

**Untersuchung der Stabilität des Phänotyps
von mesenchymalen Stammzellen
isoliert aus der Nabelschnur
bei Exposition gegenüber Hyperoxie
und rhythmischer Dehnung**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Maurizio Johannes Götz

aus Bergisch Gladbach

Gießen 2024

Aus dem Fachbereich Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen,
Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin,
Abteilung für Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie

Gutachter:

Prof. Dr. Harald Ehrhardt

Gutachter:

Prof. Dr. Dr. Henning Gall

Tag der Disputation:

25. August 2025

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|-----------------------------------------------------------------------|----|
| A. EINLEITUNG | 1 |
| A.1 Hintergrund..... | 1 |
| A.2 Bronchopulmonale Dysplasie..... | 1 |
| A.3 Mesenchymale Stammzellen im Kontext der BPD | 3 |
| A.4 Molekulare Mechanismen | 6 |
| A.5 Zielsetzung..... | 8 |
| B. MATERIAL UND METHODEN..... | 11 |
| B.1 Material..... | 11 |
| B.1.1 Gewebeproben | 11 |
| B.1.2 Chemikalien | 12 |
| B.1.3 Puffer und andere Lösungen | 14 |
| B.1.4 Antikörper und Färbungen..... | 16 |
| B.1.5 siRNA und biochemische Inhibitoren..... | 16 |
| B.1.6 Verbrauchsmaterialien | 16 |
| B.1.7 Geräte..... | 17 |
| B.1.8 Software | 18 |
| B.2 Methoden | 19 |
| B.2.1 Zellkultur..... | 20 |
| B.2.2 Rhythmische Dehnung und Hyperoxie | 22 |
| B.2.3 Lichtmikroskopie | 23 |
| B.2.4 Durchflusszytometrie..... | 25 |
| B.2.5 Western Blot | 27 |
| B.2.6 Statistik | 29 |
| B.3 Ethikvotum..... | 29 |
| C. ERGEBNISSE | 30 |
| C.1 Etablierung der Zellkultur..... | 30 |
| C.1.1 Differenzierung zu Adipozyten und Osteoblasten..... | 30 |
| C.1.2 Phänotypisierung..... | 31 |
| C.2 Phänotypveränderung unter rhythmischer Dehnung und Hyperoxie..... | 32 |
| C.2.1 Zellmorphologie..... | 32 |
| C.2.2 Zellzahl und Zellexpansionsindex | 34 |
| C.2.3 Zelluläre Seneszenz | 35 |

| | | |
|-------|----------------------------------------------------------|--------|
| C.2.4 | Programmierter Zelltod..... | 36 |
| C.2.5 | PDGFR α und α SMA..... | 37 |
| C.2.6 | p21..... | 38 |
| C.2.7 | phospho-Akt..... | 39 |
| C.3 | Zugrundeliegende Signalwege der Phänotypveränderung..... | 40 |
| C.3.1 | p21 unter p21-Inhibition | 40 |
| C.3.2 | phospho-Akt unter Akt-Inhibition | 43 |
| C.3.3 | p21 unter Akt-Inhibition | 45 |
| C.4 | Reversibilität des Zellzyklusarrests | 46 |
| C.4.1 | Zellmorphologie..... | 46 |
| D. | DISKUSSION | 52 |
| D.1 | Diskussionsgrundlage | 52 |
| D.2 | Diskussion der Methoden | 53 |
| D.3 | Diskussion der Ergebnisse | 55 |
| D.4 | Ausblick..... | 59 |
| E. | ZUSAMMENFASSUNGEN | V |
| E.1 | Deutsche Zusammenfassung..... | V |
| E.2 | English Summary | V |
| F. | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | VII |
| G. | ABBILDUNGSVERZEICHNIS | XI |
| H. | LITERATURVERZEICHNIS | XII |
| I. | ANHANG | XXI |
| J. | PUBLIKATIONSVERZEICHNIS | XXVII |
| K. | ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION | XXVIII |
| L. | DANKSAGUNG | XXIX |

A. EINLEITUNG

A.1 Hintergrund

Eins von zehn Kindern weltweit wird zu früh geboren. Frühgeburtlichkeit wird durch zahlreiche Ursachen bedingt, so geht etwa ein erhöhtes Alter der Mutter bei Geburt mit einer Risikoerhöhung einher (Chawanpaiboon et al. 2019). Gemäß aktueller Definition gilt ein Neugeborenes dann als frühgeboren, wenn es vor der vollendeten 37. Schwangerschaftswoche *post menstruationem* (SSW) entbunden wird. Innerhalb dieses Kollektivs werden die Subgruppen geringes Geburtsgewicht (unter 2.500 g; *Low Birth Weight*; LBW), sehr geringes Geburtsgewicht (unter 1.500 g; *Very Low Birth Weight*; VLBW) und extrem geringes Geburtsgewicht (unter 1.000 g; *Extremely Low Birth Weight*; ELBW) unterschieden (WHO 2004). Eine der häufigsten Komplikationen von Frühgeburtlichkeit stellt die bronchopulmonale Dysplasie (BPD) dar. Ihr Risiko ist insbesondere bei geringem Gestationsalter und Geburtsgewicht erhöht. Frühgeborene der Gruppen VLBW und ELBW sind daher überwiegend betroffen (Thébaud et al. 2019). Im Jahr 2022 wurden in Deutschland 9.826 Kinder mit einem entsprechend geringen Gewicht geboren (IQTIG 2023a), im selben Jahr wurden 451 Neudiagnosen einer BPD gestellt (IQTIG 2023b). Zu Prävention und Therapie einer bronchopulmonalen Dysplasie erfolgt häufig postnatal die Applikation von Kortikosteroiden und postnatal von intratrachealem Surfactant sowie einem milden Beatmungsregime mit dem Ziel reduzierter Tidalvolumina und gemäßigter Sauerstoffexposition. Diese Maßnahmen haben eine begrenzte Effektivität, da sie nur Teile der Pathogenese positiv beeinflussen. Überlappende Signalwege von pulmonaler Inflammation und Entwicklung erschweren die Entwicklung adäquater Therapeutika. Hierfür stellt der Einsatz autologer oder allogener mesenchymaler Stammzellen eine mögliche Lösung dar, da diese zugleich antiinflammatorisch und proliferationssteigernd wirken können (Goetz et al. 2021). Zur Entwicklung neuer Therapien der bronchopulmonalen Dysplasie lohnt sich daher ein genauerer Blick auf diese Zellen.

A.2 Bronchopulmonale Dysplasie

Die Erstbeschreibung der bronchopulmonalen Dysplasie erfolgte durch Northway et al. (1967) als radiologisch diagnostizierbare Lungenerkrankung des Frühgeborenen mit hoher Mortalität. Die BPD ist eine Entwicklungsstörung der Lunge, der ein Atemnotsyndrom und eine künstliche Beatmung vorausgehen. Es wird zwischen der von

Northway et al. beschriebenen „traditionellen BPD“ und der „neuen BPD“ unterschieden: Die „traditionelle BPD“ betrifft vergleichsweise reife und große Frühgeborene nach Anwendung eines intensiven Beatmungsregimes. Das so erzeugte Baro- und Volutrauma geht bei Betroffenen mit schwerer interstitieller Fibrosierung einher. Die „neue BPD“ tritt dagegen besonders häufig bei ELBW-Frühgeborenen auf, deren Überleben erst in Folge der zuvor erwähnten Therapiemöglichkeiten (Kortikosteroide, Surfactant, milderes Beatmungsregime) möglich wurde. Die Lungenentwicklung wird in fünf Stadien eingeteilt und beinhaltet embryonale Phase (SSW 3–6), pseudoglanduläre Phase (SSW 5–17), kanalikuläre Phase (SSW 16–25), sakkuläre Phase (SSW 24–Geburt) und alveoläre Phase (SSW 24–Lebensjahr 8; Rehman und Bacha 2022). Von der „neuen BPD“ betroffene Kinder befinden sich bei Geburt häufig erst in der späten kanalikulären oder sakkulären Phase. Daher ist die sich in einer BPD manifestierende Lungenentwicklungsstörung vor allem durch Störungen der Alveolarisierung und Vaskularisierung charakterisiert (Jobe 1999).

Die gängige Definition der BPD wurde 2001 in einem Workshop des *National Heart, Lung, and Blood Institute* (NHLBI) entwickelt (Jobe und Bancalari 2001). Die letzte Überarbeitung erfolgte im NHLBI-Workshop 2018 (Higgins et al. 2018). Letztere wurde u. a. wegen mangelnder Standardisierung der radiologischen Bildinterpretation und deutlich abweichend berechneten Inzidenzwerten kritisiert, sodass eine zukunftsfeste Definition der BPD weiterhin Gegenstand der Diskussion ist (Kim et al. 2021). In dieser Arbeit wird daher die weiterhin übliche Definition von 2001 verwendet, die wie folgt lautet: Eine bronchopulmonale Dysplasie kann diagnostiziert werden, wenn für mindestens 28 Tage eine Behandlung mit mehr als 21 % Sauerstoff stattfand. Für vor SSW 32 Geborene erfolgt die Evaluation im SSW 36 entsprechenden Lebensalter, für ab SSW 32 Geborene in einem Lebensalter von über 28, aber unter 56 Tagen. Falls das Neugeborene bereits vor Erreichen dieser Altersgrenzen aus dem Krankenhaus entlassen wird, erfolgt die Evaluation bei Entlassung. Eine milde Form liegt vor, wenn das Neugeborene bei Evaluation Raumluft atmet und keine mechanische Atemunterstützung benötigt; eine moderate Form, wenn die inspiratorische Sauerstofffraktion FiO_2 der Atemluft auf einen Anteil unterhalb von 30 % erhöht ist und keine mechanische Atemunterstützung benötigt wird; eine schwere Form, wenn dieser Anteil bei mindestens 30 % liegt und/oder mechanische Atemunterstützung benötigt wird.

Risikofaktoren für die Entwicklung einer BPD können in prä- und postnatal unterteilt werden: Pränatale Risikofaktoren sind neben den bereits erwähnten Faktoren Frühgeburtlichkeit und geringes Geburtsgewicht eine intrauterine Wachstumsrestriktion (*Intrauterine Growth Retardation*; IUGR), Präeklampsie bzw. HELLP-Syndrom (*Hemolysis, Elevated Liver Enzymes, and Low Platelet Count*), ein Nikotinabusus der Mutter und eine genetische Prädisposition bzw. männliches Geschlecht. Postnatale Risikofaktoren sind eine künstliche Beatmung, eine erhöhte inspiratorische Sauerstoffkonzentration, die intensivmedizinische Gabe von Flüssigkeit, Nährstoffen und Antibiotika und eine ausbleibende Gabe von Muttermilch. Sowohl prä- als auch postnatal bestehen ferner Risiken durch Infektionen und mikrobielle Kolonisation (Holzfurter et al. 2022). Betroffene leiden oftmals unter substanziellen, dauerhaften Einschränkungen: Die verringerte Lungenfunktion kann zu Obstruktion mit den Krankheitsbildern Asthma bronchiale und COPD, erhöhter Infektanfälligkeit und pulmonal-arterieller Hypertonie führen; ferner können neurologische und soziale Entwicklung beeinträchtigt werden (Gough et al. 2012; Islam et al. 2015).

Neben der Prävention auslösender Faktoren kommt daher der Entwicklung effektiver Therapeutika besondere Bedeutung zu. Nach Behnke et al. (2021) werden folgende Substanzen derzeit am Menschen angewandt oder in klinischen Studien am Menschen erprobt:

- Antioxidantien: Vitamin A, Vitamin E, Docosahexaensäure, N-Acetylcystein, Koffein, inhalatives NO
- Enzymbasierte Therapien: rekombinante humane Kupfer-Zink-Superoxiddismutase, Surfactant, Selen
- Antiinflammatorische Therapien: Kortikosteroide, Vitamin D, Azithromycin
- Zellbasierte Therapien: mesenchymale Stammzellen

Für letztere sind aus Nagetiermodellen äußerst vielversprechende Ergebnisse bekannt (Augustine et al. 2017). Was macht auf mesenchymalen Stammzellen basierende Therapien so einzigartig?

A.3 Mesenchymale Stammzellen im Kontext der BPD

Mesenchymale Stammzellen haben eine potente regenerative Wirkung, sodass auf ihnen basierende Zellprodukte einen aussichtsreichen Therapieansatz der bronchopulmonalen Dysplasie darstellen (Thébaud 2018). Im Körper sind sie in zahlreichen Geweben

nachweisbar. Die Erstbeschreibung als fibroblastische Vorläuferzellen erfolgte durch Friedenstein et al. (1976). Im Kontext der BPD wurde der erste Nachweis von Hennrick et al. (2007) erbracht, in dem mesenchymale Stammzellen aus den Trachealsekreten künstlich beatmeter Frühgeborener erfolgreich isoliert wurden. Gemäß der Definition der *International Society for Cell & Gene Therapy* (ISCGT; Dominici et al. 2006) müssen humane Zellen folgende Kriterien erfüllen, um als mesenchymale Stammzellen klassifiziert zu werden:

- Kunststoffadhärentes Wachstum
- Expression von CD105, CD73 sowie CD90; Nichtexpression von CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79 α oder CD19 sowie HLA-DR
- Differenzierbarkeit zu Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten

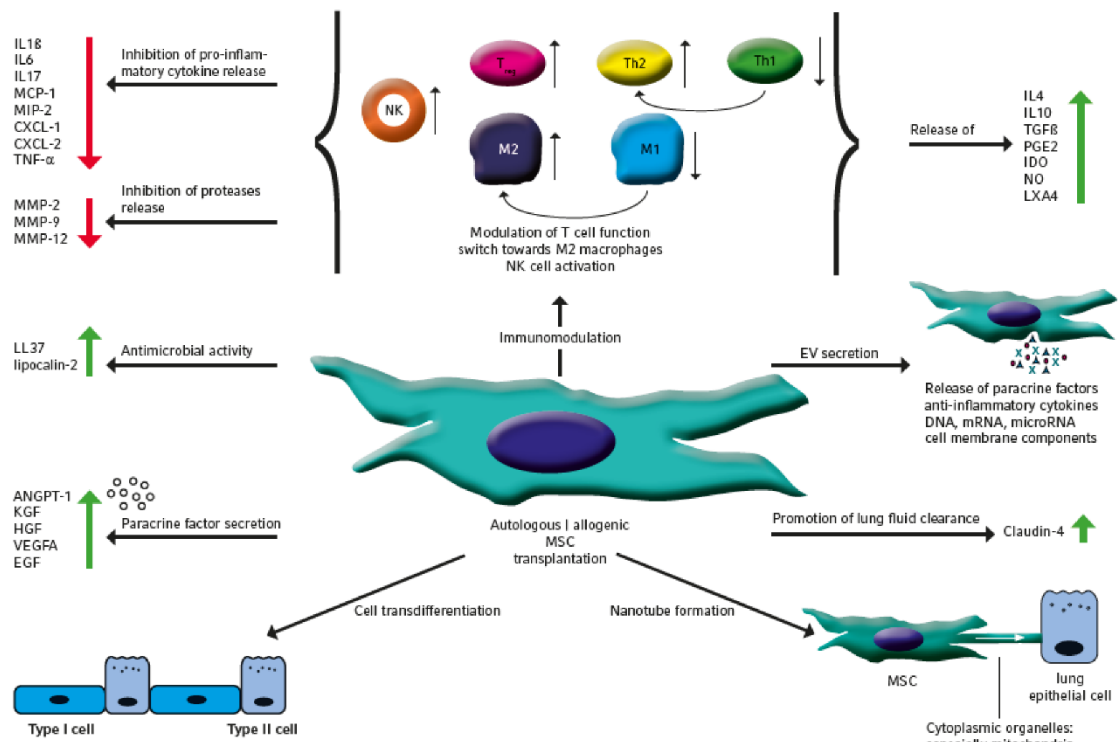
Es besteht eine enge Verwandtschaft zwischen Fibroblasten und mesenchymalen Stammzellen. Sie sind gemeinsam Teil der Familie der Stromazellen, sodass auch von mesenchymalen Stromazellen gesprochen wird. Die beiden Populationen können meist nicht trennscharf abgegrenzt werden und weisen zahlreiche gemeinsame Charakteristika auf (Haniffa et al. 2009). Daher wird in dieser Arbeit nicht zwischen den Termini „mesenchymale Stromazelle“ und „mesenchymale Stammzelle“ differenziert, sondern einheitlich der Terminus „mesenchymale Stammzelle“ mit der Abkürzung MSC verwendet.

Da sie ubiquitär vorkommen, sind mesenchymale Stammzellen aus zahlreichen Geweben kultivierbar. Für therapeutische Anwendungen sind MSC des Knochenmarks und der Nabelschnur besonders relevant. Mesenchymale Stammzellen aus *Wharton's Jelly* der Nabelschnur wurden erstmalig durch McElreavey et al. (1991) isoliert und von Wang et al. (2004) als MSC klassifiziert. Im Vergleich zu aus adultem Knochenmark extrahierten Zellen sind MSC der Nabelschnur stärker antiinflammatorisch wirksam und initial leichter zu kultivieren: Es ist keine invasive Probenentnahme erforderlich, da die für gewöhnlich vernichtete Nabelschnur verwendet werden kann (Jin et al. 2013).

