pediatr Res* 39:921–929. <https://doi.org/10.1203/00006450-199606000-00001>
- Han T, Chi M, Wang Y, et al (2017a) Therapeutic effects of fibroblast growth factor-10 on hyperoxia-induced bronchopulmonary dysplasia in neonatal mice. *Am J Transl Res* 9:3528–3540
- Han W, Li X, Zhang H, et al (2017b) Recombinant human elafin promotes alveologenesis in newborn mice exposed to chronic hyperoxia. *Int J Biochem Cell Biol* 92:173–182. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.08.004>
- Hatfield SM, Kjaergaard J, Lukashev D, et al (2015) Immunological mechanisms of the antitumor effects of supplemental oxygenation. *Sci Transl Med* 7:277ra30. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa1260>
- Herting E (2010) Bronchopulmonary dysplasia: pathogenesis, risk factors and early prevention strategies. *Chin Med J* 123:2955–2957
- Hilgendorff A, O'Reilly MA (2015) Bronchopulmonary Dysplasia Early Changes Leading to Long-Term Consequences. *Front Med* 2:. <https://doi.org/10.3389/fmed.2015.00002>
- Hofmann MA, Drury S, Fu C, et al (1999) RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 97:889–901
- Houghton AM, Quintero PA, Perkins DL, et al (2006) Elastin fragments drive disease progression in a murine model of emphysema. *J Clin Invest* 116:753–759. <https://doi.org/10.1172/JCI25617>
- Hsia CCW, Hyde DM, Ochs M, Weibel ER (2010) An Official Research Policy Statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: Standards for Quantitative Assessment of Lung Structure. *Am J Respir Crit Care Med* 181:394–418. <https://doi.org/10.1164/rccm.200809-1522ST>
- Hudson BI, Carter AM, Harja E, et al (2008) Identification, classification, and expression of RAGE gene splice variants. *FASEB J* 22:1572–1580. <https://doi.org/10.1096/fj.07-9909com>
- Jabaudon M, Blondonnet R, Roszyk L, et al (2015) Soluble Forms and Ligands of the Receptor for Advanced Glycation End-Products in Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome: An Observational Prospective Study. *PLoS ONE* 10:e0135857. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135857>

- Jackson SP, Bartek J (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461:1071–1078. <https://doi.org/10.1038/nature08467>
- Jagarapu J, Kelchtermans J, Rong M, et al (2015) Efficacy of Leukadherin-1 in the Prevention of Hyperoxia-Induced Lung Injury in Neonatal Rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 53:793–801. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2014-0422OC>
- James ML, Ross AC, Nicola T, et al (2013) VARA attenuates hyperoxia-induced impaired alveolar development and lung function in newborn mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 304:L803–812. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00257.2012>
- Janeway C, Beutner L, Melnick M, et al (eds) (2002) *Immunologie*, 5. Aufl. Spektrum, Akad. Verl, Heidelberg
- Jiang W, Maturu P, Liang YW, et al (2018) Hyperoxia-mediated transcriptional activation of cytochrome P4501A1 (CYP1A1) and decreased susceptibility to oxygen-mediated lung injury in newborn mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 495:408–413. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.10.166>
- Jones CV, Alikhan MA, O'Reilly M, et al (2014) The effect of CSF-1 administration on lung maturation in a mouse model of neonatal hyperoxia exposure. *Respir Res* 15:110. <https://doi.org/10.1186/s12931-014-0110-5>
- Joshi S, Kotecha S (2007) Lung growth and development. *Early Human Development* 83:789–794. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2007.09.007>
- Junt T, Schulze H, Chen Z, et al (2007) Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science* 317:1767–1770. <https://doi.org/10.1126/science.1146304>
- Kallet RH, Matthay MA (2013) Hyperoxic acute lung injury. *Respir Care* 58:123–141. <https://doi.org/10.4187/respcare.01963>
- Karunadharma PP, Basisty N, Dai D-F, et al (2015) Subacute calorie restriction and rapamycin discordantly alter mouse liver proteome homeostasis and reverse aging effects. *Aging Cell* 14:547–557. <https://doi.org/10.1111/accel.12317>
- Kaushansky K (2008) Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Blood* 111:981–986. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-05-088500>
- Kemmler J, Bindl R, McCook O, et al (2015) Exposure to 100% Oxygen Abolishes the Impairment of Fracture Healing after Thoracic Trauma. *PLoS ONE* 10:e0131194. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131194>
- Kitamura Y, Hashimoto S, Mizuta N, et al (2001) Fas/FasL-dependent apoptosis of alveolar cells after lipopolysaccharide-induced lung injury in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 163:762–769. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.163.3.2003065>
- Koyama H, Shoji T, Yokoyama H, et al (2005) Plasma level of endogenous secretory RAGE is associated with components of the metabolic syndrome and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:2587–2593. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000190660.32863.cd>
- Krinke G, Weber K (2012) Histology. In: Hedrich H (ed) *The Laboratory Mouse*. Elsevier, New York, p 183
- Kumar VHS, Lakshminrusimha S, Kishkurno S, et al (2016) Neonatal hyperoxia increases airway reactivity and inflammation in adult mice. *Pediatr Pulmonol* 51:1131–1141. <https://doi.org/10.1002/ppul.23430>
- Kumar VHS, Wang H, Kishkurno S, et al (2018) Long-Term Effects of Neonatal Hyperoxia in Adult Mice. *Anat Rec (Hoboken)* 301:717–726. <https://doi.org/10.1002/ar.23766>
- Kumarasamy A, Schmitt I, Nave AH, et al (2009) Lysyl oxidase activity is dysregulated during impaired alveolarization of mouse and human lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 180:1239–1252. <https://doi.org/10.1164/rccm.200902-0215OC>
- Laluppa JA, Papoutsakis ET, Miller WM (1998) Oxygen tension alters the effects of cytokines on the megakaryocyte, erythrocyte, and granulocyte lineages. *Exp Hematol* 26:835–843