In der Lunge entfalten MSC umfangreiche antiinflammatorische und wachstumsstimulierende Wirkungen (Abbildung 1). Es gibt Hinweise darauf, dass residente pulmonale MSC ihre volle Funktionsfähigkeit erst schrittweise im Laufe der fetalen Entwicklung erlangen. Möbius et al. (2019) verglichen residente pulmonale MSC von zwischen SSW 16 und SSW 18 entbundenen Föten mit Nabelschnur-MSC, in dem

sie die Zellen *in vitro* gegenüber einer erhöhten Sauerstoffkonzentration (Hyperoxie) exponierten. Bei aus der Nabelschnur kultivierten MSC zeigten sich hierbei signifikant stärkere antiinflammatorische Effekte.

Abbildung 1: Wirkungen autologer und allogener MSC der Lunge



- Immunmodulatorische Wirkung: Annahme eines antiinflammatorischen Phänotyps von T-Zellen, NK-Zellen und mononukleären Zellen
- Antimikrobielle Effekte, Inhibition der epithelial-mesenchymalen Transition, Erhöhung der Clearance pulmonaler Sekrete
- Entwicklungsfördernde, regenerative und wachstumsstimulierende Wirkung durch paracrine Sekretion von Wachstumsfaktoren und Verbesserung u. a. der interzellulären Kommunikation durch Sekretion extrazellulärer Vesikel
- Stabilisierung des Energiehaushalts von Zellen des Lungenepithels durch Übertragung zytoplasmatischer Organellen über Nanotubes

Quelle: Behnke et al. (2020)

Auch *in vivo* zeigten sich im Nagetiermodell in zahlreichen Studien positive Effekte der Gabe allogener MSC auf Lungengewebe unter erhöhter Sauerstoffexposition. So kam es etwa zur verstärkten Alveolarisierung, zur verbesserten Angiogenese mit verringerter Muskularisierung intrapulmonaler Arteriolen und zu einem verringerten Auftreten von pulmonal-arterieller Hypertonie und Lungenfibrose (Augustine et al. 2017). Interessanterweise ergab sich dies auch, wenn statt der unmittelbaren Zellen Exosomen

oder so genanntes konditioniertes Medium dieser Zellen appliziert wurden (Thébaud 2018). Die Überlebensfähigkeit von MSC *in vivo* war dagegen auf wenige Tage beschränkt (Chen et al. 2013). Anwendungen bei Neugeborenen im Kontext der BPD befinden sich bislang in einem Anfangsstadium: In drei Phase-I-Studien wurde die prinzipielle Machbarkeit einer trachealen bzw. intravenösen MSC-Gabe demonstriert (Chang et al. 2014; Lim et al. 2018; Xia et al. 2023). Eine dieser Arbeitsgruppen untersuchte in einer sich anschließenden Phase-II-Studie für n=66 erstmals die therapeutische Wirksamkeit einer MSC-Gabe zur Prävention oder Therapie der BPD. Für die Subgruppe der in SSW 23 und 24 Geborenen konnte eine signifikante Verringerung des sekundären Outcomes „schwere BPD“ gezeigt werden; in der Gesamtgruppe veränderte sich das primäre Outcome „Tod oder schwere/moderate BPD“ nicht signifikant. Eine auf in SSW 23 und 24 Geborene beschränkte Phase-II-Studie derselben Arbeitsgruppe ist daher in Arbeit (Ahn et al. 2021).

A.4 Molekulare Mechanismen

Im vorhergehenden Abschnitt wurde beschrieben, dass zum Nachweis mesenchymaler Stammzellen in Ermangelung spezifischer Marker mehrere Schritte notwendig sind. Die Gruppe der *Platelet Derived Growth Factors* (PDGF) könnte eine Lösung liefern: Bei ihnen handelt es sich um 1974 erstbeschriebene Wachstumsfaktoren, von denen die vier Isotypen A, B, C und D existieren (Ross et al. 1974). Bonner et al. (1991) konnten zeigen, dass PDGF-Isotypen die Proliferation von Lungenfibroblasten induzieren. PDGF wirkt u. a. am PDGF-Rezeptor (PDGFR), welcher ubiquitär von mitosefähigen Zellen exprimiert wird. Es existieren die Subtypen PDGFR α und PDGFR β . Die Expression von PDGFR α ist spezifisch für mesenchymale Stammzellen, sodass die Prüfung auf PDGFR α -Positivität ein Bestandteil der Verifizierung von Stammzellcharakteristika sein kann (Farahani und Xaymardan 2015). Sowohl im Tiermodell als auch bei Frühgeborenen konnte gezeigt werden, dass sich die Expression von PDGFR α durch mechanische Beatmung verringert (Bland et al. 2007; Popova et al. 2014; Oak et al. 2017). Ein gezielter Knockout von PDGFR α führte zu schweren Entwicklungsstörungen der Lunge (Boström et al. 1996).

Die Fähigkeit von MSC, eine Enddifferenzierung zu verschiedenen Zelltypen anzunehmen, wurde bereits erläutert. Neben den nach ISCGT nachzuweisenden Zelltypen sind MSC in der Lage, sich zu Myofibroblasten zu differenzieren. Ein

charakteristischer Marker dieser Zellen ist das am Zytoskelett beteiligte Protein α *Smooth Muscle Actin* (α SMA; Darby et al. 1990). Bei Untersuchungen an aus Trachealsekreten beatmeter Kinder isolierten MSC war ein Phänotyp mit hoher Spontanproliferation und verringerter Expression von α SMA prädiktiv für einen höheren Schweregrad einer BPD. Durch Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen konnte dieser Phänotyp gezielt induziert werden (Reicherzer et al. 2018).

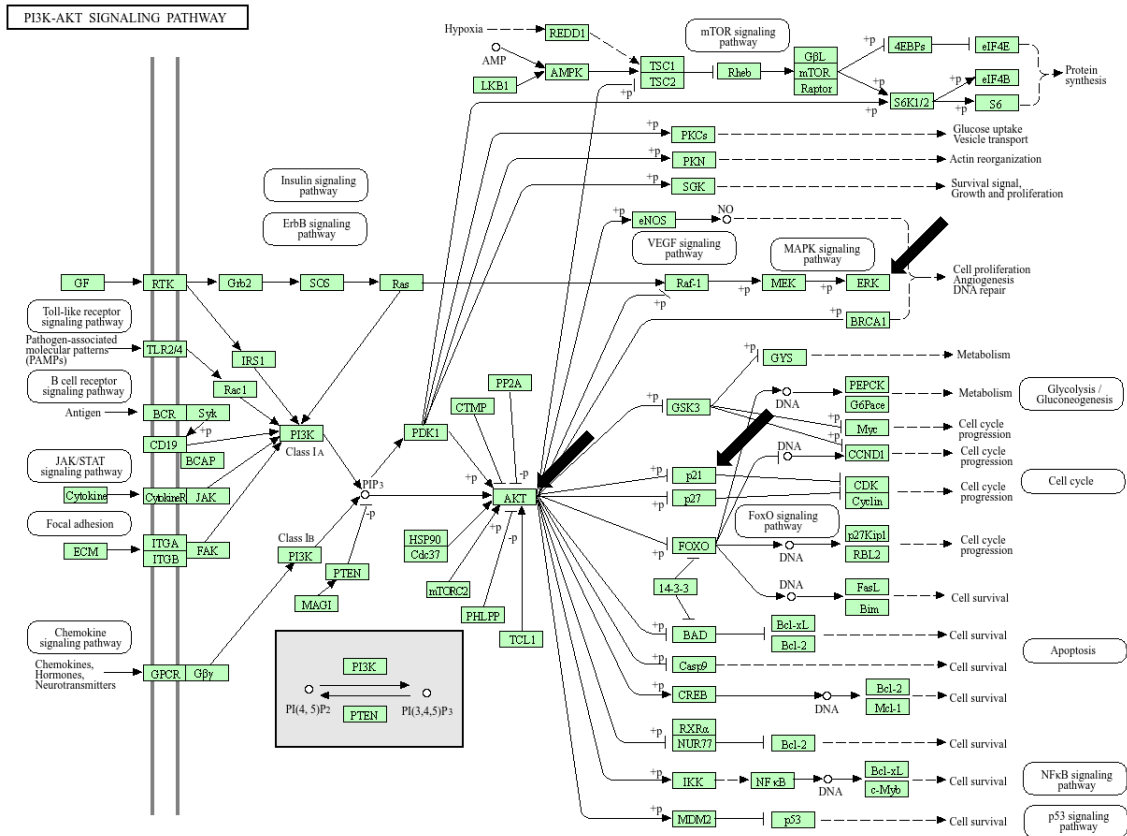
Neben der Veränderung von Stammzellcharakteristika kann Zellstress auch den Zellzyklus beeinflussen. Das Konzept der zellulären Seneszenz beschreibt einen irreversiblen Zellzyklusarrest, der mit einer permanenten Funktionsveränderung verbunden ist (Hayflick und Moorhead 1961). Lichtmikroskopisch zeigen sich seneszente Zellen flacher und größer als vitale Zellen. Sie verfügen zudem über mehr Stressfasern und über mehr und längere Podien (Sethe et al. 2006). Einer der häufigsten Marker zur Darstellung zellulärer Seneszenz ist die von Dimri et al. (1995) erstbeschriebene β -Galaktosidase. Ursächlich für eine in Färbungen erhöht darstellbare β -Galaktosidase ist vorwiegend eine erhöhte Anzahl und Enzymsynthese von Lysosomen.

Ein Mediator für die Induktion zellulärer Seneszenz ist p21 (Muñoz-Espín et al. 2013). p21 ist ein Gentranskript, das in hoher Konzentration *in vitro* als wachstumshemmend auf Zellen von Gehirn, Lunge und Kolon erstbeschrieben wurde (El-Deiry et al. 1993). Es ist auch als Cyclin-Dependant-Kinase-Inhibitor 1 (CDK-Inhibitor 1) bekannt. Eine hohe zelluläre p21-Konzentration bewirkt ein Sistieren der Zellteilung nach erfolgter Mitose, in dem Zellen in einen G0-Status übergehen. Sie treten somit nicht über G1- und S-Phase in einen neuen mitotischen Zyklus ein (Liu et al. 2017). p21 kann als zellulärer Schutzfaktor gegen Sauerstofftoxizität angesehen werden (Helt et al. 2001); im Nagetiermodell führt ein p21-Knockout dementsprechend zu einer verstärkten Lungenschädigung unter Sauerstoffexposition (McGrath-Morrow et al. 2004).

Der Phosphatidylinositol-3-Kinase-Akt-Signalweg (PI3K/Akt-Signalweg) ist ebenfalls an der Regulation von Zellzyklus und Zellmetabolismus beteiligt (Abbildung 2). Der Grundstein für die Entdeckung dieses Signalwegs wurde von Staal et al. (1977) im Zellkulturmodell gelegt: Mit dem Retrovirus AKT-8 infizierte Zellen zeigten ein erhöhtes Auftreten von Leukämien. Später wurde das auch als Proteinkinase B bezeichnete Akt als Onkogen in mit AKT-8 infizierten Zellen identifiziert und in den PI3K/Akt-Signalweg eingeordnet. In MSC ging eine hohe Konzentration von Akt mit einer umfangreicheren Funktionsfähigkeit einher. Im Einzelnen beinhaltete dies Verbesserungen von zellulärem

Überleben, Proliferation, Migration, Angiogenese und Zytokinsynthese (Chen et al. 2013).

Abbildung 2: PI3K/Akt-Signalweg



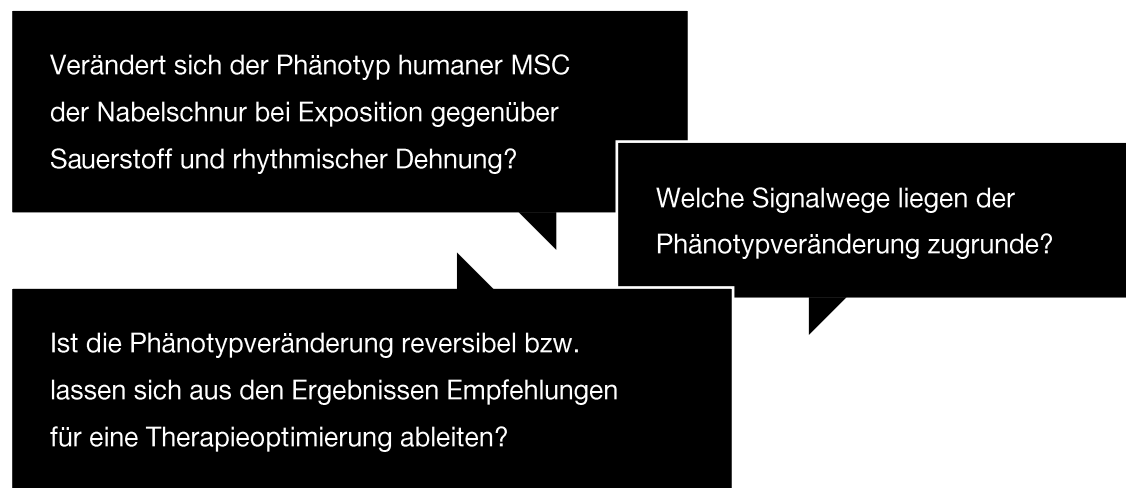
Umfangreiche Auswirkungen von Akt (Pfeil) auf den Zellzyklus, unter anderem Phosphorylierung von p21 (Pfeil) und über mehrere Zwischenschritte Phosphorylierung von Erk (Pfeil); Quelle: Kegg Pathway Database (2024)

A.5 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, humane MSC der Nabelschnur *in vitro* unter Bedingungen zu untersuchen, wie sie bei der Beatmung eines Frühgeborenen herrschen. Hierzu wurde zunächst der Phänotyp der Zellen nach Exposition gegenüber rhythmischer Dehnung (*Cyclic Mechanical Stretch*; CMS) und Hyperoxie (HOX) betrachtet. Daran anschließend wurden zelluläre Signalwege analysiert und geprüft, inwiefern ein auftretender Zellzyklusarrest reversibel ist. Dies geschah vor dem Hintergrund, dass Frühgeburtlichkeit mit ihrer Komplikation bronchopulmonale Dysplasie ein schwerwiegendes Problem darstellt. Aktuell besteht ein Defizit in den Behandlungsmöglichkeiten einer BPD, wobei allogene mesenchymale Stammzellen als

vielversprechender Therapieansatz gelten. Um adäquate Therapeutika zu entwickeln, ist ein besseres Verständnis dafür notwendig, wie sich die potenziell therapeutisch einsetzbaren humanen MSC der Nabelschnur unter den in der Lunge eines beatmeten Frühgeborenen herrschenden Bedingungen verhalten. Unsicherheiten bezüglich eines bestmöglichen und möglichst lang wirksamen Zellprodukts gehören dabei zu den Hauptproblemen pulmonaler Stammzelltherapien. Um dieses Problem anzugehen, könnte die Effektivität von MSC-Therapeutika durch Inhibition relevanter Gene und Selektion besonders wirksamer Kulturen verbessert werden (Liang et al. 2021). Die Auswahl geeigneter Zielproteine erfordert jedoch ein präzises Verständnis der zugrundeliegenden Signalwege. Indem sie dieses Verständnis verbessert, soll diese Arbeit langfristig dazu beitragen, Kinder mit bestehender oder drohender bronchopulmonaler Dysplasie mit stammzellbasierten Präparaten erfolgreich zu behandeln.

Abbildung 3: Forschungsfragen



Es wurden zunächst die in Abbildung 3 dargestellten Forschungsfragen formuliert. Aus diesen Forschungsfragen wurden im nächsten Schritt die in Abbildung 4 gezeigten Hypothesen abgeleitet. Zur Untersuchung dieser Hypothesen wurde ein Zellkulturmodell etabliert, in dem MSC simultan gegenüber rhythmischer Dehnung und Hyperoxie exponiert werden können. Die visuelle Dokumentation von Zellmorphologie und Zellzahl erfolgte mittels Lichtmikroskopie unter Einsatz von spezifischen Färbungen; zur Identifikation der Oberflächenmarker und zur Quantifizierung des programmierten Zelltods wurde die Durchflusszytometrie verwendet; die Proteinanalytik erfolgte schließlich durch Western Blots.

Abbildung 4: Hypothesen

1

CMS und HOX wirken zytotoxisch auf MSC der Nabelschnur und bedingen eine Phänotypveränderung.

2

Diese Phänotypveränderung geht mit der Regulation von Signalwegen des Zellzyklus einher. Ein selektives Ausschalten hochregulierter Zellzyklusmodulatoren beeinflusst die Phänotypveränderung.

3

In Abhängigkeit von der Expositionsdauer gegenüber CMS und HOX kommt es zunächst zu einem reversiblen Zellzyklusarrest und später zum irreversiblen Zellzyklusarrest sowie zum programmierten Zelltod.