- Lal CV, Olave N, Travers C, et al (2018) Exosomal microRNA predicts and protects against severe bronchopulmonary dysplasia in extremely premature infants. *JCI Insight* 3:. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.93994>
- Lee C-C, Wang C-N, Lee Y-L, et al (2015) High Mobility Group Box 1 Induced Human Lung Myofibroblasts Differentiation and Enhanced Migration by Activation of MMP-9. *PLoS ONE* 10:e0116393. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116393>
- Lee KJ, Berkelhamer SK, Kim GA, et al (2013) Disrupted Pulmonary Artery cGMP Signaling in Mice with Hyperoxia-Induced Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 130913124737004. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0118OC>
- Lefrançois E, Ortiz-Muñoz G, Caudrillier A, et al (2017) The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature* 544:105–109. <https://doi.org/10.1038/nature21706>
- Li L-F, Lee C-S, Liu Y-Y, et al (2015a) Activation of Src-dependent Smad3 signaling mediates the neutrophilic inflammation and oxidative stress in hyperoxia-augmented ventilator-induced lung injury. *Respir Res* 16:112. <https://doi.org/10.1186/s12931-015-0275-6>
- Li Y, Wu R, Tian Y, et al (2015b) RAGE/NF- κ B signaling mediates lipopolysaccharide induced acute lung injury in neonate rat model. *Int J Clin Exp Med* 8:13371–13376
- Lin H-J, Wu C-P, Peng C-K, et al (2015) With-No-Lysine Kinase 4 Mediates Alveolar Fluid Regulation in Hyperoxia-Induced Lung Injury. *Crit Care Med* 43:e412-419. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000001144>
- Lindahl P, Karlsson L, Hellström M, et al (1997) Alveogenesis failure in PDGF-A-deficient mice is coupled to lack of distal spreading of alveolar smooth muscle cell progenitors during lung development. *Development* 124:3943–3953
- Lingappan K, Jiang W, Wang L, et al (2015) Sex-specific differences in hyperoxic lung injury in mice: Role of cytochrome P450 (CYP)1A. *Toxicology* 331:14–23. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2015.01.019>
- Lingappan K, Srinivasan C, Jiang W, et al (2014) Analysis of the transcriptome in hyperoxic lung injury and sex-specific alterations in gene expression. *PLoS ONE* 9:e101581. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101581>
- Liu D, Wang Y, Li L, et al (2019) Celecoxib Protects Hyperoxia-Induced Lung Injury via NF- κ B and AQP1. *Front Pediatr* 7:228. <https://doi.org/10.3389/fped.2019.00228>
- Lizotte P-P, Hanford LE, Enghild JJ, et al (2007) Developmental expression of the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) and its response to hyperoxia in the neonatal rat lung. *BMC Dev Biol* 7:15. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-7-15>
- Londhe VA, Nguyen HT, Jeng J-M, et al (2008) NF- κ B induces lung maturation during mouse lung morphogenesis. *Dev Dyn* 237:328–338. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21413>
- Maquart F-X, Pasco S, Ramont L, et al (2004) An introduction to matrikines: extracellular matrix-derived peptides which regulate cell activity. Implication in tumor invasion. *Crit Rev Oncol Hematol* 49:199–202. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2003.06.007>
- Mariani TJ, Dunsmore SE, Li Q, et al (1998) Regulation of lung fibroblast tropoelastin expression by alveolar epithelial cells. *Am J Physiol* 274:L47-57. <https://doi.org/10.1152/ajp-lung.1998.274.1.L47>
- Martin CR, Zaman MM, Gilkey C, et al (2014) Resolvin D1 and Lipoxin A4 Improve Alveolarization and Normalize Septal Wall Thickness in a Neonatal Murine Model of Hyperoxia-Induced Lung Injury. *PLoS ONE* 9:e98773. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098773>
- Maturu P, Wei-Liang Y, Jiang W, et al (2017) Newborn Mice Lacking the Gene for Cyp1a1 Are More Susceptible to Oxygen-Mediated Lung Injury, and Are Rescued by Postnatal β -Naphthoflavone Administration: Implications for Bronchopulmonary Dysplasia in Premature Infants. *Toxicol Sci* 157:260–271. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx036>