B. MATERIAL UND METHODEN

B.1 Material

B.1.1 Gewebeproben

Als Gewebeproben wurden ausschließlich Nabelschnüre von gesunden Neugeborenen aus Entbindung per Sectio zwischen SSW 25+5 und 41+1 ohne Zeichen einer Infektion verwendet. Ein ca. 10 cm langes Nabelschnurasservat wurde im Kreißsaal steril in ein 125 ml-Probengefäß mit ca. 25 ml isotonischer NaCl-Lösung gegeben und bis zu 48 h bei 4 °C gelagert, bevor die Kultivierung der Zellen begann. Es wurden Zellen von 30 verschiedenen Neugeborenen isoliert; Details sind in Abbildung 5 dargestellt.

Abbildung 5: Herkunft der Gewebeproben

A

| Eigenschaft | Median (Interquartilsabstand) bzw. n (Anteil) |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Schwangerschaftswoche | 38+2 (37+5 – 38+5) |
| Geburtsgewicht (g) | 3.065 (2.683 – 3.408) |
| Geburtsgewicht unter der 10. Perzentile (<i>Small for Gestational Age</i>) | 6 (20,0 %) |
| Geburtsgewicht über der 90. Perzentile (<i>Large for Gestational Age</i>) | 2 (6,7 %) |
| Männliches Geschlecht | 19 (63,3 %) |
| Mehrlingsgeburt | 2 (6,7 %) |
| Indikation zur Sectio | |
| Beckenendlage | 5 (16,7 %) |
| Geburtsstillstand | 1 (3,3 %) |
| Makrosomie | 2 (6,7 %) |
| Präeklampsie | 2 (6,7 %) |
| Vorzeitiger Blasensprung | 1 (3,3 %) |
| Vorzeitige Plazentalösung | 2 (6,7 %) |
| Wunsch | 9 (30,0 %) |
| Zustand nach mehrfacher Sectio | 8 (26,7 %) |

B

| Patientennummer | Geburtsdatum | SSW | Geburtsgewicht (g) | Geburtsperzentile | Indikation zur Sectio | Geschlecht | Mehrlingsgeburt |
|--------------------|--------------|------|--------------------|-------------------|---------------------------|------------|-----------------|
| GIE-2020-CO-L-010 | 08.10.2020 | 37+5 | 3.115 | 38 | Vorzeitiger Blasensprung | männlich | nein |
| GIE-2020-CO-L-012 | 21.10.2020 | 41+1 | 3.525 | 44 | Geburtsstillstand | weiblich | nein |
| GIE-2020-CO-L-013 | 22.10.2020 | 38+1 | 2.810 | 18 | Wunsch | weiblich | nein |
| GIE-2020-CO-L-015 | 03.11.2020 | 38+3 | 3.355 | 47 | Wunsch | männlich | nein |
| GIE-2021-CO-L-020 | 05.01.2021 | 38+5 | 3.320 | 39 | Wunsch | männlich | nein |
| GIE-2021-CO-L-021 | 06.01.2021 | 38+3 | 3.810 | 84 | Makrosomie | männlich | nein |
| GIE-2021-CO-L-023 | 08.01.2021 | 37+5 | 2.640 | 8 | Beckenendlage | männlich | nein |
| GIE-2021-CO-L-022 | 08.01.2021 | 38+4 | 2.840 | 10 | Wunsch | männlich | nein |
| GIE-2021-417* | 18.01.2021 | 25+5 | 490 | 2 | Präeklampsie | männlich | nein |
| GIE-2021-CO-L-025 | 18.01.2021 | 36+0 | 2.220 | 7 | Z. n. mehrfacher Sectio | männlich | ja |
| GIE-2021-CO-L-024 | 18.01.2021 | 38+5 | 2.915 | 12 | Beckenendlage | männlich | nein |
| GIE-2021-CO-L-026 | 02.02.2021 | 38+0 | 2.875 | 16 | Z. n. mehrfacher Sectio | männlich | nein |
| GIE-2021-CO-L-027 | 03.02.2021 | 38+0 | 2.690 | 13 | Beckenendlage | weiblich | ja |
| GIE-2021-CO-L-030* | 24.02.2021 | 32+0 | 1.450 | 20 | Vorzeitige Plazentalösung | weiblich | nein |
| GIE-2021-CO-L-031 | 25.02.2021 | 38+5 | 3.695 | 73 | Z. n. mehrfacher Sectio | männlich | nein |
| GIE-2021-CO-L-032 | 26.02.2021 | 36+0 | 2.170 | 6 | Z. n. mehrfacher Sectio | männlich | nein |
| GIE-2021-CO-L-033 | 28.02.2021 | 37+0 | 3.175 | 57 | Z. n. mehrfacher Sectio | männlich | nein |
| GIE-2021-CO-L-038 | 06.04.2021 | 39+1 | 4.500 | 99 | Makrosomie | männlich | nein |
| GIE-2021-CO-L-039 | 09.04.2021 | 37+4 | 2.410 | 3 | Z. n. mehrfacher Sectio | männlich | nein |
| GIE-2021-CO-L-049 | 24.08.2021 | 37+3 | 2.425 | 7 | Beckenendlage | weiblich | nein |
| GIE-2021-CO-L-053 | 07.09.2021 | 40+0 | 3.400 | 43 | Wunsch | weiblich | nein |
| GIE-2021-CO-L-052 | 07.09.2021 | 38+0 | 3.400 | 58 | Wunsch | männlich | nein |
| GIE-2021-CO-L-054 | 18.10.2021 | 38+0 | 2.680 | 12 | Z. n. mehrfacher Sectio | weiblich | nein |
| GIE-2021-CO-L-055 | 21.10.2021 | 38+0 | 3.015 | 35 | Wunsch | weiblich | nein |
| GIE-2021-CO-L-056 | 21.10.2021 | 38+3 | 3.815 | 91 | Präeklampsie | weiblich | nein |
| GIE-2022-CO-L-057 | 25.01.2022 | 39+4 | 3.845 | 74 | Vorzeitige Plazentalösung | männlich | nein |
| GIE-2022-CO-L-059 | 26.01.2022 | 38+4 | 3.000 | 26 | Z. n. mehrfacher Sectio | weiblich | nein |
| GIE-2022-CO-L-058 | 26.01.2022 | 38+3 | 3.410 | 52 | Wunsch | männlich | nein |
| GIE-2022-CO-L-061 | 27.01.2022 | 38+4 | 3.205 | 32 | Wunsch | männlich | nein |
| GIE-2022-CO-L-060 | 27.01.2022 | 38+6 | 3.730 | 84 | Beckenendlage | weiblich | nein |

A: Auswertung zur Herkunft der Gewebeproben; beim Vorliegen einer Mehrlingsgeburt wurde jeweils nur ein Geschwisterkind eingeschlossen; n=30

B: Tabellarische Auflistung der einzelnen Gewebeproben; je eine Probe von zwei zusätzlich eingeschlossenen Frühgeborenen mit sehr bzw. extrem geringen Geburtsgewicht wurde zum Vergleich für Differenzierung, zelluläre Seneszenz und Versuche zur Reversibilität des Zellzyklusarrests verwendet (*); n=30

B.1.2 Chemikalien

Acrylamid 30 %

Biorad, Hercules, US, #1610156

Akt-Inhibitor VIII

Merck, Darmstadt, DE, #124018-5MG

Albumin V

Carl Roth, Karlsruhe, DE, #80764

| | |
|-------------------------------------|----------------------------------------------|
| Alizarinrot | Carl Roth, Karlsruhe, DE, #03481 |
| Ammoniumpersulfat | Biorad, Hercules, US, #1610700 |
| Annexin V Binding Buffer | Biolegend, San Diego, US, #422201 |
| Annexin V PE | Biolegend, San Diego, US, #640947 |
| β -Galactosidase Staining Kit | Cell Signaling, Danvers, US, #9860S |
| β -Mercaptoethanol | Merck, Darmstadt, DE, #M3148-25ML |
| ddH ₂ O | B. Braun, Melsungen, DE, PZN 00088992 |
| Dimethylformamid | Merck, Darmstadt, DE, #D4254 |
| Dimethylsulfoxid | Merck, Darmstadt, DE, #D8418-50ML |
| DMEM, high glucose | Thermo Fisher, Waltham, US, #41965092 |
| ECL-Reagenz | Thermo Fisher, Waltham, US, #34095 |
| EDTA | Applichem, Darmstadt, DE, #A50970250 |
| Essigsäure | Carl Roth, Karlsruhe, DE, #7332.1 |
| Fetal Calf Serum (FCS) | Thermo Fisher, Waltham, US, #10270106 |
| Gamunex 10 % | Grifols, Barcelona, ES, PZN 00440489 |
| Gentamycin 40 mg/ml | Ratiopharm, Ulm, DE, PZN 03928174 |
| Glycerol | Merck, Darmstadt, DE, #G5516-100ML |
| Isopropanol | Avantor, Radnor, US, #8067 |
| Laemmli-Ladepuffer | Biorad, Hercules, US, #1610737 |
| Laufpuffer | Biorad, Hercules, US, #1610772 |
| Lipofectamine RNAiMAX | Thermo Fisher, Waltham, US, #13778150 |
| MEM mit Glutamax | Thermo Fisher, Waltham, US, #41090028 |
| MesenCult MSC Basal Medium | Stemcell Technologies, Vancouver, CA, #05401 |
| Methanol | Merck, Darmstadt, DE, #32213-2.5L-M |
| Milchpulver 5 % | Carl Roth, Karlsruhe, DE, #T1451 |
| Natriumchlorid | Carl Roth, Karlsruhe, DE, #39571 |

| | |
|--------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| Natriumchlorid 0,9 %, Lösung | B. Braun, Melsungen, DE, PZN 2737779 |
| Ölrot | Thermo Fisher, Waltham, US, #11459030 |
| Opti-MEM | Thermo Fisher, Waltham, US, #11058021 |
| Paraformaldehyd 4 % | Merck, Darmstadt, DE, #1040051000 |
| Penicillin 10.000 IU/ml – Streptomycin 10.000 µg/ml | Thermo Fisher, Waltham, US, #15140122 |
| Phosphate Buffered Saline (PBS) | Thermo Fisher, Waltham, US, #70011036 |
| Pierce BCA Protein Assay Kit | Thermo Fisher, Waltham, US, #23225 |
| Ponceau S | Carl Roth, Karlsruhe, DE, #59382 |
| Precision Plus Protein Dual Color Standards | Biorad, Hercules, US, #1610374 |
| RIPA Lysis Buffer | Santa Cruz, Dallas, US, #sc-24948 |
| Sauerstoff, medizinisch | Nippon Gases, Shinagawa, JP, #005210 |
| SDS | Biorad, Hercules, US, #1610416 |
| StemPro Adipogenesis Differentiation Kit | Thermo Fisher, Waltham, US, #A1007001 |
| StemPro Osteogenesis Differentiation Kit | Thermo Fisher, Waltham, US, #A1007201 |
| Stripping Buffer | Thermo Fisher, Waltham, US, #21063 |
| TEMED | Biorad, Hercules, US, #1610800 |
| Tris Base | Merck, Darmstadt, DE, #T1503-1KG |
| Tris/Glycine Buffer | Biorad, Hercules, US, #1610771 |
| TrypLE Express | Thermo Fisher, Waltham, US, #12605028 |
| Tween | Merck, Darmstadt, DE, #655205-250ML |

B.1.3 Puffer und andere Lösungen

Alizarinrot, Färbelösung:

Auflösen von 2 g Alizarinrot in 100 ml ddH₂O; pH-Titration auf 4,1–4,3; Filtration

FACS-Puffer:

1 g Albumin V auf 100 ml PBS

Kulturmedium in Passage 0:

443,75 ml MesenCult MSC Basal Medium; 50 ml FCS; 5 ml Penicillin 10.000 IU/ml – Streptomycin 10.000 µg/ml; 1,25 ml Gentamycin 40 mg/ml

Kulturmedium in nachfolgenden Passagen:

443,75 ml MEM mit Glutamax; 50 ml FCS; 5 ml Penicillin 10.000 IU/ml – Streptomycin 10.000 µg/ml; 1,25 ml Gentamycin 40 mg/ml

Ölrot, Färbelösung:

Auflösen von 60 mg Ölrot in 20 ml Isopropanol; Hinzufügen von 13,3 ml ddH₂O; Setzen für 10min; Filtration; kurz vor Versuchsdurchführung: Verdünnung im Verhältnis 3 Teile Ölrot Stock Solution : 2 Teile ddH₂O

Ponceaurot, Färbelösung:

0,5 g Ponceau S auf 99 ml ddH₂O und 1 ml Essigsäure

Puffer für Sammelgel:

12,2 g Tris; 0,8 g SDS auf 200 ml ddH₂O

Puffer für Trenngel:

90,8 g Tris; 2 g SDS; 5,96 g EDTA auf 500 ml ddH₂O

Sammelgel:

1,2 ml ddH₂O; 500 µl Puffer für Sammelgel; 300 µl Acrylamid 30 %; 3,2 µl TEMED; 19,2 µl Ammoniumpersulfat 10 %

TBS-T 0,5 %:

2,4 g Tris und 8,8 g Natriumchlorid auf 1000 ml ddH₂O mit pH-Titration auf 7.6; anschließend mit 5 ml Tween versetzt

Transferpuffer:

100 ml Tris/Glycine Buffer; 200 ml Methanol; 700 ml VE-Wasser

Trenngel:

1,6 ml ddH₂O; 1,2 ml Puffer für Trenngel; 1,7 ml Acrylamid 30 %; 400 µl Glycerol 50 %; 4 µl TEMED; 75 µl Ammoniumpersulfat 10 %

B.1.4 Antikörper und Färbungen

Abbildung 6: Antikörper und Färbungen

| Antikörper für Durchflusszytometrie | | | | | | |
|-------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|------------|-------------|------------|-----------------------------------|
| Ziel | Hersteller | # | Konjugat | Menge/Probe | | |
| CD165 | Ancell, Bayport, US | #392040 | FITC | 1,6 µl | | |
| CD34 | Biolegend, San Diego, US | #343513 | APC-Cy7 | 1,25 µl | | |
| CD11b | Becton Dickinson, Franklin Lakes, US | #562721 | BV605 | 1,25 µl | | |
| CD91 | Thermo Fisher, Waltham, US | #12091942 | PE | 1,25 µl | | |
| CD90 | Biolegend, San Diego, US | #328114 | APC | 1,25 µl | | |
| CD45 | Becton Dickinson, Franklin Lakes, US | #560777 | V500 | 1,25 µl | | |
| CD105 | Biolegend, San Diego, US | #323215 | PerCP | 2 µl | | |
| CD73 | Becton Dickinson, Franklin Lakes, US | #562430 | BV421 | 1,25 µl | | |
| CD146 | Biolegend, San Diego, US | #361008 | PE-Cy7 | 1,25 µl | | |
| Färbungen für Durchflusszytometrie | | | | | | |
| Ziel | Hersteller | # | Konjugat | Menge/Probe | | |
| Annexin V | Biolegend, San Diego, US | #640947 | PE | 3 µl | | |
| Sytox | Thermo Fisher, Waltham, US | #S34857 | | 2 µl | | |
| Beads 10µm | Spherotec, Lake Forest, US | #ACFP-100-3 | | 5 µl | | |
| Antikörper für Western Blots | | | | | | |
| Ziel | MW | Hersteller | # | Spezies | Verdünnung | Puffer |
| phospho-Akt | 60 kD | Cell Signaling, Danvers, US | #4060S | Kaninchen | 1:2.000 | Albumin V 3 % in TBS-T 0,5 % |
| Akt | 60 kD | Cell Signaling, Danvers, US | #9272S | Kaninchen | 1:1.000 | Albumin V 3 % in TBS-T 0,5 % |
| p21 | 21 kD | Cell Signaling, Danvers, US | #2947S | Kaninchen | 1:1.000 | Milchpulver 5 % in TBS-T 0,5 % |
| PDGFRα | 190 kD | Cell Signaling, Danvers, US | #3174S | Kaninchen | 1:1.000 | Albumin V 3 % in TBS-T 0,5 % |
| αSMA | 42 kD | Santa Cruz, Dallas, US | #sc-58669 | Maus | 1:5.000 | Milchpulver 5 % in TBS-T 0,5 % |
| GAPDH | 37 kD | Merck, Darmstadt, DE | #MAB374 | Maus | 1:5.000 | Milchpulver 5 % in TBS-T 0,5 % |
| bAct | 42 kD | Abcam, Cambridge, GB | #ab-8227 | Kaninchen | 1:10.000 | Milchpulver 5 % in TBS-T 0,5 % |
| Kaninchen | | Cell Signaling, Danvers, US | #7074S | Ziege | 1:1.000 | Milchpulver 5 % in TBS-T 0,5 % |
| Maus | | Santa Cruz, Dallas, US | #sc-516102 | rekombinant | 1:1.000 | Milchpulver 5 % in TBS-T 0,5 % |