- Matute-Bello G, Downey G, Moore BB, et al (2011) An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. *Am J Respir Cell Mol Biol* 44:725–738. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0210ST>
- McGrath-Morrow SA, Lauer T, Collaco JM, et al (2011) Neonatal hyperoxia contributes additively to cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease changes in adult mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45:610–616. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2010-0259OC>
- McInnes (2014) The respiratory system. In: *A Practical Guide to the Histology of the Mouse*. Wiley Blackwell, Oxford, pp 190–91
- McKenna S, Michaelis KA, Agboke F, et al (2014) Sustained hyperoxia-induced NF- κ B activation improves survival and preserves lung development in neonatal mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 306:L1078-1089. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00001.2014>
- Méndez-Abad P, Zafra-Rodríguez P, Lubián-López S, Benavente-Fernández I (2019) NTproBNP is a useful early biomarker of bronchopulmonary dysplasia in very low birth weight infants. *Eur J Pediatr* 178:755–761. <https://doi.org/10.1007/s00431-019-03347-2>
- Menon RT, Shrestha AK, Shivanna B (2017) Hyperoxia Exposure Disrupts Adrenomedullin Signaling in Newborn Mice: Implications for Lung Development in Premature Infants. *Biochem Biophys Res Commun* 487:666–671. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.04.112>
- Merrill JD, Ballard RA, Cnaan A, et al (2004) Dysfunction of pulmonary surfactant in chronically ventilated premature infants. *Pediatr Res* 56:918–926. <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000145565.45490.D9>
- Mills DR, Mao Q, Chu S, et al (2017) Effects of human umbilical cord blood mononuclear cells on respiratory system mechanics in a murine model of neonatal lung injury. *Experimental Lung Research* 43:66–81. <https://doi.org/10.1080/01902148.2017.1300713>
- Miniati M, Monti S, Basta G, et al (2011) Soluble receptor for advanced glycation end products in COPD: relationship with emphysema and chronic cor pulmonale: a case-control study. *Respir Res* 12:37. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-12-37>
- Miranda LF, Rodrigues CO, Ramachandran S, et al (2013) Stem cell factor improves lung recovery in rats following neonatal hyperoxia-induced lung injury. *Pediatr Res* 74:682–688. <https://doi.org/10.1038/pr.2013.165>
- Mizushima Y, Shirasuna K, Usui F, et al (2015) NLRP3 protein deficiency exacerbates hyperoxia-induced lethality through Stat3 protein signaling independent of interleukin-1 β . *J Biol Chem* 290:5065–5077. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.603217>
- Morton RL, Das KC, Guo XL, et al (1999) Effect of oxygen on lung superoxide dismutase activities in premature baboons with bronchopulmonary dysplasia. *Am J Physiol* 276:L64-74. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1999.276.1.L64>
- Mostafa SS, Miller WM, Papoutsakis ET (2000) Oxygen tension influences the differentiation, maturation and apoptosis of human megakaryocytes. *Br J Haematol* 111:879–889
- Muhammad S, Barakat W, Stoyanov S, et al (2008) The HMGB1 Receptor RAGE Mediates Ischemic Brain Damage. *Journal of Neuroscience* 28:12023–12031. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2435-08.2008>
- Mund SI, Stampanoni M, Schittny JC (2008) Developmental alveolarization of the mouse lung. *Dev Dyn* 237:2108–2116. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21633>
- Nagato A, Silva FL, Silva AR, et al (2009) Hyperoxia-induced lung injury is dose dependent in Wistar rats. *Exp Lung Res* 35:713–728. <https://doi.org/10.3109/01902140902853184>
- Nagato AC, Bezerra FS, Lanzetti M, et al (2012) Time course of inflammation, oxidative stress and tissue damage induced by hyperoxia in mouse lungs. *Int J Exp Pathol* 93:269–278. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2012.00823.x>
- Namba F, Ogawa R, Ito M, et al (2016) Sex-related differences in long-term pulmonary outcomes of neonatal hyperoxia in mice. *Exp Lung Res* 42:57–65. <https://doi.org/10.3109/01902148.2016.1141264>

- Natarajan V, Ha AW, Dong Y, et al (2017) Expression profiling of genes regulated by sphingosine kinase1 signaling in a murine model of hyperoxia induced neonatal bronchopulmonary dysplasia. *BMC Genomics* 18:. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4048-0>
- Neeper M, Schmidt AM, Brett J, et al (1992) Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem* 267:14998–15004
- Nielsen S, King LS, Christensen BM, Agre P (1997) Aquaporins in complex tissues. II. Subcellular distribution in respiratory and glandular tissues of rat. *Am J Physiol* 273:C1549-1561. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1997.273.5.C1549>
- Nogee LM (2017) Interstitial lung disease in newborns. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* 22:227–233. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2017.03.003>
- Nold MF, Mangan NE, Rudloff I, et al (2013) Interleukin-1 receptor antagonist prevents murine bronchopulmonary dysplasia induced by perinatal inflammation and hyperoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:14384–14389. <https://doi.org/10.1073/pnas.1306859110>
- Northway WH, Rosan RC, Porter DY (1967) Pulmonary disease following respirator therapy of hyaline-membrane disease. Bronchopulmonary dysplasia. *N Engl J Med* 276:357–368. <https://doi.org/10.1056/NEJM196702162760701>
- Ohlmeier S, Mazur W, Salmenkivi K, et al (2010) Proteomic studies on receptor for advanced glycation end product variants in idiopathic pulmonary fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease. *Proteomics Clin Appl* 4:97–105. <https://doi.org/10.1002/prca.200900128>
- Olave N, Lal CV, Halloran B, et al (2018) Iloprost attenuates hyperoxia-mediated impairment of lung development in newborn mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 315:L535–L544. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00125.2017>
- Omori K, Ohira T, Uchida Y, et al (2008) Priming of neutrophil oxidative burst in diabetes requires preassembly of the NADPH oxidase. *J Leukoc Biol* 84:292–301. <https://doi.org/10.1189/jlb.1207832>
- O'Reilly M, Harding R, Sozo F (2014) Altered Small Airways in Aged Mice following Neonatal Exposure to Hyperoxic Gas. *Neonatology* 105:39–45. <https://doi.org/10.1159/000355641>
- Ota C, Ishizawa K, Yamada M, et al (2016) Receptor for advanced glycation end products expressed on alveolar epithelial cells is the main target for hyperoxia-induced lung injury. *Respir Investig* 54:98–108. <https://doi.org/10.1016/j.resinv.2015.08.009>
- Palmer LA, May WJ, deRonde K, et al (2013) Ventilatory responses during and following exposure to a hypoxic challenge in conscious mice deficient or null in S-nitrosoglutathione reductase. *Respir Physiol Neurobiol* 185:571–581. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2012.11.009>
- Papachroni KK, Piperi C, Levidou G, et al (2010) Lysyl oxidase interacts with AGE signalling to modulate collagen synthesis in polycystic ovarian tissue. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 14:2460–2469. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00841.x>
- Park L, Raman KG, Lee KJ, et al (1998) Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nat Med* 4:1025–1031. <https://doi.org/10.1038/2012>
- Partridge EA, Davey MG, Hornick MA, et al (2017) An extra-uterine system to physiologically support the extreme premature lamb. *Nat Commun* 8:15112. <https://doi.org/10.1038/ncomms15112>
- Pietrofesa RA, Solomides CC, Christofidou-Solomidou M (2014) Flaxseed Mitigates Acute Oxidative Lung Damage in a Mouse Model of Repeated Radiation and Hyperoxia Exposure Associated with Space Exploration. *J Pulm Respir Med* 4:. <https://doi.org/10.4172/2161-105X.1000215>
- Poggi C, Dani C (2014) Antioxidant Strategies and Respiratory Disease of the Preterm Newborn: An Update. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014:1–10. <https://doi.org/10.1155/2014/721043>
- Poggi C, Giusti B, Vestri A, et al (2012) Genetic polymorphisms of antioxidant enzymes in preterm infants. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 25:123–126. <https://doi.org/10.3109/14767058.2012.714976>