B.1.5 siRNA und biochemische Inhibitoren

Akt Inhibitor VIII

Merck, Darmstadt, DE, #124018-5MG

mock-siRNA

Thermo Fisher, Waltham, US, #4390843

p21-siRNA

Thermo Fisher, Waltham, US, #4390824-s417

B.1.6 Verbrauchsmaterialien

6-Well-Platten, nicht beschichtet

Greiner, Kremsmünster, AT, #657160

| | |
|----------------------------------|-------------------------------------------------|
| 6-Well-Platten, Kollagen-Coating | Flexcell, Burlington, US, #BF-3001C |
| 96-Well-Platten | Greiner, Kremsmünster, AT, #655180 |
| Blotbox | Advansta, San Jose, US, #L07031005 |
| Extra Thick Blot Filter Paper | Biorad, Hercules, US, #1703966 |
| Gefrierbehälter | Thermo Fisher, Waltham, US, #5100-0001 |
| Nitrocellulosemembran | GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB, #10600015 |
| Petrischale 100 mm | Sarstedt, Nümbrecht, DE, #833902 |
| Pinzette, chirurgisch | Entrhal, Straelen, DE, #0118809 |
| Pipetten | Gilson, Middleton, US, #F144059M u. a. |
| Pipettenspitzen mit Filter | Nerbe, Winsen, DE, #076958300 u. a. |
| Probengefäß 125 ml | Nerbe, Winsen, DE, #086026042 |
| Reagiergefäß 1,5 ml | Sarstedt, Nümbrecht, DE, #72706400 |
| Röhrchen für FACS 5 ml | Sarstedt, Nümbrecht, DE, #551579 |
| Röhrchen 15 ml | Greiner, Kremsmünster, AT, #188271 |
| Röhrchen 50 ml | Greiner, Kremsmünster, AT, #227261 |
| Skalpell Nr. 10 | Feather, Osaka, JP, PZN 063665 |
| Zellkulturflasche T75 | Greiner, Kremsmünster, AT, #658175 |

B.1.7 Geräte

| | |
|----------------------|-------------------------------------------------|
| Durchflusszytometer | Becton Dickinson, Franklin Lakes, US, #Aria III |
| Durchflusszytometer | Becton Dickinson, Franklin Lakes, US, #Canto II |
| Elektrophoresesystem | Biorad, Hercules, US, #1658001FC, #1653360 |
| Imager | Biorad, Hercules, US, #ChemiDoc XRS+ |
| Inkubator | Thermo Fisher, Waltham, US, #Heracell Vios 160i |
| Kühlschrank 4 °C | Liebherr, Kirchdorf, DE, #BioFresh u. a. |
| Kühlschrank -80 °C | Thermo Fisher, Waltham, US, #TSX50086V |
| Kühlzentrifuge | Hettich, Tuttlingen, DE, #Mikro 220R |

| | |
|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Laminar-Flow-Sterilbank | Heraeus, Hanau, DE, #Kendro HS12 |
| Lichtmikroskop | Carl Zeiss, Oberkochen, DE, #Axiovert 25 |
| Lichtmikroskop, digital | Leica, Wetzlar, DE, #DMi1 |
| Nanodrop | Thermo Fisher, Waltham, US, #ND-1000 |
| Neubauer-Zählkammer | Laboroptik, Lancing, GB, #Neubauer Improved |
| Plexiglasbox | Sora, Wutha-Farnroda, DE, #20300 |
| Powerpack | Biorad, Hercules, US, #Powerpack 300 u. a. |
| Sauerstoffmessgerät | Greisinger, Regenstauf, DE, #GOX-100 |
| Schwenker | IKA, Staufen, DE, #Rocker 3D Digital u. a. |
| Smartphone | Shenzhen Zhixin New Information Technology Co., Ltd., Shenzhen, CN, #Honor 9 Lite |
| Tension System | Flexcell, Burlington, US, #Tissue Train |
| Thermoschüttler | A. Hartenstein, Würzburg, DE, #TS-100 |
| Tischzentrifuge | Eppendorf, Hamburg, DE, #Minispin plus u. a. |
| TransBlot Turbo | Biorad, Hercules, US, #TransBlot Turbo |
| Vortexer | Heidolph, Schwabach, DE, #REAX 2000 |
| Zentrifuge | Hettich, Tuttlingen, DE, #Rotina 38 |

B.1.8 Software

| | |
|-----------|--------------------------------------------------------|
| FACS Diva | Becton Dickinson, Franklin Lakes, US, #FACS Diva 6.1.3 |
| FlowJo | Becton Dickinson, Franklin Lakes, US, #FlowJo 10.7.1 |
| ImageLab | Biorad, Hercules, US, #ImageLab |
| ImageJ | Wayne Rasband, Kensington, US, #ImageJ 1.54j |
| LAS EZ | Leica, Wetzlar, DE, #LAS EZ |
| R | The R Foundation, Wien, AT, #R 4.1.3 |

B.2 Methoden

In einem ersten Schritt erfolgte die in unserer Arbeitsgruppe erstmalige Etablierung eines Kultivierungsprotokolls von Nabelschnur-MSC. Die Inkulturnahme erfolgte via *Tissue Explant Method* angelehnt an Beeravolu et al. (2017). Da diese keine enzymatische Behandlung etwa durch Kollagenasen erfordert, wurde eine Beeinflussung der Zellen möglichst geringgehalten. Zur Untersuchung der Differenzierungsfähigkeit erfolgte eine Kultivierung über mehrere Wochen zu Adipozyten bzw. Osteoblasten. Die für Adipozyten charakteristischen Lipidvakuolen wurden mittels Ölrotfärbung, die für Osteoblasten charakteristischen Kalziumreservoirs mittels Alizarinrotfärbung lichtmikroskopisch nachgewiesen. Ferner wurden undifferenzierte Zellen in der Durchflusszytometrie auf charakteristische Oberflächenmarker untersucht.

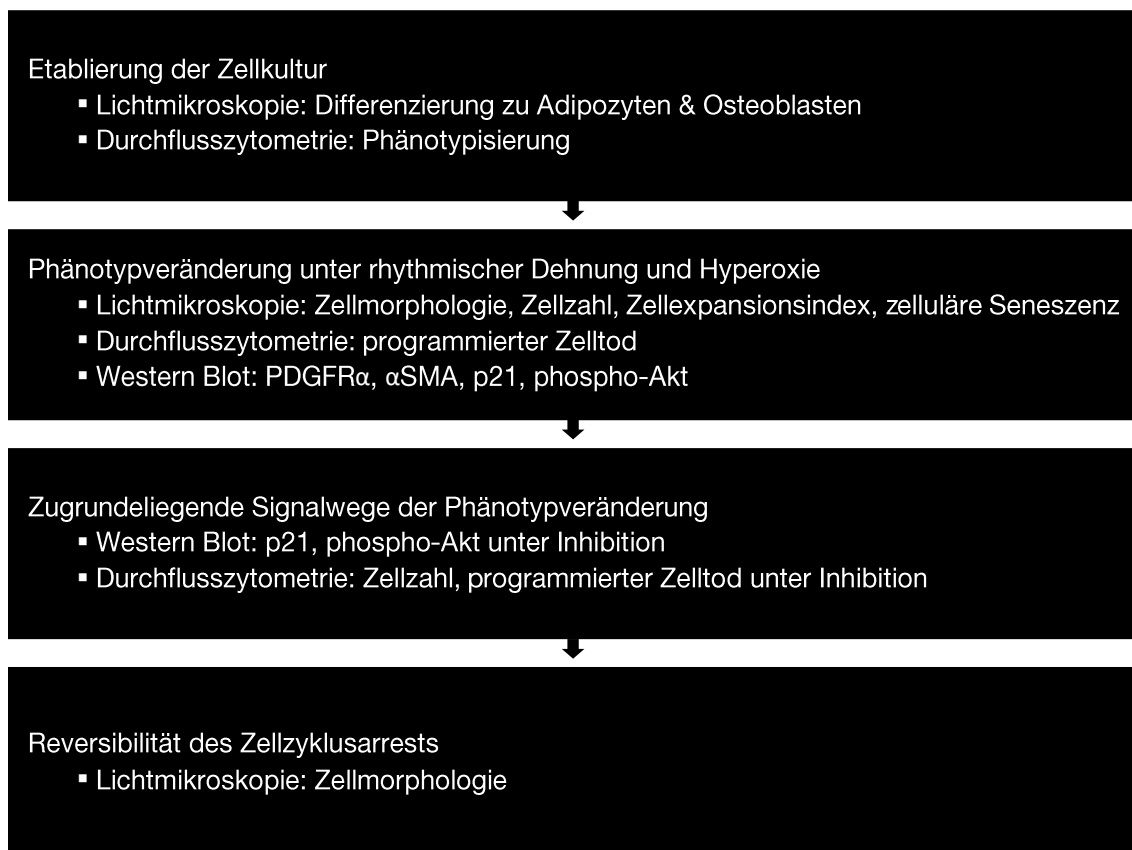
Im zweiten Schritt wurde die Veränderung des Phänotyps der Zellen unter CMS und HOX untersucht, um die Bedingungen in der Lunge eines beatmeten Neugeborenen zu simulieren. Hierzu wurde ein Versuchsetting mit einem Flexcell Tension System für die rhythmische Dehnung und einem nahezu luftdicht verschließbaren Behältnis aus Plexiglas für die Hyperoxie genutzt. Die Dokumentation der Proben erfolgte lichtmikroskopisch ungefärbt sowie nach Färbung auf β -Galaktosidase zur Darstellung der zellulären Seneszenz. Veränderungen auf Proteinebene wurden mit Western Blots auf PDGFR α und α SMA visualisiert.

Als Drittes wurde untersucht, welche Signalwege den bereits lichtmikroskopisch gezeigten Veränderungen zugrunde liegen. In Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe mit trachealen MSC wurden p21, phospho-Akt und phospho-Erk in einem Microarray als mögliche Zielproteine identifiziert und deren Hochregulation unter CMS und HOX bestätigt (Behnke et al. 2024). Daran anschließend wurden entsprechende Antikörper für die Anwendung im Western Blot titriert, um Veränderungen in der Expression dieser Proteine untersuchen zu können. In weiteren Vorversuchen wurden passende Zeitpunkte ermittelt, da Hoch- bzw. Herunterregulation nur zeitlich begrenzt nachweisbar sind. So konnte eine Hochregulation von p21 und phospho-Akt verifiziert werden, für phospho-Erk war dies nicht der Fall. Es folgte die Etablierung einer selektiven Hemmung von p21 mittels *Small Interfering RNA* (siRNA) und von phospho-Akt mittels biochemischem Inhibitor. Die Effektivität der Inhibition wurde in Western Blots objektiviert. Um die Auswirkungen auf die zelluläre Viabilität unter den gewählten Stressoren zu ermitteln, erfolgten durchflusszytometrische Messungen des programmierten Zelltods mittels der

Farbstoffe Annexin V und Sytox. Annexin V bindet an Phosphatidylserin, das bei apoptotischen Zellen nach außen gelagert wird. Sytox kann in nekrotische Zellen gelangen und an dort befindliche DNA binden. So konnte zwischen vitalen sowie apoptotischen und nekrotischen Zellen unterschieden werden.

Im abschließenden vierten Schritt wurde untersucht, ob es je nach Expositionsdauer auch zu einem reversiblen Zellzyklusarrest kommen kann. Zellen wurden nach Beendigung von CMS und HOX für einige Zeit unter Normalbedingungen weiterkultiviert und phänotypisch im Lichtmikroskop verglichen. In Abbildung 7 sind die verwendeten Methoden den jeweiligen Forschungsfragen zugeordnet. Anschließend erfolgt eine präzise Beschreibung der einzelnen Schritte.

Abbildung 7: Fragestellungen und verwendete Methoden

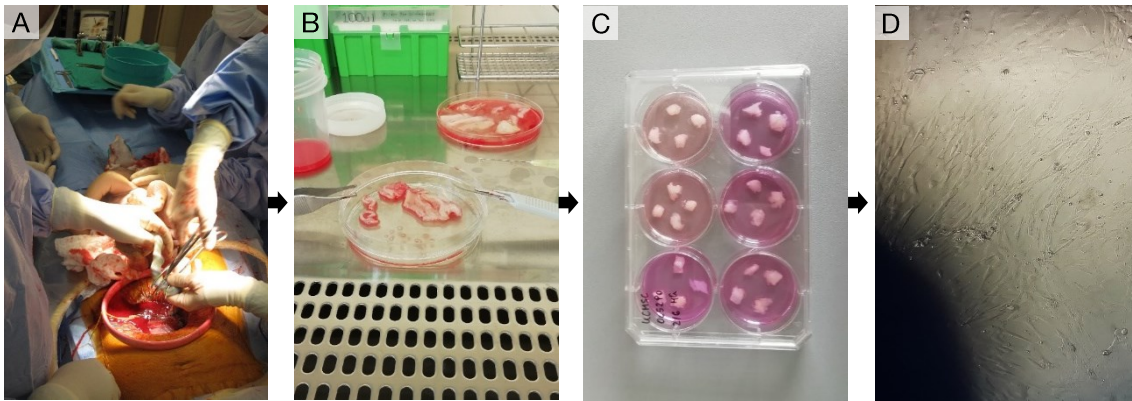


B.2.1 Zellkultur

Für die gesamte Zellkultur gilt, dass ausschließlich mit humanen mesenchymalen Stammzellen gearbeitet wurde, die vor Ort aus der Nabelschnur isoliert wurden. Das entsprechende Protokoll wurde neu etabliert, ist in Abbildung 8 dargestellt und wurde durch Phänotypisierung und Differenzierung der Zellen validiert. Zellen wurden

grundsätzlich nicht über Passage 2 hinausgehend verwendet und nicht eingefroren. Einzig zum initialen Nachweis des Zelltyps mesenchymale Stammzelle wurden neben Zellen aus Passage 1 auch Zellen aus Passage 3 verwendet.

Abbildung 8: Kultivierungsprotokoll



A: Sterile Entnahme der Nabelschnur bei Sectio; Quelle: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Caesarean_section_operation_-_cutting_the_umbilical_cord-8Fe_b2011.jpg

B: Eröffnung und Entfernung der Gefäße

C: Inkubation der Gewebstücke (hier abweichend in einer 6-Well-Platte)

D: Aussprossen der MSC

Die Kultivierung erfolgte in einem Inkubator bei 37 °C mit 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit. Von den erwähnten Kulturmedien wurden 2 ml in 6-Well-Platten, 3 ml in 6-Well-Platten bei CMS und HOX, 6,5 ml in 100 mm-Petrischalen und 9 ml in T75-Zellkulturflaschen verwendet. Ein Mediumwechsel erfolgte zweimal wöchentlich, nicht aber während eines Experiments.

Bei der Inkulturnahme wurde die Nabelschnur in einer 100 mm-Petrischale unter der Sterilbank platziert und deren Gefäße mit gekühltem (4 °C) PBS gespült. Sie wurde anschließend mit Skalpell und Pinzette auf 3 cm lange Stücke eingekürzt und longitudinal eröffnet. Die Blutgefäße wurden entfernt und das verbleibende Gewebe in annähernd quadratische Stücke mit 1–2 mm Kantenlänge zerteilt. Jeweils 30 Gewebstücke wurden mit der Innenseite nach unten in einer weiteren 100 mm-Petrischale platziert und für 5 min ohne Medium belassen. Schließlich wurden die Gewebstücke vorsichtig mit Kulturmedium überschichtet und für 16–18 Tage inkubiert. Unmittelbar vor der sich anschließenden erstmaligen Passagierung erfolgte die Entfernung der Gewebstücke. Wenn in nachfolgenden Abschnitten der Terminus n= verwendet wird, sind damit stets Zellen gemeint, die aus unterschiedlichen Nabelschnüren isoliert wurden.

Wiederholungen von Untersuchungen an Zellen der gleichen Nabelschnur wurden nicht für die Auswertung verwendet.

Die Passagierung erfolgte zu diesem und zu späteren Zeitpunkten bei einer Konfluenz von 70–90 %. Zunächst wurden die Zellen mit einer der Menge des Kulturmediums entsprechenden Menge PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine Überschichtung mit TrypLE Express, wobei 500 µl für ein Well einer 6-Well-Platte und je 3 ml für T75-Flaschen und 100 mm-Petrischalen verwendet wurden. Für die enzymatische Ablösung wurden die Zellen für 3 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, die Ablösung wurde anschließend durch Hinzugabe der doppelten Menge DMEM unterbrochen. Die so entstandene Zellsuspension wurde bei 440 g für 5 min in einer Rotina 38-Zentrifuge zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurde das so entstandene Pellet in Kulturmedium resuspendiert und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer unter einem Axiovert-Lichtmikroskop bestimmt. Bei Weiterkultivierung erfolgte die Aussaat in einer Zelldichte von 7.500 Zellen/cm².

Für die zum Nachweis des Zelltyps mesenchymale Stammzelle erforderliche Differenzierung der Zellen zu Adipozyten und Osteoblasten wurden Zellen in Passage 1 und 3 mittels *Adipogenesis Differentiation Kit* und *Osteogenesis Differentiation Kit* entsprechend den Protokollen des Herstellers für 2–3 Wochen in nicht beschichteten 6-Well-Platten kultiviert. Zellen aus Passage 3 wurden zusätzlich geprüft, um sicherzugehen, dass die in den Versuchen verwendeten Zellen in Passage 2 in jedem Fall über Stammzeleigenschaften verfügen. Als Negativkontrolle wurden Zellen gleicher Kultur und Passage verwendet, die für die gleiche Zeitdauer in gewöhnlichem Kulturmedium inkubierten. Eine detaillierte Beschreibung der sich anschließenden Färbungen findet sich im Abschnitt zur Lichtmikroskopie.

B.2.2 Rhythmische Dehnung und Hyperoxie

Für die Versuche, die CMS und HOX untersuchten, wurden am ersten Versuchstag 150.000–200.000 Zellen pro Well einer mit Kollagen I beschichteten 6-Well-Platte mit dreidimensional dehnbarem Boden ausgesät. Bei den Versuchen zu lichtmikroskopischer Zellzählung, β-Galaktosidase-Färbung und Reversibilität Zellzyklusarrest erfolgte aufgrund der lichtmikroskopischen Zielparameter eine Aussaat in geringerer Dichte von 75.000 Zellen pro Well, um die Abgrenzbarkeit der Zellen voneinander zu erhöhen. Am zweiten Tag erfolgte ein Mediumwechsel, um Zellen zu entfernen, die sich nicht gesetzt

hatten. Falls eine Inhibition Bestandteil des Versuchs war, wurden zudem die entsprechenden Reagenzien hinzugegeben. Für die Inhibition mittels siRNA wurde nach dem Protokoll des Transfektionsreagenz Lipofectamin mit Opti-MEM gearbeitet. Die p21-siRNA und die mock-siRNA als Negativkontrolle wurden in einer Konzentration von 8,3 nM (entsprechend 25 pmol in einem Well einer 6-Well-Platte) appliziert. Für die Akt-Inhibition wurde ein biochemischer Akt-Inhibitor (Akt-Inhibitor VIII) verwendet. Zunächst wurde parallel mit den Konzentrationen 1 μ M und 3 μ M (entsprechend 3 nmol und 9 nmol pro Well einer 6-Well-Platte) gearbeitet. Da nur die höhere Konzentration für eine zuverlässige Inhibition geeignet war, wurde in späteren Versuchen nur diese appliziert.

Am dritten Versuchstag begann die Applikation von CMS und HOX. CMS wurde über ein BioFlex Tension System derart realisiert, dass ein Tidalvolumen von 5 ml/kg und eine Atemfrequenz von 60/min möglichst akkurat abgebildet wurden. Hierzu wurden eine sinusoidale Elongation von 1–8 %, eine Frequenz von 1 Hz und ein Aussteuerungsgrad (*Duty Cycle*; DC) von 40 % gewählt. Für die Exposition gegenüber Hyperoxie wurde ein Zielwert von 80 % Sauerstoff gewählt, um eine intensive Beatmung zu simulieren. In einer annähernd luftdicht verschließbaren Plexiglasbox wurde dabei der Sauerstoffgehalt unter Verwendung von medizinischem Sauerstoff in einem Korridor zwischen 77,5 % und 82,5 % gehalten. Die Einhaltung des Sauerstoffwerts wurde regelmäßig mit einem Sauerstoffmessgerät überprüft. CMS und HOX wurden in Abhängigkeit vom Zielparame-ter für einen Zeitraum von 12 h (Western Blots auf phospho-Akt), 24 h (Western Blots auf p21) und 72 h (Lichtmikroskopie, β -Galaktosidase-Färbung, Durchflusszytometrie, Western Blots auf PDGFR α und α SMA) aufrechterhalten. Zur Prüfung einer möglichen Reversibilität des Zellzyklusarrests wurden die Zellen nach abgeschlossener Applikation von CMS und HOX für weitere 4 bis 7 Tage unter Normalbedingungen kultiviert.

B.2.3 Lichtmikroskopie

Bei anzufärbenden Zellen wurde nach Versuchsende stets das Medium aspiriert und ein Waschschr-itt mit 3 ml PBS pro Well durchgeführt. Falls die Zellen ungefärbt mikroskopiert werden sollten, wurde anschließend lediglich eine Fixierung für 30 min in Paraformaldehyd 4 % bei Zimmertemperatur durchgeführt. Die Mikroskopie erfolgte an einem digitalen Auflichtmikroskop, die Bildverarbeitung mit LAS EZ und die

Auszählung mit ImageJ. Falls die Zellen nach der Mikroskopie weiterkultiviert oder anderweitig analysiert wurden, erfolgte die Dokumentation an einem konventionellen Lichtmikroskop mittels Smartphone. Die so gemachten Beobachtungen können als Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen betrachtet werden.

Für den Nachweis der Differenzierung zu Adipozyten wurde eine Färbung mit Ölrot verwendet. Auch hier wurde zunächst für 30 min in Paraformaldehyd 4 % fixiert. Anschließend folgten zwei Waschschrte mit je 3 ml ddH₂O, ein Waschschrte mit 1,5 ml Isopropanol 60 % und schließlich Ersatz von Isopropanol durch 1,5 ml Ölrot-Färbelösung. Die Zellen wurden mit der Färbelösung für 20 min bei Raumtemperatur auf dem Schwenker inkubiert und abschließend dreifach mit je 3 ml ddH₂O gewaschen.

Für den Nachweis der Differenzierung zu Osteoblasten wurde eine Färbung mit Alizarinrot verwendet. Nach Fixierung in Paraformaldehyd 4 % folgten zwei Waschschrte mit je 3 ml ddH₂O und anschließend unmittelbar die Hinzugabe von 1,5 ml Alizarinrot-Färbelösung, die für 2–3 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert wurde. Abschließend wurde auch hier dreifach mit je 3 ml ddH₂O gewaschen.

Für die Quantifizierung erfolgte eine Auszählung der lichtmikroskopischen Bilder, wobei jeweils der Mittelwert aus drei Zählungen für die weitere Analyse verwendet wurde. Die so ermittelte Zellzahl wurde durch den Quotienten aus Fläche im Bildausschnitt und Fläche des Wells dividiert, um die gesamte Zellzahl der Probe zu erhalten. Anschließend wurde der Zellexpansionsindex berechnet, in dem die Anzahl lebender Zellen durch die Anzahl ausgesäter Zellen dividiert wurde, die Änderung des Zellexpansionsindex dementsprechend, in dem der jeweils errechnet Zellexpansionsindex durch den Zellexpansionsindex der Kontrollprobe dividiert wurde.

Zur Bestimmung der zellulären Seneszenz wurden die Zellen nach Versuchsende entsprechend dem Protokoll des Herstellers mit einem β -Galactosidase Staining Kit behandelt. Hierzu wurden die Zellen eines Wells zunächst einmalig mit einer dem Kulturmedium entsprechenden Menge PBS gewaschen und für 10–15 Minuten mit 1 ml Fixierlösung überschichtet. Anschließend wurde zweimalig mit PBS gewaschen, mit 1 ml der Färbelösung überschichtet und für rund 8 h in einem CO₂-freien Inkubator bei 37 °C inkubiert. Schließlich wurde die Färbelösung abgesaugt, der Boden der 6-Well-Platten ausgeschnitten und in einer 100 mm-Petrischale mit Glycerol 70 % überschichtet. Zur

statistischen Auswertung wurden die angefärbten und nicht angefärbten Zellen ausgezählt und für jede Interventionsgruppe der Anteil angefärbter Zellen berechnet.

B.2.4 Durchflusszytometrie

Zunächst wurden die Zellen analog zur Passagierung abgelöst wie in Abschnitt B.2.1 beschrieben.

Die Phänotypisierung erfolgte analog zur Differenzierung mit Zellen aus Passage 1 und 3. Zunächst wurden je 200.000 Zellen in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert. Es folgten die Zugabe von 10 µl Gamunex und eine Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur zur Blockade unspezifischer Bindungen. Die jeweiligen Antikörper (siehe Abschnitt B.1.4) wurden hinzugegeben. Um die benötigte Zellzahl gering zu halten, wurden mehrere Antikörper gemäß folgender Systematik im selben Probenröhrchen gemessen:

- Ungefärbte Kontrollprobe
- CD105 (PerCP), CD73 (BV421)
- CD90 (APC), CD91 (PE), CD45 (V500)
- CD146 (PE-Cy7)
- CD165 (FITC), CD34 (APC-Cy7), CD11b (BV605)

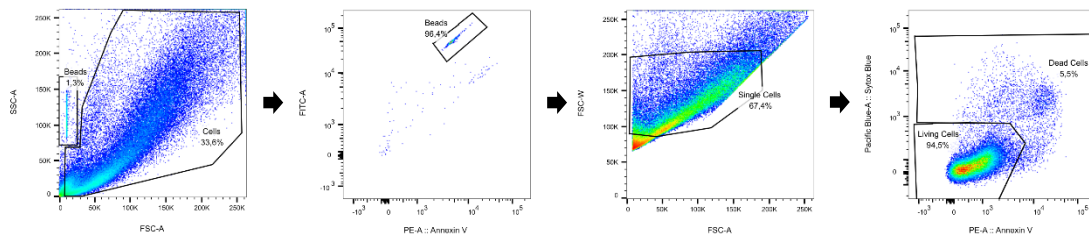
Anschließend wurden die Proben auf einem Vortexer geschüttelt und für weitere 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Es folgte ein Waschschrift mit 2 ml FACS-Puffer, eine Zentrifugation und eine Resuspension in 100 µl FACS-Puffer. Die Messung erfolgte mit FACS Diva am Gerät BD Aria III.

Die Auswertung wurde in FlowJo erstellt. Hierzu wurden zunächst mittels *Forward Scatter* (FSC) und *Side Scatter* (SSC) die zu analysierenden Zellen definiert. Anschließend wurde in Histogrammen basierend auf dem dem jeweiligen Antikörper zugehörigen Fluoreszenzkanal gegen die Hintergrundfluoreszenz der ungefärbten Kontrollprobe diskriminiert. Es erfolgte eine Normalisierung der Höhen beider gemessener Fluoreszenzen. Schließlich wurden Grenzwerte im Plot eingetragen und etwaige Veränderungen der Fluoreszenz abgelesen.

Der programmierte Zelltod wurde über die Zellzahl und den Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen bestimmt. Hierzu wurden die Proben wie beschrieben abgelöst. Um auch nicht mehr adhärente Zellen und Zellfragmente zu erfassen, wurden das ursprünglich im Well befindliche Kulturmedium und der für den ersten Waschschrift

verwendete PBS-Puffer gemeinsam mit der Zellsuspension zentrifugiert. Anschließend wurden die Pellets in je 100 µl Annexin V Binding Buffer resuspendiert. Je 5.000 Count Beads mit einem Durchmesser von ca. 10 µm und Annexin V wurden hinzugegeben und die Proben nach Vortexen für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Je acht Proben wurde mit der beschriebenen Menge einer 1:100 in PBS verdünnten Sytox-Lösung versetzt, für 2 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und unmittelbar am Canto II gemessen. Unter Verwendung von FACS Diva erfolgte die Messung bis zur Detektion von 2.500 Count Beads. Darauffolgend wurden in FlowJo nacheinander vier Plots erstellt, um die Zellpopulationen voneinander abzugrenzen (Abbildung 9).

Abbildung 9: Durchflusszytometrische Gating-Strategie



Im ersten Plot wurde in Abhängigkeit von Forward Scatter (FSC) und Side Scatter (SSC) zwischen Count Beads und Zellen differenziert. Im zweiten Plot erfolgte die genauere Eingrenzung der Count Beads basierend auf der Fluoreszenz in den Kanälen PE-A und FITC-A; diese Kanäle wurden gewählt, da hier der Unterschied im Fluoreszenzverhalten zwischen Count Beads und Zellen am ausgeprägtesten war. Der dritte Plot diente dem Ausschluss von Dubletten innerhalb der Zellen und verwendete dazu die *Forward Scatter Area* (FSC-A) und die *Forward Scatter Width* (FSC-W). Schließlich wurden im vierten Plot mittels Annexin V- und Sytox-Färbung lebende und tote Zellen voneinander abgegrenzt. Die Gesamtzahl an Zellen wurde hierbei als Summe von Anzahl lebender Zellen und Anzahl toter Zellen definiert.

Für die Quantifizierung wurde zunächst der in der Messung enthaltene Anteil der Probe bestimmt, in dem die Anzahl gemessener Count Beads durch die Gesamtzahl zugegebener Count Beads dividiert wurde. Anschließend wurden die im vorherigen Schritt bestimmten Werte für die Gesamtzahl an Zellen und die Anzahl lebender bzw. toter Zellen durch diesen Anteil dividiert und so normalisiert. Der Anteil lebender bzw. toter Zellen wurde relativ bestimmt, in dem die jeweilige normalisierte Anzahl an Zellen durch die normalisierte Gesamtzahl an Zellen dividiert wurde. Schließlich wurde der (spezifische) programmierte Zelltod errechnet, in dem der Anteil zusätzlich zur Kontrollprobe gestorbenen Zellen durch den Anteil in der Kontrollprobe lebender Zellen dividiert wurde. Der programmierte Zelltod bildet somit den Anteil toter Zellen ab, der unmittelbar mit der angewandten Behandlung assoziiert ist.

B.2.5 Western Blot

Nach Versuchsende wurden die Zellen analog zum Prozedere bei der Weiterkultivierung gelöst und zentrifugiert. Der Überstand wurde aspiriert, die Pellets in PBS resuspendiert und erneut mit gleichen Einstellungen zentrifugiert. Nach einer weiteren Aspiration des Überstands wurden die Pellets in einem mit Isopropanol gefüllten Gefrierbehälter in einen -80 °C-Kühlschrank verbracht und so stufenweise heruntergekühlt. Dort wurden sie für höchstens zwei Wochen gelagert.

Anschließend wurden Ganzzelllysate extrahiert. Die aufgetauten Zellen wurden hierzu ein zweites Mal nach beschriebenem Prozedere mit 4 °C kaltem PBS gewaschen und zentrifugiert, der Überstand wurde aspiriert. Es folgte eine Resuspension in RIPA-Lysepuffer, wobei 30 µl Lysepuffer pro Lysat eines Wells einer 6-Well-Platte verwendet wurden. Die Proben wurden für 20 min in Eis auf einem Schwenker inkubiert und anschließend für 20 min bei 18.620 g und 4 °C in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert. Schließlich wurde der Überstand in ein neues Gefäß übertragen und das Pellet verworfen.

Die Proteinquantifizierung erfolgt mittels eines BCA-Assays nach Protokoll des Herstellers unter Verwendung einer 1:5-Verdünnung in 96-Well-Platten. Die Absorptionsmessung wurde hierbei an einem Nanodrop durchgeführt. Für die anschließende SDS-Gelelektrophorese wurden die Lysate in RPMI-Puffer so verdünnt, dass das Volumen aller Proben eines Gels zwischen 5 µl und 11 µl (15er-Kamm) bzw. 20 µl (10er-Kamm) lag. Anschließend wurde mit β -Mercaptoethanol versetzter Laemmli-Ladepuffer im Verhältnis 1:1 hinzugegeben. Das Gemisch wurde für 1 min bei 6.700 g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und für 5 min bei 95 °C ohne Schwenken in einem Thermoschüttler inkubiert.

Als Gele wurden mit Mini-Protean-Materialien selbst gegossene 10 %-ige Acrylamidgele verwendet. Hierbei betrug die Aushärtezeit des Trenngels 15 min und die des Sammelgels 10 min. Die Gele wurden nach Protokoll des Herstellers in eine mit Laufpuffer gefüllte Box eingespannt und mit Standard und Proben gefüllt. Die SDS-PAGE wurde am Powerpack mit 75–90 min Laufzeit bei konstant 40 mA durchgeführt.

Der sich anschließende Blot wurde als Semidry-Blot mit einer Nitrocellulosemembran am Gerät TransBlot Turbo erstellt. Hierfür wurden Gel, Membran und Extra Thick Blot Filter Paper für 15 min in gekühltem Transferpuffer inkubiert. Anschließend wurde der

Blot nach Protokoll des Herstellers mit der Geräteeinstellung 25 V, 1 A, 30 min durchgeführt.

Zur Überprüfung des Transfers wurde eine Proteinübersichtsfärbung mit Ponceaurot durchgeführt. Die Membran wurde hierzu vollständig für 1 min in die Färbelösung eingetaucht und anschließend mehrfach mit VE-Wasser gewaschen. Die Dokumentation erfolgte als kolorimetrisches Bild im Imager.