- Popova AP (2013) Mechanisms of bronchopulmonary dysplasia. *J Cell Commun Signal* 7:119–127. <https://doi.org/10.1007/s12079-013-0190-x>
- Popova AP, Bentley JK, Cui TX, et al (2014) Reduced platelet-derived growth factor receptor expression is a primary feature of human bronchopulmonary dysplasia. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 307:L231–L239. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00342.2013>
- Queisser MA, Kouri FM, Königshoff M, et al (2008) Loss of RAGE in pulmonary fibrosis: molecular relations to functional changes in pulmonary cell types. *Am J Respir Cell Mol Biol* 39:337–345. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2007-0244OC>
- Raffay TM, Dylag AM, Di Fiore JM, et al (2016) S-Nitrosoglutathione Attenuates Airway Hyper-responsiveness in Murine Bronchopulmonary Dysplasia. *Mol Pharmacol* 90:418–426. <https://doi.org/10.1124/mol.116.104125>
- Raffay TM, Locy ML, Hill CL, et al (2013) Neonatal Hyperoxic Exposure Persistently Alters Lung Secretoglobins and Annexin A1. *BioMed Research International* 2013:1–10. <https://doi.org/10.1155/2013/408485>
- Ramachandran S, Sugihara C, Drummond S, et al (2015) Bone Marrow-Derived c-kit+ Cells Attenuate Neonatal Hyperoxia-Induced Lung Injury. *Cell Transplant* 24:85–95. <https://doi.org/10.3727/096368913X667736>
- Ramani M, Bradley WE, Dell'Italia LJ, Ambalavanan N (2015) Early exposure to hyperoxia or hypoxia adversely impacts cardiopulmonary development. *Am J Respir Cell Mol Biol* 52:594–602. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0491OC>
- Ratner V, Slinko S, Utkina-Sosunova I, et al (2009) Hypoxic stress exacerbates hyperoxia-induced lung injury in a neonatal mouse model of bronchopulmonary dysplasia. *Neonatology* 95:299–305. <https://doi.org/10.1159/000178798>
- Raucci A, Cugusi S, Antonelli A, et al (2008) A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *FASEB J* 22:3716–3727. <https://doi.org/10.1096/fj.08-109033>
- Reddy NM, Potteti HR, Vegiraju S, et al (2015) PI3K-AKT Signaling via Nrf2 Protects against Hyperoxia-Induced Acute Lung Injury, but Promotes Inflammation Post-Injury Independent of Nrf2 in Mice. *PLoS ONE* 10:e0129676. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129676>
- Regal JF, Lawrence BP, Johnson AC, et al (2014) Neonatal oxygen exposure alters airway hyper-responsiveness but not the response to allergen challenge in adult mice. *Pediatr Allergy Immunol* 25:180–186. <https://doi.org/10.1111/pai.12206>
- Reynolds PR, Kasteler SD, Cosio MG, et al (2008) RAGE: developmental expression and positive feedback regulation by Egr-1 during cigarette smoke exposure in pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294:L1094–1101. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00318.2007>
- Reynolds PR, Schmitt RE, Kasteler SD, et al (2010) Receptors for advanced glycation end-products targeting protect against hyperoxia-induced lung injury in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 42:545–551. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0265OC>
- Reynolds PR, Stogsdill JA, Stogsdill MP, Heimann NB (2011) Up-regulation of receptors for advanced glycation end-products by alveolar epithelium influences cytodifferentiation and causes severe lung hypoplasia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45:1195–1202. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2011-0170OC>
- Ristow M (2014) Unraveling the truth about antioxidants: mitohormesis explains ROS-induced health benefits. *Nat Med* 20:709–711. <https://doi.org/10.1038/nm.3624>
- Robinson AB, Johnson KD, Bennion BG, Reynolds PR (2012) RAGE signaling by alveolar macrophages influences tobacco smoke-induced inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 302:L1192–1199. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00099.2012>