Das Blocken wurde für 60 min bei Raumtemperatur auf einem Schwenker in Blockmilch aus 5 % Milchpulver in TBS-T 0,5 % durchgeführt. Anschließend wurde die Membran mit 5 ml TBS-T 0,5 % für 5 sec gewaschen. Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte in 5 ml Blockmilch (entweder Albumin V 3 % in TBS-T 0,5 % oder Milchpulver 5 % in TBS-T 0,5 %, siehe Tabelle in B.1.4) bei 4 °C über Nacht auf dem Schwenker. Am Folgetag erfolgten zunächst drei Waschschrte von 5 min mit je 5 ml TBS-T 0,5 % bei Zimmertemperatur auf dem Schwenker. Anschließend wurde 60 min mit einem Zweitantikörper in Milchpulver 5 %/TBS-T 0,5 % bei Raumtemperatur auf dem Schwenker inkubiert. Es folgten weitere drei Waschschrte mit TBS-T 0,5 % bei Raumtemperatur auf dem Schwenker. Nach Protokoll des Herstellers wurde die Membran nun mit ECL-Reagenz überschichtet und kolorimetrisch sowie chemiluminiszent im Imager fotografiert. Falls eine weitere Chemiluminiszenzfärbung nachfolgen sollte, wurden die Antikörperbindungen durch 15-minütiges Inkubieren in Stripping Buffer und zweimaliges anschließendes 15-minütiges Waschen in TBS-T 0,5 % bei Raumtemperatur auf dem Schwenker entfernt.

Für jeden Zielparmeter wurde für die jeweiligen Behandlungen der Zellen einer Nabelschnurprobe ein Gel erstellt. In Abhängigkeit der zu analysierenden Proteine wurde die Membran ein- oder zweifach gestrippt. Für phospho-Akt und total Akt wurde hingegen stets zwei Gele bzw. Membranen erstellt: Eine Membran wurde auf phospho-Akt und β -Actin, die andere Membran auf total Akt und β -Actin gefärbt. Wiederholungen von Western Blots derselben Proben wurden nicht in die Auswertung einbezogen.

Bildverarbeitung und Quantifizierung erfolgten mit der dem Imager zugehörigen Software ImageLab. Zur Quantifizierung wurde zunächst der Normalisierungsfaktor bestimmt, in dem das absolute Volumen der Bande des Housekeepers β -Actin mit stärkstem Signal als 1 gesetzt und die Volumina der weiteren Proben relativ dazu berechnet wurden. Anschließend wurde das absolute Volumen des Ziel-Antikörpers

durch den Normalisierungsfaktor dividiert. Für phospho-Akt wurde in einem analogen Zwischenschritt das auf das β -Actin normalisierte Volumen auf das ebenfalls bereits auf β -Actin normalisierte Volumen von total-Akt erneut normalisiert. Das normalisierte Volumen der jeweiligen unbehandelten Kontrollprobe wurde nun als 1 gesetzt, sodass normalisierte relative Volumina für die statistische Auswertung bereitstanden.

B.2.6 Statistik

Die statistische Analyse basierte je nach verwendeter Methodik auf den folgenden Zielparametern:

- Lichtmikroskopie: Zellzahl, Zellexpansionsindex, Anteil angefärbter Zellen
- Durchflusszytometrie: programmierter Zelltod
- Western Blot: normalisiertes relatives Bandenvolumen

Die Berechnung der jeweiligen Zielparameter erfolgte wie in den vorangegangenen Abschnitten erläutert. Zahlenwerte wurden auf vier Nachkommastellen gerundet. Zur Prüfung auf statistisch signifikante Unterschiede wurden stets zwei Interventionsgruppen verglichen. Es wurden zweiseitige, gepaarte t-Tests auf einem Signifikanzniveau von 5 % durchgeführt. Zudem wurden Boxplots zur Visualisierung erstellt. Als Höchstgrenze für die Länge der Antennen wurde nach Tukey der 1,5-fache Interquartilsabstand gewählt. Für ausgewählte t-Tests wurden oberhalb von Box und Antenne die p-Werte ergänzt. Berechnung der jeweiligen p-Werte und Erzeugung der Boxplots erfolgten in R.

B.3 Ethikvotum

Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Untersuchungen wurden im Rahmen der unter dem Titel „Charakterisierung von Veränderungen im Trachealsekret Frühgeborener (PROTECT-AIRR)“ durchgeführten Studie erstmalig am 4. September 2012 von der Ethik-Kommission am Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität unter dem Aktenzeichen 135/12 bewilligt. Die Ausweitung auf mesenchymale Stammzellen aus Nabelschnüren erfolgte mit dem Amendment V, welches am 8. Juli 2020 bewilligt wurde. Alle Untersuchungen erfolgten im Einklang mit der Deklaration von Helsinki. Die verwendeten mesenchymalen Stammzellen stammen ausschließlich von Neugeborenen, deren Sorgeberechtigte der Verwendung der Nabelschnur für die Zwecke der Studie nach ärztlicher Aufklärung schriftlich zustimmten.

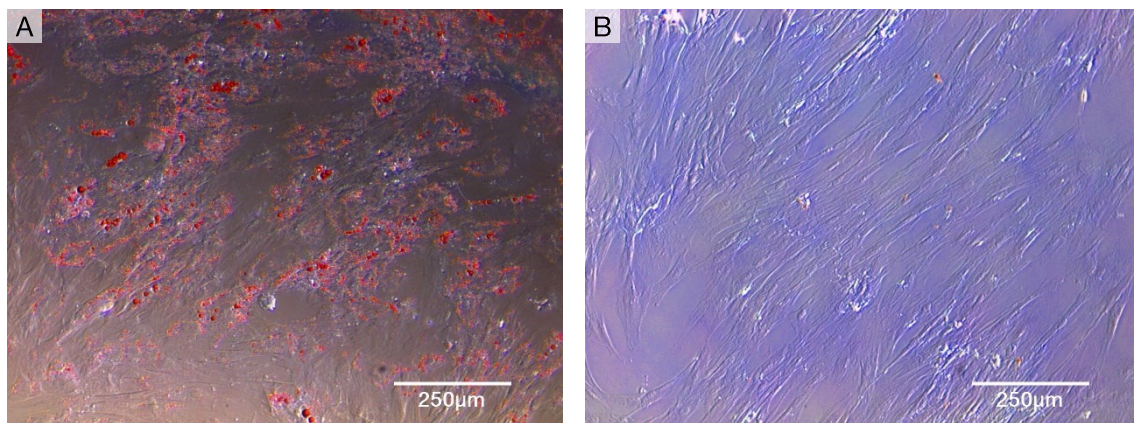
C. ERGEBNISSE

C.1 Etablierung der Zellkultur

C.1.1 Differenzierung zu Adipozyten und Osteoblasten

Nach adipogener Differenzierung wurde für den Nachweis von Lipidvakuolen eine Ölrotfärbung verwendet und lichtmikroskopisch dokumentiert (Abbildung 10). Nach osteogener Differenzierung wurde für den Nachweis von Kalziumreservoirs eine Alizarinrotfärbung verwendet und ebenfalls lichtmikroskopisch dokumentiert (Abbildung 11). Die undifferenzierten Kontrollproben blieben jeweils ohne entsprechende Rotfärbung. Die nach den Kriterien der ISCGT für MSC erforderliche Differenzierbarkeit wurde somit nachgewiesen.

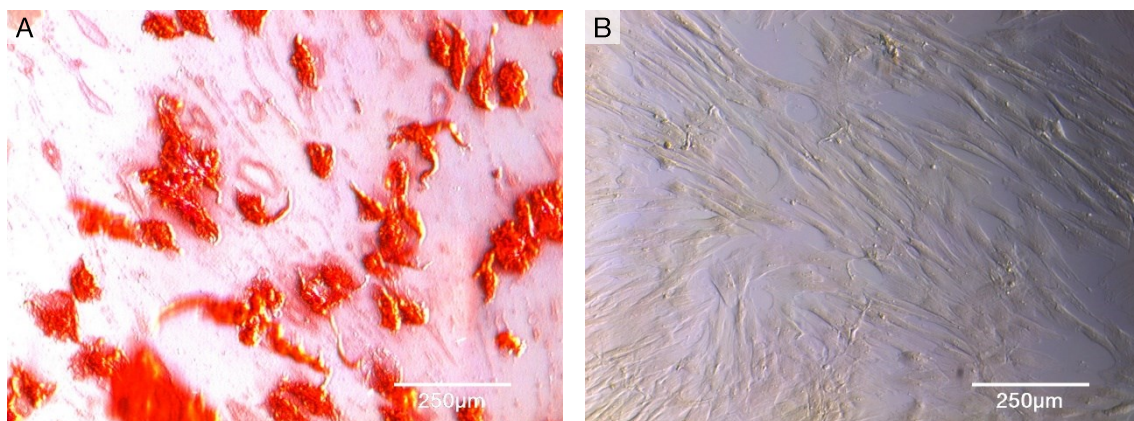
Abbildung 10: Adipogene Differenzierung



A: Repräsentativer Nachweis von Adipozyten; Lipidvakuolen in rot; lichtmikroskopische Färbung mit Ölrot; für n=3 wurden für Zellen aus Passage 1 und 3 jeweils 4 Bildausschnitte fotografiert

B: Negativkontrolle; für n=1 wurden 4 Bildausschnitte fotografiert

Abbildung 11: Osteogene Differenzierung

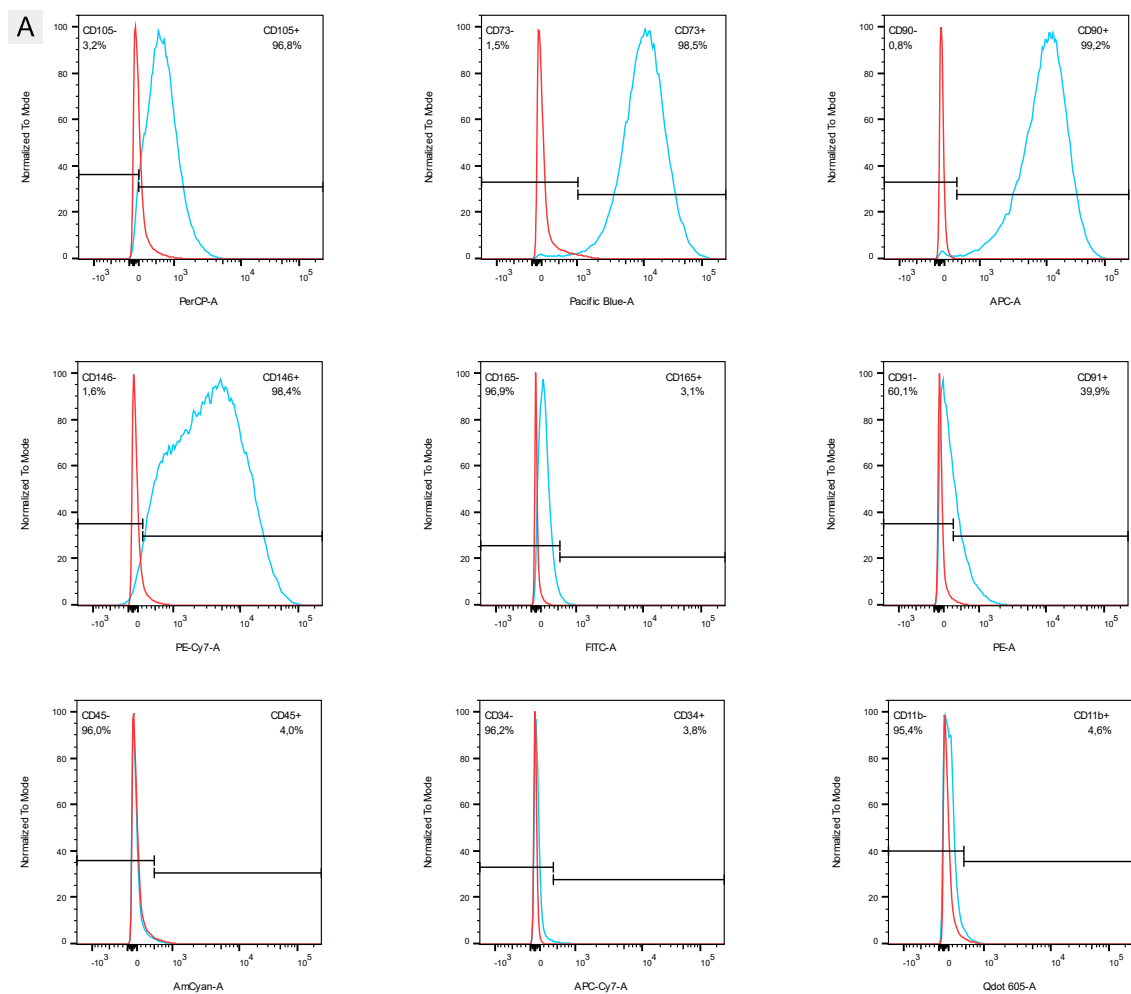


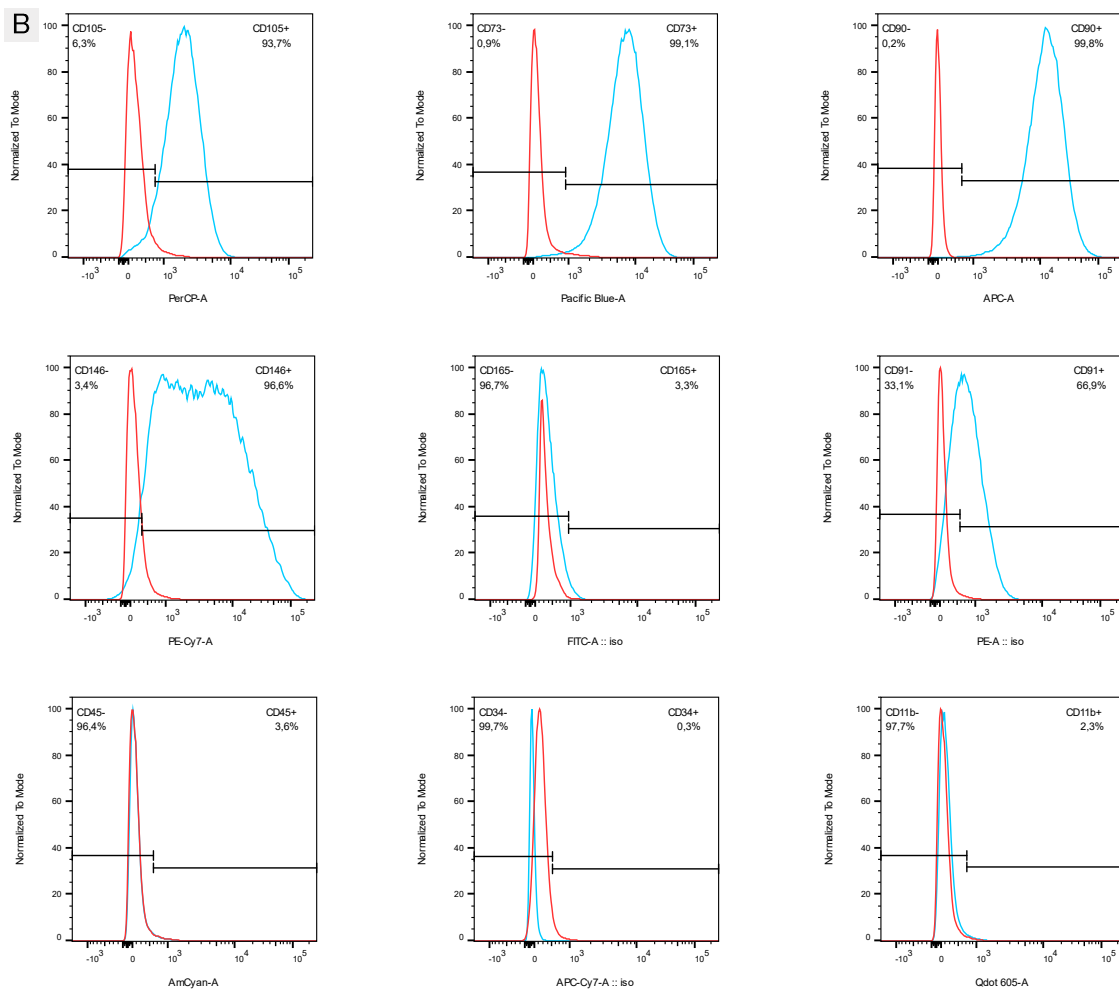
A: Repräsentativer Nachweis von Osteoblasten; Kalziumreservoirs in rot; lichtmikroskopische Färbung mit Alizarinrot; für n=3 wurden für Zellen aus Passage 1 und 3 jeweils 4 Bildausschnitte fotografiert
 B: Negativkontrolle; für n=1 wurden 4 Bildausschnitte fotografiert

C.1.2 Phänotypisierung

In jeweils fünf Tubes wurden die Zellen auf das Vorhandensein der Oberflächenmarker CD105, CD73, CD90, CD146, CD165, CD91, CD45, CD34 und CD11b untersucht. Konsistent positiv nachweisbar waren CD105, CD73, CD90 und CD146; schwach positiv nachweisbar waren CD165 und CD91; in keinem Fall nachweisbar waren CD45, CD34 und CD11b. Die Nachweisbarkeit bzw. Abwesenheit der untersuchten Marker steht im Einklang mit den Kriterien der ISCGT für MSC. Repräsentative Messergebnisse für je eine Kultur finden sich für Passage 1 und Passage 3 in Abbildung 12.