- Rogers LK, Valentine CJ, Pennell M, et al (2011) Maternal docosahexaenoic acid supplementation decreases lung inflammation in hyperoxia-exposed newborn mice. *J Nutr* 141:214–222. <https://doi.org/10.3945/jn.110.129882>
- Roth-Kleiner M, Post M (2003) Genetic Control of Lung Development. *Neonatology* 84:83–88. <https://doi.org/10.1159/000071009>
- Royce SG, Nold MF, Bui C, et al (2016) Airway Remodeling and Hyperreactivity in a Model of Bronchopulmonary Dysplasia and Their Modulation by IL-1 Receptor Antagonist. *Am J Respir Cell Mol Biol* 55:858–868. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2016-0031OC>
- Rozycki HJ, Bradley J, Karam S (2017) sRAGE Is Elevated in the Lungs of Premature Infants Receiving Mechanical Ventilation. *Am J Perinatol* 34:911–917. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1601311>
- Sammour I, Somashekar S, Huang J, et al (2016) The Effect of Gender on Mesenchymal Stem Cell (MSC) Efficacy in Neonatal Hyperoxia-Induced Lung Injury. *PLoS One* 11:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164269>
- Sauler M, Zhang Y, Min J-N, et al (2015) Endothelial CD74 mediates macrophage migration inhibitory factor protection in hyperoxic lung injury. *FASEB J* 29:1940–1949. <https://doi.org/10.1096/fj.14-260299>
- Schittny JC, Mund SI, Stampanoni M (2008) Evidence and structural mechanism for late lung alveolarization. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 294:L246–L254. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00296.2007>
- Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M, et al (1992) Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J Biol Chem* 267:14987–14997
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9:671–675
- Sessa L, Gatti E, Zeni F, et al (2014) The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) is only present in mammals, and belongs to a family of cell adhesion molecules (CAMs). *PLoS ONE* 9:e86903. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086903>
- Shadel GS, Horvath TL (2015) Mitochondrial ROS Signaling in Organismal Homeostasis. *Cell* 163:560–569. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.001>
- Shafa M, Ionescu LI, Vadivel A, et al (2018) Human induced pluripotent stem cell-derived lung progenitor and alveolar epithelial cells attenuate hyperoxia-induced lung injury. *Cytherapy* 20:108–125. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.09.003>
- Shapiro SD, Endicott SK, Province MA, et al (1991) Marked longevity of human lung parenchymal elastic fibers deduced from prevalence of D-aspartate and nuclear weapons-related radiocarbon. *J Clin Invest* 87:1828–1834. <https://doi.org/10.1172/JCI115204>
- Shirasawa M, Fujiwara N, Hirabayashi S, et al (2004) Receptor for advanced glycation end-products is a marker of type I lung alveolar cells. *Genes Cells* 9:165–174
- Shivanna B, Zhang S, Patel A, et al (2015) Omeprazole Attenuates Pulmonary Aryl Hydrocarbon Receptor Activation and Potentiates Hyperoxia-Induced Developmental Lung Injury in Newborn Mice. *Toxicol Sci* 148:276–287. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv183>
- Siddique SM, Kubouchi K, Shinmichi Y, et al (2019) PKN1 kinase-negative knock-in mice develop splenomegaly and leukopenia at advanced age without obvious autoimmune-like phenotypes. *Sci Rep* 9:13977. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50419-2>
- Siddiqui T, Zia MK, Ali SS, et al (2016) Reactive oxygen species and anti-proteinases. *Archives of Physiology and Biochemistry* 122:1–7. <https://doi.org/10.3109/13813455.2015.1115525>
- Silva DMG, Nardiello C, Pozarska A, Morty RE (2015) Recent advances in the mechanisms of lung alveolarization and the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 309:L1239-1272. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00268.2015>

- Simonato M, Baritussio A, Ori C, et al (2011) Disaturated-phosphatidylcholine and surfactant protein-B turnover in human acute lung injury and in control patients. *Respir Res* 12:36. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-12-36>
- Slater DN, Trowbridge EA, Martin JF (1983) The megakaryocyte in thrombocytopenia: a microscopic study which supports the theory that platelets are produced in the pulmonary circulation. *Thromb Res* 31:163–176
- Smith CV, Hansen TN, Martin NE, et al (1993) Oxidant stress responses in premature infants during exposure to hyperoxia. *Pediatr Res* 34:360–365. <https://doi.org/10.1203/00006450-199309000-00024>
- Smith LJ, McKay KO, van Asperen PP, et al (2010) Normal Development of the Lung and Premature Birth. *Paediatric Respiratory Reviews* 11:135–142. <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2009.12.006>
- Smith RE, Strieter RM, Zhang K, et al (1995) A role for C-C chemokines in fibrotic lung disease. *J Leukoc Biol* 57:782–787. <https://doi.org/10.1002/jlb.57.5.782>
- Song Y, Fukuda N, Bai C, et al (2000) Role of aquaporins in alveolar fluid clearance in neonatal and adult lung, and in oedema formation following acute lung injury: studies in transgenic aquaporin null mice. *J Physiol (Lond)* 525 Pt 3:771–779. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00771.x>
- Sozo F, Horvat JC, Essilfie A-T, et al (2015) Altered lung function at mid-adulthood in mice following neonatal exposure to hyperoxia. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 218:21–27. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2015.07.004>
- Stern D, Yan SD, Yan SF, Schmidt AM (2002) Receptor for advanced glycation endproducts: a multiligand receptor magnifying cell stress in diverse pathologic settings. *Adv Drug Deliv Rev* 54:1615–1625. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(02\)00160-6](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(02)00160-6)
- Stevenson DK, Wright LL, Lemons JA, et al (1998) Very low birth weight outcomes of the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network, January 1993 through December 1994. *Am J Obstet Gynecol* 179:1632–1639
- Stogsdill JA, Stogsdill MP, Porter JL, et al (2012) Embryonic overexpression of receptors for advanced glycation end-products by alveolar epithelium induces an imbalance between proliferation and apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 47:60–66. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2011-0385OC>
- Stogsdill MP, Stogsdill JA, Bodine BG, et al (2013) Conditional overexpression of receptors for advanced glycation end-products in the adult murine lung causes airspace enlargement and induces inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 49:128–134. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0013OC>
- Strüder HK, Hollmann W, Weicker H, et al (1999) Blood oxygen partial pressure affects plasma prolactin concentration in humans. *Acta Physiol Scand* 165:265–269. <https://doi.org/10.1046/j.1365-201x.1999.00500.x>
- Su X, Lee JW, Matthay ZA, et al (2007) Activation of the $\alpha 7$ nAChR reduces acid-induced acute lung injury in mice and rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 37:186–192. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2006-0240OC>
- Sukkar MB, Postma DS (2013) Receptor for advanced glycation end products and soluble receptor for advanced glycation end products: a balancing act in chronic obstructive pulmonary disease? *Am J Respir Crit Care Med* 188:893–894. <https://doi.org/10.1164/rccm.201308-1489ED>
- Sun Y, Chen C, Di T, et al (2019) Human β -Defensin-2 Improves Hyperoxia-Induced Lung Structural and Functional Injury in Neonatal Rats. *Med Sci Monit* 25:6074–6084. <https://doi.org/10.12659/MSM.915814>
- Sureshbabu A, Syed MA, Boddupalli CS, et al (2015) Conditional overexpression of TGF β 1 promotes pulmonary inflammation, apoptosis and mortality via TGF β 2 in the developing mouse lung. *Respir Res* 16:4. <https://doi.org/10.1186/s12931-014-0162-6>

- Sutsko RP, Young KC, Ribeiro A, et al (2013) Long-term reparative effects of mesenchymal stem cell therapy following neonatal hyperoxia-induced lung injury. *Pediatr Res* 73:46–53. <https://doi.org/10.1038/pr.2012.152>
- Swarup G, Vaibhava V, Nagabhush A (2013) Functional Defects Caused by Glaucoma – Associated Mutations in Optineurin. In: Rumelt S (ed) *Glaucoma - Basic and Clinical Aspects*. InTech
- Syed M, Das P, Pawar A, et al (2017) Hyperoxia causes miR-34a-mediated injury via angiotensin-1 in neonatal lungs. *Nat Commun* 8:1173. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01349-y>
- Takeda K, Okamoto M, de Langhe S, et al (2009) Peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist treatment increases septation and angiogenesis and decreases airway hyperresponsiveness in a model of experimental neonatal chronic lung disease. *Anat Rec (Hoboken)* 292:1045–1061. <https://doi.org/10.1002/ar.20921>
- The STOP-ROP Multicenter Study Group (2000) Supplemental Therapeutic Oxygen for Prethreshold Retinopathy of Prematurity (STOP-ROP), A Randomized, Controlled Trial. I: Primary Outcomes. *PEDIATRICS* 105:295–310. <https://doi.org/10.1542/peds.105.2.295>
- Thébaud B, Abman SH (2007) Bronchopulmonary dysplasia: where have all the vessels gone? Roles of angiogenic growth factors in chronic lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 175:978–985. <https://doi.org/10.1164/rccm.200611-1660PP>
- Tipple TE, Welty SE, Nelin LD, et al (2009) Alterations of the Thioredoxin System by Hyperoxia: Implications for Alveolar Development. *Am J Respir Cell Mol Biol* 41:612–619. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0224OC>
- Tiwari KK, Chu C, Couroucli X, et al (2014) Differential concentration-specific effects of caffeine on cell viability, oxidative stress, and cell cycle in pulmonary oxygen toxicity in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 450:1345–1350. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.06.132>
- Tortorolo L, Vento G, Matassa PG, et al (2002) Early changes of pulmonary mechanics to predict the severity of bronchopulmonary dysplasia in ventilated preterm infants. *J Matern Fetal Neonatal Med* 12:332–337. <https://doi.org/10.1080/jmf.12.5.332.337>
- Tsukiji N, Inoue O, Morimoto M, et al (2018) Platelets play an essential role in murine lung development through Clec-2/podoplanin interaction. *Blood* 132:1167–1179. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-12-823369>
- Tung Y-T, Tsai T-C, Kuo Y-H, et al (2014) Comparison of solid-state-cultured and wood-cultured *Antrodia camphorata* in anti-inflammatory effects using NF- κ B/luciferase inducible transgenic mice. *Phytomedicine* 21:1708–1716. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2014.08.011>
- Uchida T, Shirasawa M, Ware LB, et al (2006) Receptor for advanced glycation end-products is a marker of type I cell injury in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 173:1008–1015. <https://doi.org/10.1164/rccm.200509-1477OC>
- Uhlir C, Silva PL, Ornellas D, et al (2014) The effects of salbutamol on epithelial ion channels depend on the etiology of acute respiratory distress syndrome but not the route of administration. *Respir Res* 15:56. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-15-56>
- Um-Bergström P, Hallberg J, Thunqvist P, et al (2017) Lung function development after preterm birth in relation to severity of Bronchopulmonary dysplasia. *BMC Pulm Med* 17:97. <https://doi.org/10.1186/s12890-017-0441-3>
- van Haaften T, Byrne R, Bonnet S, et al (2009) Airway Delivery of Mesenchymal Stem Cells Prevents Arrested Alveolar Growth in Neonatal Lung Injury in Rats. *Am J Respir Crit Care Med* 180:1131–1142. <https://doi.org/10.1164/rccm.200902-0179OC>
- Velten M, Heyob KM, Rogers LK, Welty SE (2010) Deficits in lung alveolarization and function after systemic maternal inflammation and neonatal hyperoxia exposure. *J Appl Physiol* 108:1347–1356. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01392.2009>
- Verkman AS, Anderson MO, Papadopoulos MC (2014) Aquaporins: important but elusive drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 13:259–277. <https://doi.org/10.1038/nrd4226>
- Vlassara H, Bucala R, Striker L (1994) Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging. *Lab Invest* 70:138–151