Abbildung 12: Phänotypisierung





A: Repräsentative Plots für Passage 1; n=4

B: Repräsentative Plots für Passage 3; n=2

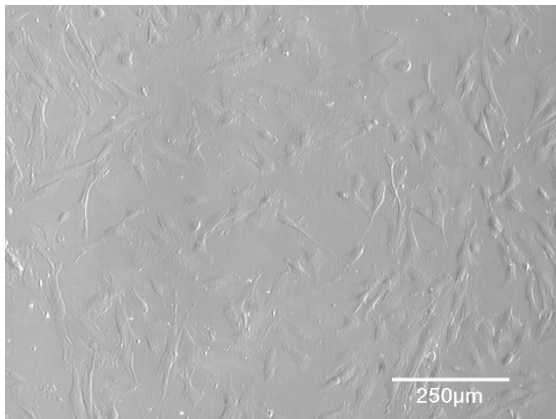
Messung im Durchflusszytometer; blau: gefärbte Probe; rot: ungefärbte Kontrolle; schwarze Balken: Grenzwerte

C.2 Phänotypveränderung unter rhythmischer Dehnung und Hyperoxie

C.2.1 Zellmorphologie

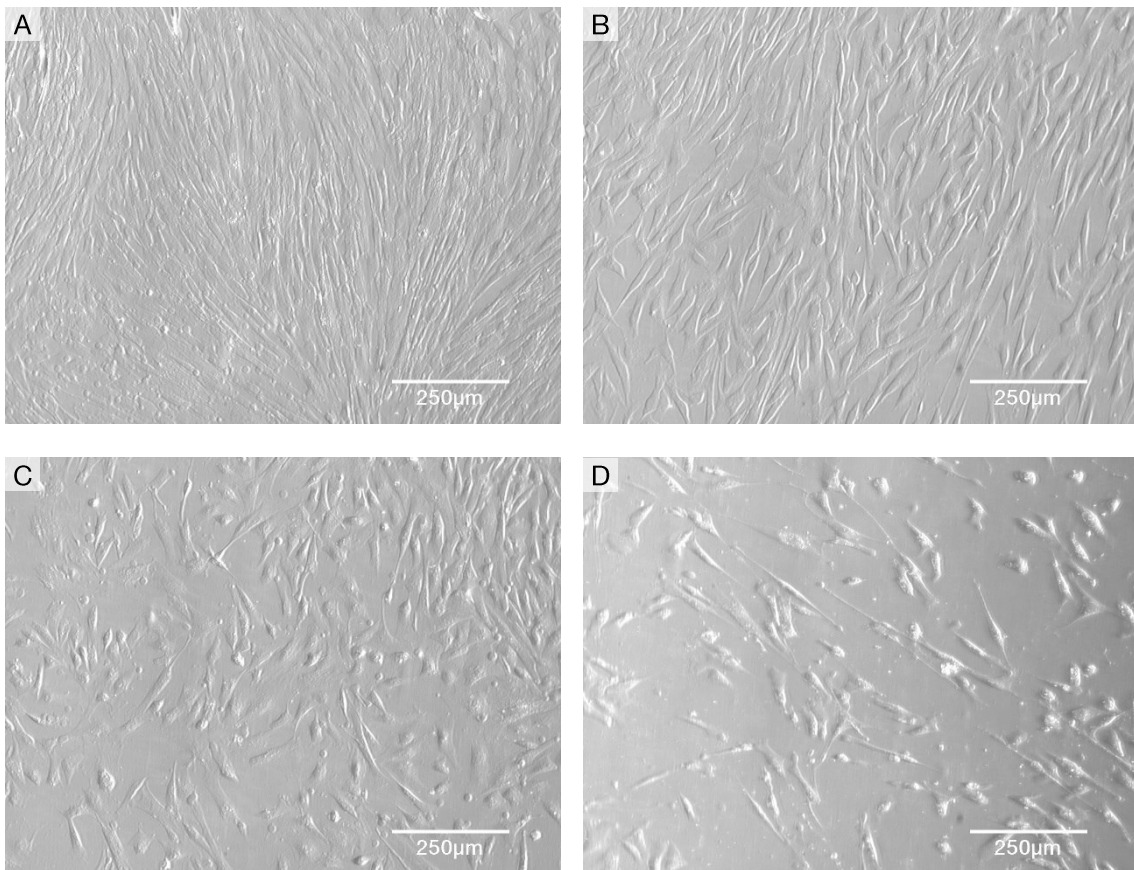
In der lichtmikroskopischen Dokumentation nach Versuchsende (Abbildung 13, Abbildung 14) zeigte sich im Vergleich zum Versuchsbeginn die stärkste Zellteilungsrate in der Kontrollgruppe. In den drei Interventionsgruppen CMS, HOX und CMS+HOX ließen sich in unterschiedlichem Ausmaß eine ubiquitäre Rarefizierung und eine Vergrößerung der Zellen beobachten. HOX hatte hierbei einen stärkeren Effekt als CMS; CMS+HOX hatten wiederum einen stärkeren Effekt als HOX allein. Die mit HOX allein und mit CMS+HOX behandelten Zellen zeigten sich zudem phänotypisch flacher. Letztere wiesen darüber hinaus eine Verlängerung der Zellfortsätze auf.

Abbildung 13: Zellmorphologie bei Versuchsbeginn



Repräsentatives lichtmikroskopisches Bild; für n=2 wurden jeweils 4 Bildausschnitte fotografiert

Abbildung 14: Zellmorphologie nach Interventionsende



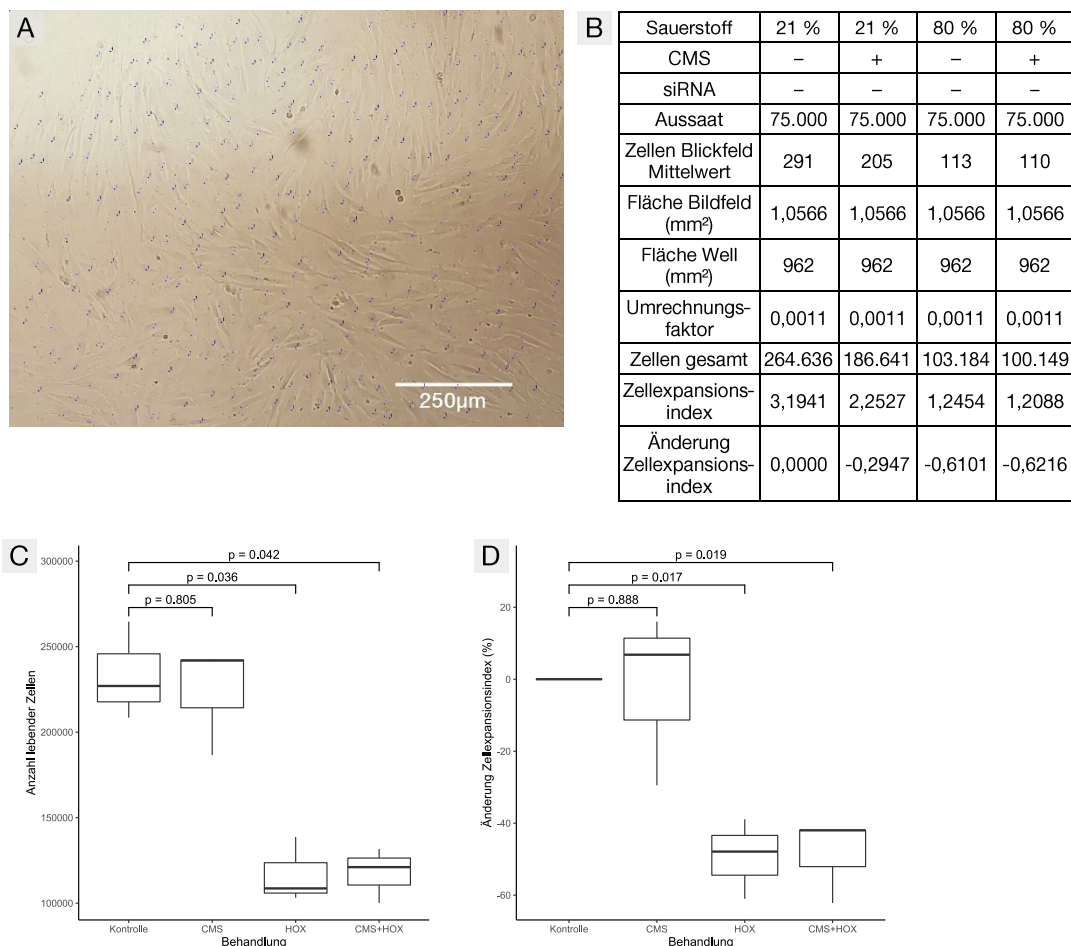
A: Kontrolle; B: CMS; C: HOX; D: CMS+HOX

Rarefizierung und Vergrößerung der Zellen in den Interventionsgruppen; repräsentative lichtmikroskopische Bilder; für n=2 wurden jeweils 4 Bildausschnitte fotografiert

C.2.2 Zellzahl und Zellexpansionsindex

Im Anschluss an die lichtmikroskopische Dokumentation erfolgte eine manuelle Auszählung. Um das Zellwachstum zu quantifizieren, wurde die so ermittelte Zellzahl ins Verhältnis zur initialen Zellzahl gesetzt und so der Zellexpansionsindex bestimmt. Die Änderung des Zellexpansionsindex wurde schließlich bestimmt, in dem der Zellexpansionsindex der jeweiligen Interventionsgruppe ins Verhältnis zum Zellexpansionsindex der Kontrollprobe gesetzt wurde. Die am Versuchsende bereits lichtmikroskopisch gesehene Rarefizierung konnte so für HOX und CMS+HOX in Form einer verringerten Zellzahl objektiviert werden ($p=0,036$; $p=0,042$). Auch der Zellexpansionsindex war für HOX und CMS+HOX signifikant verringert ($p=0,017$; $p=0,019$).

Abbildung 15: Zellzahl und Zellexpansionsindex



A: Repräsentatives lichtmikroskopisches Bild mit Zählmarkierung

B: Repräsentative Quantifizierung eines lichtmikroskopischen Bildes

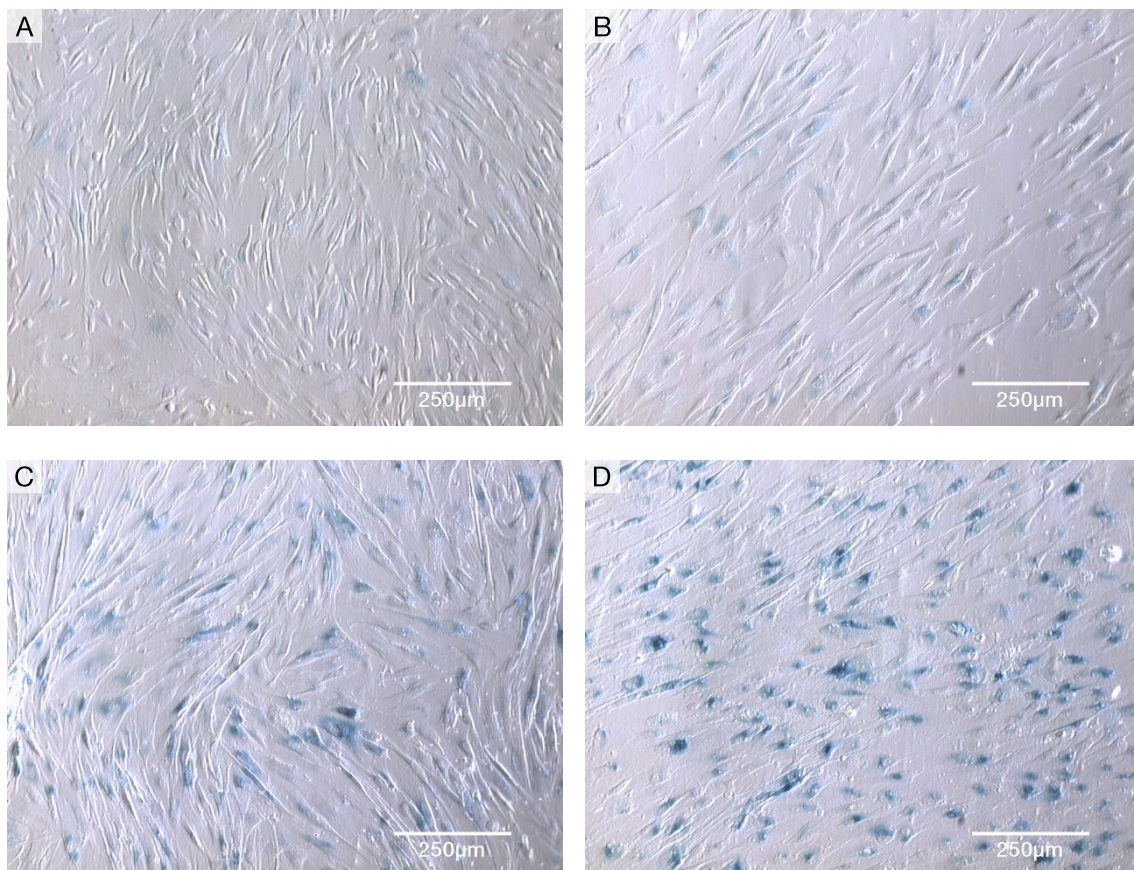
C: Verringerte Anzahl lebender Zellen unter HOX und unter CMS+HOX; statistische Auswertung mit gepaarten t-Tests; $n=3$

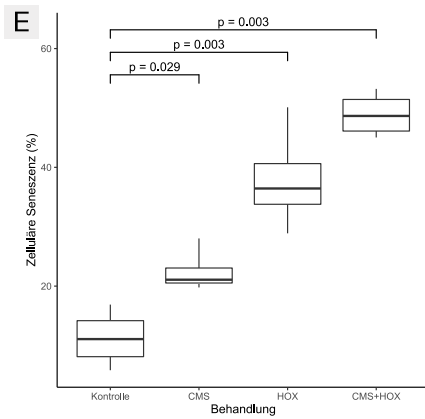
D: Verringerter Zellexpansionsindex unter HOX und unter CMS+HOX; statistische Auswertung mit gepaarten t-Tests; n=3

C.2.3 Zelluläre Seneszenz

Die nach Versuchsende durchgeführte Seneszenzfärbung auf β -Galaktosidase (Abbildung 16) zeigte ähnliche Ergebnisse: Die Kontrollgruppe wies die geringste Seneszenz auf. In den drei Interventionsgruppen CMS, HOX und CMS+HOX fand sich ein ansteigender Anteil seneszenten Zellen. HOX hatte hierbei einen stärkeren Effekt als CMS; CMS+HOX hatten wiederum einen stärkeren Effekt als HOX allein. Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren die Unterschiede für alle Behandlungen statistisch signifikant ($p=0,029$; $p=0,003$ und $p=0,003$ in der Reihenfolge Kontrolle vs. CMS; vs. HOX und vs. CMS+HOX).

Abbildung 16: Zelluläre Seneszenz nach Interventionsende





A: Kontrolle; B: CMS; C: HOX; D: CMS+HOX

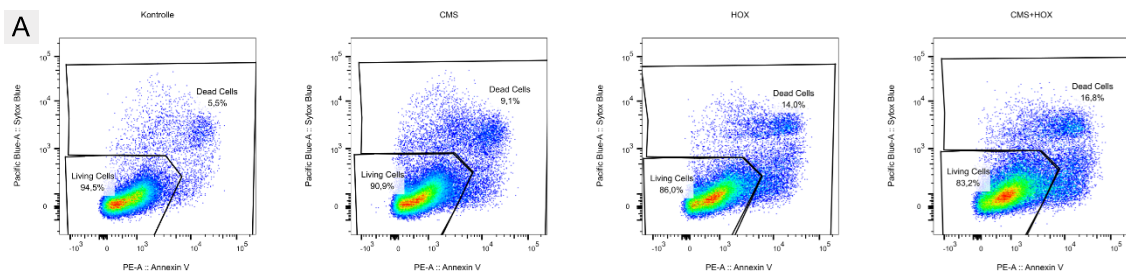
Ansteigende zelluläre Seneszenz in den Interventionsgruppen; β -Galaktosidase in blau; repräsentative lichtmikroskopische Färbung; für n=4 wurden jeweils 4 Bildausschnitte fotografiert

E: Ansteigende zelluläre Seneszenz in den Interventionsgruppen; statistische Auswertung der Färbung auf β -Galaktosidase mit gepaarten t-Tests; n=4

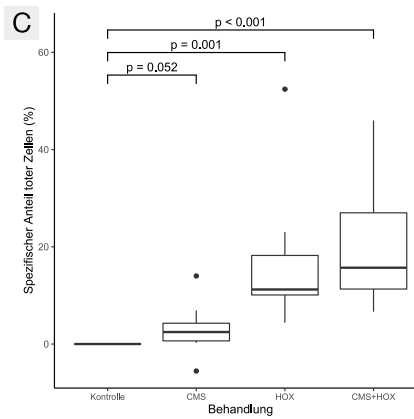
C.2.4 Programmierter Zelltod

Die lichtmikroskopisch beobachtete Phänotypveränderung unter rhythmischer Dehnung und Hyperoxie wurde anschließend durchflusszytometrisch gemessen. Hierzu wurde der programmierte Zelltod nach 72-stündigem Versuch für die Kontrollgruppe und die bekannten Interventionsgruppen CMS, HOX und CMS+HOX bestimmt (Abbildung 17). Es ergab sich bei p-Werten von $p=0,052$; $p=0,001$ und $p<0,001$ eine statistische Signifikanz für die Interventionsgruppen HOX und CMS+HOX. Diese folgten dem bereits bekannten Muster, dass HOX und insbesondere CMS+HOX die stärkste Erhöhung des programmierten Zelltods induzieren. Der durchflusszytometrisch messbare programmierte Zelltod steigt folglich unter zunehmendem Zellstress ebenfalls in zunehmendem Maße an.