- Vnukov VV, Gutsenko OI, Milutina NP, et al (2015) Influence of SkQ1 on Expression of Nrf2 Gene, ARE-Controlled Genes of Antioxidant Enzymes and Their Activity in Rat Blood Leukocytes under Oxidative Stress. *Biochemistry Mosc* 80:1598–1605. <https://doi.org/10.1134/S0006297915120081>
- Vogel ER, Britt RD, Trinidad MC, et al (2015) Perinatal oxygen in the developing lung. *Can J Physiol Pharmacol* 93:119–127. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2014-0387>
- Wang H, Jafri A, Martin RJ, et al (2014a) Severity of neonatal hyperoxia determines structural and functional changes in developing mouse airway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 307:L295–301. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00208.2013>
- Wang L, Lingappan K, Jiang W, et al (2015) Disruption of cytochrome P4501A2 in mice leads to increased susceptibility to hyperoxic lung injury. *Free Radic Biol Med* 82:147–159. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.01.019>
- Wang W, Cui Z-R, Cai L-X, Luo X-P (2014b) [Increased expression of fatty acid binding protein 4 in lungs of preterm rats after hyperoxic lung injury]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi* 16:1149–1153
- Wang X-H, Huang W-M (2014) Astragalus polysaccharides exert protective effects in newborn rats with bronchopulmonary dysplasia by upregulating the expression of EGFL7 in lung tissue. *Int J Mol Med* 34:1529–1536. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1951>
- Ward NS, Waxman AB, Homer RJ, et al (2000) Interleukin-6-induced protection in hyperoxic acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22:535–542. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.22.5.3808>
- Warner BB, Stuart LA, Papes RA, Wispé JR (1998) Functional and pathological effects of prolonged hyperoxia in neonatal mice. *Am J Physiol* 275:L110–117. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1998.275.1.L110>
- Watanabe T, Asai K, Fujimoto H, et al (2011) Increased levels of HMGB-1 and endogenous secretory RAGE in induced sputum from asthmatic patients. *Respiratory Medicine* 105:519–525. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2010.10.016>
- Wautier MP, Chappey O, Corda S, et al (2001) Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E685–694. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.2001.280.5.E685>
- Wells JM, Gaggari A, Blalock JE (2015) MMP generated matrikines. *Matrix Biol* 44–46:122–129. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.01.016>
- Wert SE, Whitsett JA, Nogee LM (2009) Genetic disorders of surfactant dysfunction. *Pediatr Dev Pathol* 12:253–274. <https://doi.org/10.2350/09-01-0586.1>
- Willis GR, Fernandez-Gonzalez A, Anastas J, et al (2018) Mesenchymal Stromal Cell Exosomes Ameliorate Experimental Bronchopulmonary Dysplasia and Restore Lung Function through Macrophage Immunomodulation. *Am J Respir Crit Care Med* 197:104–116. <https://doi.org/10.1164/rccm.201705-0925OC>
- Wolf L, Herr C, Niederstraßer J, et al (2017) Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) maintains pulmonary structure and regulates the response to cigarette smoke. *PLoS ONE* 12:e0180092. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180092>
- Wong P, Murray C, Louw J, et al (2011) Adult bronchopulmonary dysplasia: computed tomography pulmonary findings. *J Med Imaging Radiat Oncol* 55:373–378. <https://doi.org/10.1111/j.1754-9485.2011.02285.x>
- Wong PM, Lees AN, Louw J, et al (2008) Emphysema in young adult survivors of moderate-to-severe bronchopulmonary dysplasia. *Eur Respir J* 32:321–328. <https://doi.org/10.1183/09031936.00127107>
- Xia H, Ren X, Bolte CS, et al (2015) Foxm1 regulates resolution of hyperoxic lung injury in newborns. *Am J Respir Cell Mol Biol* 52:611–621. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2014-0091OC>

- Xu W, Zhao Y, Zhang B, et al (2015) Resveratrol attenuates hyperoxia-induced oxidative stress, inflammation and fibrosis and suppresses Wnt/ β -catenin signalling in lungs of neonatal rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 42:1075–1083. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12459>
- Yamakawa N, Uchida T, Matthay MA, Makita K (2011) Proteolytic release of the receptor for advanced glycation end products from in vitro and in situ alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 300:L516–525. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00118.2010>
- Yan SD, Chen X, Fu J, et al (1996) RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 382:685–691. <https://doi.org/10.1038/382685a0>
- Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, et al (1994) Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem* 269:9889–9897
- Yan SS, Wu Z-Y, Zhang HP, et al (2003) Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by selective blockade of encephalitogenic T-cell infiltration of the central nervous system. *Nat Med* 9:287–293. <https://doi.org/10.1038/nm831>
- Yao H, Arunachalam G, Hwang J-W, et al (2010) Extracellular superoxide dismutase protects against pulmonary emphysema by attenuating oxidative fragmentation of ECM. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:15571–15576. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007625107>
- Yee M, Buczynski BW, O'Reilly MA (2014) Neonatal Hyperoxia Stimulates the Expansion of Alveolar Epithelial Type II Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 50:757–766. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0207OC>
- Yee M, Chess PR, McGrath-Morrow SA, et al (2009) Neonatal oxygen adversely affects lung function in adult mice without altering surfactant composition or activity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297:L641–649. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00023.2009>
- Zhang H, Wang X, Xu K, et al (2015) 17 β -estradiol ameliorates oxygen-induced retinopathy in the early hyperoxic phase. *Biochem Biophys Res Commun* 457:700–705. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.052>
- Zhang X, Wang H, Shi Y, et al (2012) Role of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the prevention of hyperoxia-induced lung injury in newborn mice. *Cell Biol Int* 36:589–594. <https://doi.org/10.1042/CBI20110447>
- Zhang Y, Jiang W, Wang L, Lingappan K (2017) Sex-specific differences in the modulation of Growth Differentiation Factor 15 (GDF15) by hyperoxia in vivo and in vitro: Role of Hif-1 α . *Toxicol Appl Pharmacol* 332:8–14. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.07.016>
- Zhang Z-Q, Song Y-L, Chen Z-H, et al (2011) Deletion of aquaporin 5 aggravates acute lung injury induced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Trauma* 71:1305–1311. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e3182128528>
- Zucker-Franklin D, Philipp CS (2000) Platelet production in the pulmonary capillary bed: new ultrastructural evidence for an old concept. *Am J Pathol* 157:69–74. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64518-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64518-X)

Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Thesen der Dissertation

Bedeutung des *Receptor for advanced glycation end-products* bei der Lungenentwicklung
und der Hyperoxie-induzierten bronchopulmonalen Dysplasie am Mausmodell

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor rerum medicarum (Dr. rer. medic.) für das Fachgebiet
Molekulare Medizin

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Anke Kindermann
geboren am 29.10.1984 in Wippra

1. RAGE fördert die Alveolarisierung
2. RAGE fördert die Abdichtung der alveolo-kapillären Membran
3. RAGE hat keinen Einfluss auf den postnatal entwicklungsabhängigen Gehalt an anti-oxidativen Enzymen und ROS-Bildung in der Lunge
4. RAGE fördert in der frühen postnatalen Entwicklung die Stabilisierung einiger AT-Zell-relevanter Proteine wie AQP5 und SP-C in der Lunge
5. Starke neonatale Hyperoxie, aber nicht moderate Hyperoxie, induziert eine BPD in der Maus
6. BPD durch starke neonatale Hyperoxie wird durch RAGE noch verstärkt
7. Neonatale Hyperoxie führt zu RAGE-abhängigen Strukturveränderungen von Elastinfasern
8. Neonatale Hyperoxie verändert konzentrationsabhängig das Blutbild, vor allem die Konzentration der Thrombozyten

9 Erklärungen

(1) Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

(2) Erklärung zum Wahrheitsgehalt der Angaben

Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

(3) Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Wernigerode, den

Anke Kindermann

10 Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank nachstehenden Personen entgegenbringen, ohne deren Mithilfe dieser Promotionsschrift niemals zustande gekommen wäre:

Mein Dank gilt Frau PD Dr. rer. nat. Babett Bartling, meiner Doktormutter, für die Betreuung dieser Arbeit, die freundliche Hilfe und die zahlreichen Ideengebungen, die mir einen kritischen Zugang zu dieser Thematik eröffnete. Die gemeinsame Zusammenarbeit wird mir immer als bereichernder und konstruktiver Austausch in Erinnerung bleiben.

Ferner danke ich den Mitarbeiter/innen des Zentrums für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG) der Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für die Unterstützung und gute Zusammenarbeit bei den tierexperimentellen Arbeiten.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Anika Küttner für die Zuarbeiten und Unterstützung im Labor bedanken.

Daneben danke ich Frau Beate Gündel (Bachelorstudentin) und Frau Leonore Binder (medizinische Doktorandin), deren Arbeiten ich betreuen durfte, für die gute, produktive und vor allem unterhaltsame Zusammenarbeit.

Mein außerordentlicher Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe des Forschungslabors der Universitätsklinik und Poliklinik für Herzchirurgie des Universitätsklinikums Halle (Saale) um Prof. Dr. Andreas Simm für ein tolles Arbeitsklima und viele gute Gespräche und Ideen.

Liebevoll verbunden und zu tiefst dankbar bin ich meinem Freund, Patrick König, für seine unglaublich hilfreiche Unterstützung bei allen Software-spezifischen Fragestellungen und seinem Verständnis bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit. Deine Unterstützung hat mir Kraft und Mut zur Vollendung meiner Dissertation gegeben. Du, Miriam und Maximilian, ihr zaubert mir jeden Tag ein Lächeln ins Gesicht.

Mein ganz besonderer Dank aber gilt meinen Eltern, Jörg und Christine Kindermann, die mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglicht und immer an mich geglaubt haben und denen ich diese Arbeit widme.