Abbildung 17: Zellexpansionsindex und programmierter Zelltod



| B | Sauerstoff | 21 % | 21 % | 80 % | 80 % |
|---|--------------------------|---------|---------|---------|---------|
| | CMS | - | + | - | + |
| | siRNA | - | - | - | - |
| | Aussaat | 150.000 | 150.000 | 150.000 | 150.000 |
| | Tote Zellen Anteil | 0,0585 | 0,0940 | 0,1024 | 0,1770 |
| | Tote Zellen Spez. Anteil | 0,0000 | 0,0355 | 0,0439 | 0,1186 |



A: Repräsentative durchflusszytometrische Messung; n=12; vollständige Messung in Anlage 1

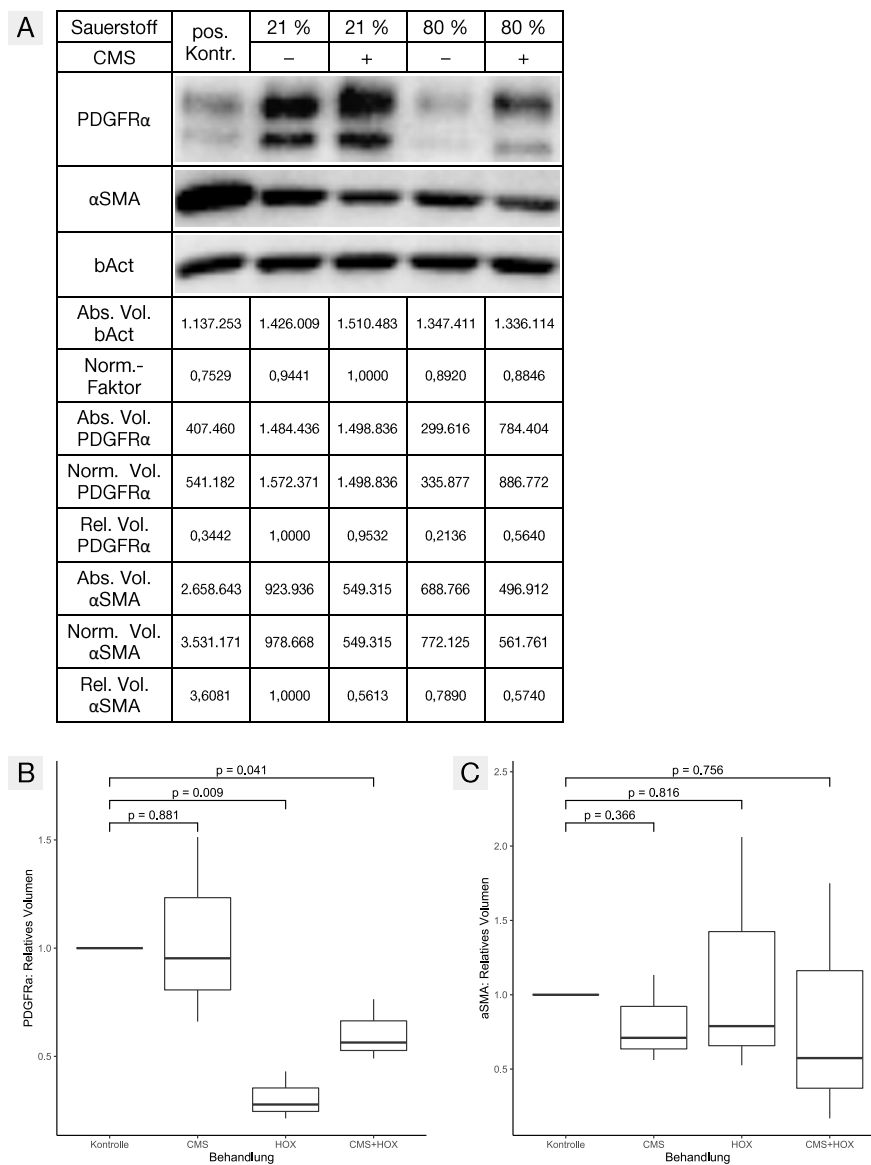
B: Repräsentative Quantifizierung einer durchflusszytometrischen Messung; n=12

C: Erhöhter programmierter Zelltod in den Interventionsgruppen; statistische Auswertung der Messung im Durchflusszytometer mit gepaarten t-Tests; n=12

C.2.5 PDGFR α und α SMA

In Western Blots wurde zunächst untersucht, inwiefern sich die Expression von PDGFR α und α SMA in den Interventionsgruppen nach 72 h verändert (Abbildung 18). Für PDGFR α wiesen mit HOX oder mit CMS+HOX behandelte Zellen eine signifikant geringere Expression auf als unbehandelte Zellen ($p=0,009$; $p=0,041$). Dies steht im Einklang mit der für mesenchymale Stammzellen spezifischen PDGFR α -Positivität (Farahani und Xaymardan 2015) und dem Verlust von Stammzellcharakteristika unter Sauerstoffexposition (Möbius et al. 2019). Für α SMA zeigten sich für die untersuchten Zielparameter keine statistisch signifikanten Effekte. α SMA war im gewählten Versuchsaufbau daher nicht als Biomarker für die Schädigung von MSC geeignet.

Abbildung 18: Expression von PDGFR α und α SMA



A: Repräsentative Quantifizierung eines Western Blots; n=3; vollständiger Western Blot in Anlage 2

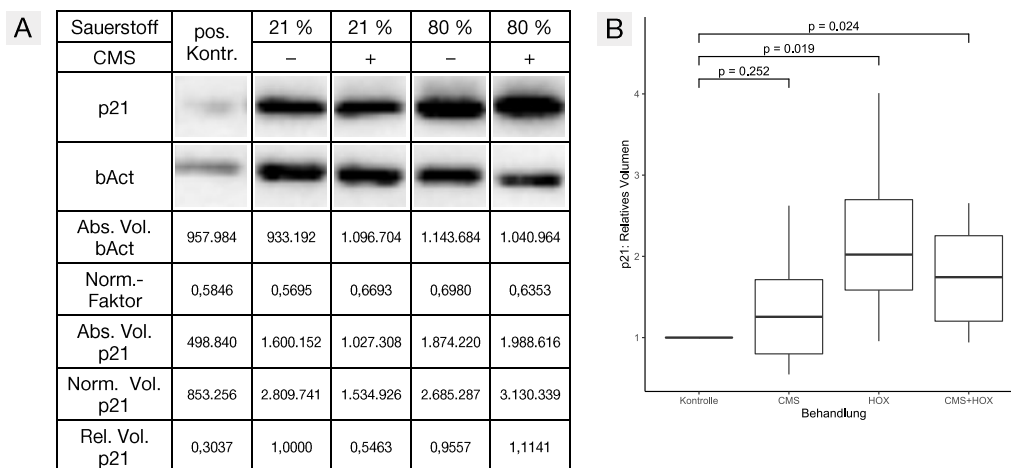
B: Verringerte Expression von PDGFR α unter HOX und unter CMS+HOX; statistische Auswertung von Western Blots mit gepaarten t-Tests; n=3

C: Keine relevanten Veränderungen der Expression von α SMA; statistische Auswertung von Western Blots mit gepaarten t-Tests; n=3

C.2.6 p21

Im nächsten Schritt wurde die Expression von p21 in Western Blots bestimmt (Abbildung 19). Es zeigte sich eine regelhafte Hochregulation nach 24 h unter HOX sowie unter CMS+HOX ($p=0,019$; $p=0,024$). Die zuvor nachgewiesene Verringerung der Zellzahl nach Anwendung von Stressoren steht somit im Zusammenhang mit p21.

Abbildung 19: Expression von p21



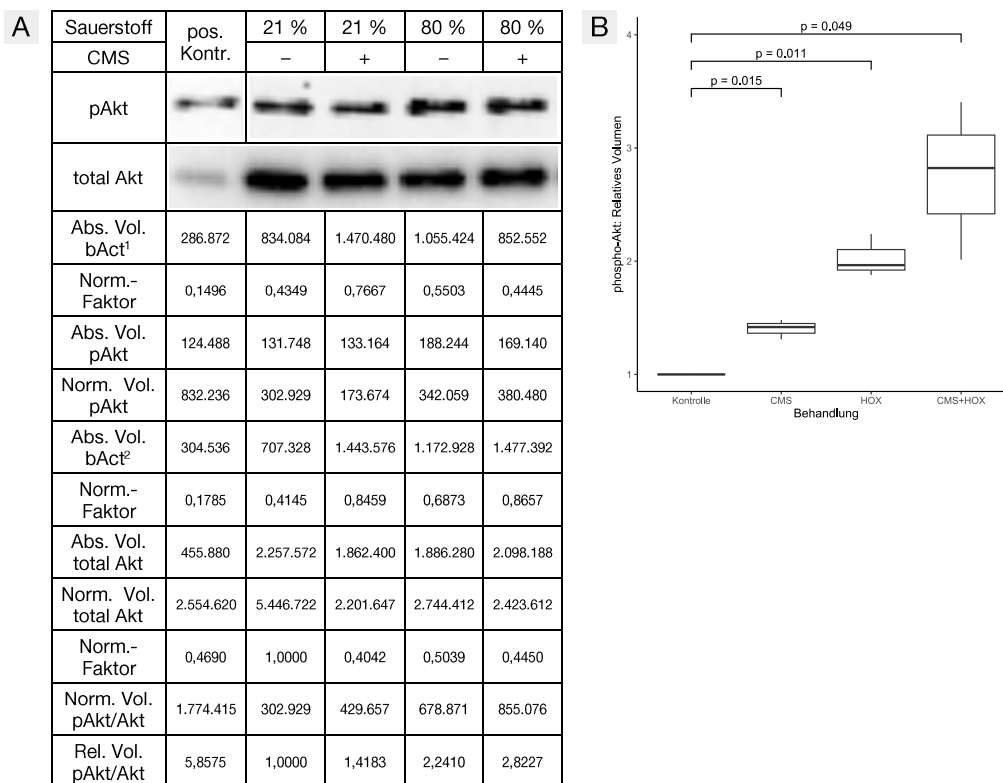
A: Repräsentative Quantifizierung eines Western Blots; n=7; vollständiger Western Blot in Anlage 3

B: Erhöhte Expression von p21 unter HOX und unter CMS+HOX; statistische Auswertung von Western Blots mit gepaarten t-Tests; n=7

C.2.7 phospho-Akt

Schließlich erfolgte die Bestimmung von phospho-Akt in Western Blots (Abbildung 20). Unter den angewandten Stressoren zeigten sich nach 12 h statistisch signifikante Erhöhungen von phospho-Akt. Diese waren für CMS allein am schwächsten, für HOX etwas stärker und für CMS+HOX am stärksten ausgeprägt (p=0,015; p=0,011; p=0,049). Es wurde somit nachgewiesen, dass die unter Zellstress auftretende Verringerung der Zellzahl mit einer erhöhten Aktivierung des PI3K-/Akt-Signalwegs einhergeht.

Abbildung 20: Expression von phospho-Akt



A: Repräsentative Quantifizierung eines Western Blots; für total Akt und das zugehörige β -Actin wurde stets ein zusätzliches Gel erstellt (^{1,2}); im gezeigten Beispiel abweichende Position der Ladekontrolle; n=3; vollständiger Western Blot in Anlage 4

B: Erhöhte Expression von phospho-Akt unter CMS, HOX und CMS+HOX; statistische Auswertung von Western Blots mit gepaarten t-Tests; n=3

C.3 Zugrundeliegende Signalwege der Phänotypveränderung

C.3.1 p21 unter p21-Inhibition

Erster Schritt in der Analyse der der Phänotypveränderung zugrundeliegenden Signalwegen war die Betrachtung von p21. Da sich in Vorversuchen eine regelhafte Hochregulation von p21 unter CMS und HOX nach 24 Stunden gezeigt hatte (Abbildung 19), wurde ein Knockout von p21 mittels siRNA etabliert. Für die je vier Gruppen Kontrolle, CMS, HOX und CMS+HOX wurden dann das Expressionsmuster von p21 im Western Blot (Abbildung 21) sowie der programmierte Zelltod im Durchflusszytometer (Abbildung 22) in Proben ohne siRNA, mit mock-siRNA und mit p21-siRNA untersucht.

Bei nicht transfizierten Proben hatte sich eine statistisch signifikante Hochregulation von p21 unter HOX sowie unter CMS+HOX gezeigt. Bei mit mock-siRNA transfizierten Proben stellten sich diese Effekte analog ein (p=0,009; p=0,006). Für die mit p21-siRNA

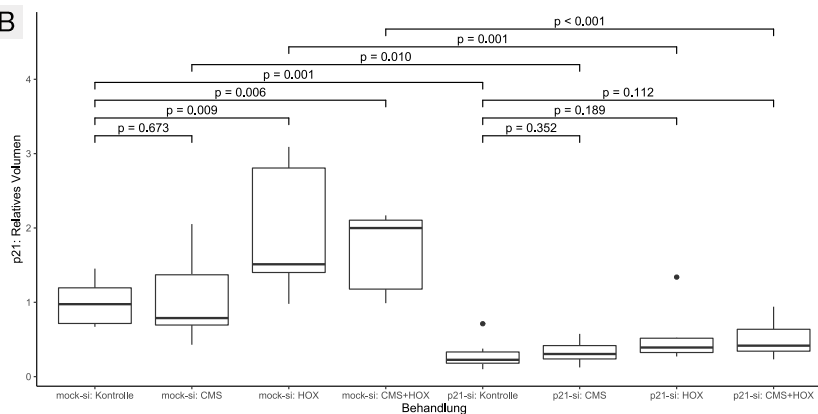
behandelten Proben wurde zunächst die Knockdowneffizienz geprüft, in dem die Proteinexpression mit der jeweils gleich gestressten, jedoch mit mock-siRNA transfizierten Probe verglichen wurde. In allen vier Fällen war die p21-Expression unter p21-Inhibition signifikant verringert, durchschnittlich um rund 75 % ($p=0,001$; $p=0,010$; $p=0,001$; $p<0,001$). Dieses Vorgehen wurde gewählt, um etwaige Änderungen in der Proteinexpression, die mit dem generellen Verfahren und den verwendeten Reagenzien assoziiert sind, bestmöglich auszuschließen.

Abbildung 21: Expression von p21 unter p21-Inhibition

A

| Sauerstoff | pos. Kontr. | 21 % | 21 % | 21 % | 21 % | 21 % | 21 % | 80 % | 80 % | 80 % | 80 % | 80 % | 80 % | |
|----------------|-------------|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| CMS | | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | + | + | |
| siRNA | | - | mock | p21 | - | mock | p21 | - | mock | p21 | - | mock | p21 | |
| p21 | | | | | | | | | | | | | | |
| bAct | | | | | | | | | | | | | | |
| Abs. Vol. bAct | | 957.984 | 933.192 | 970.788 | 1.246.272 | 1.096.704 | 1.349.484 | 1.638.612 | 1.143.684 | 1.055.508 | 912.984 | 1.040.964 | 1.330.368 | 670.620 |
| Norm.-Faktor | | 0,5846 | 0,5695 | 0,5924 | 0,7606 | 0,6693 | 0,8236 | 1,0000 | 0,6980 | 0,6441 | 0,5572 | 0,6353 | 0,8119 | 0,4093 |
| Abs. Vol. p21 | | 498.840 | 1.600.152 | 1.115.808 | 213.828 | 1.027.308 | 992.628 | 348.948 | 1.874.220 | 1.772.160 | 570.648 | 1.988.616 | 2.254.764 | 479.424 |
| Norm. Vol. p21 | | 853.256 | 2.809.741 | 1.883.394 | 281.143 | 1.534.926 | 1.205.299 | 348.948 | 2.685.287 | 2.751.171 | 1.024.192 | 3.130.339 | 2.777.189 | 1.171.438 |
| Rel. Vol. p21 | | 0,3037 | 1,0000 | 0,6703 | 0,1001 | 0,5463 | 0,4290 | 0,1242 | 0,9557 | 0,9792 | 0,3645 | 1,1141 | 0,9884 | 0,4169 |

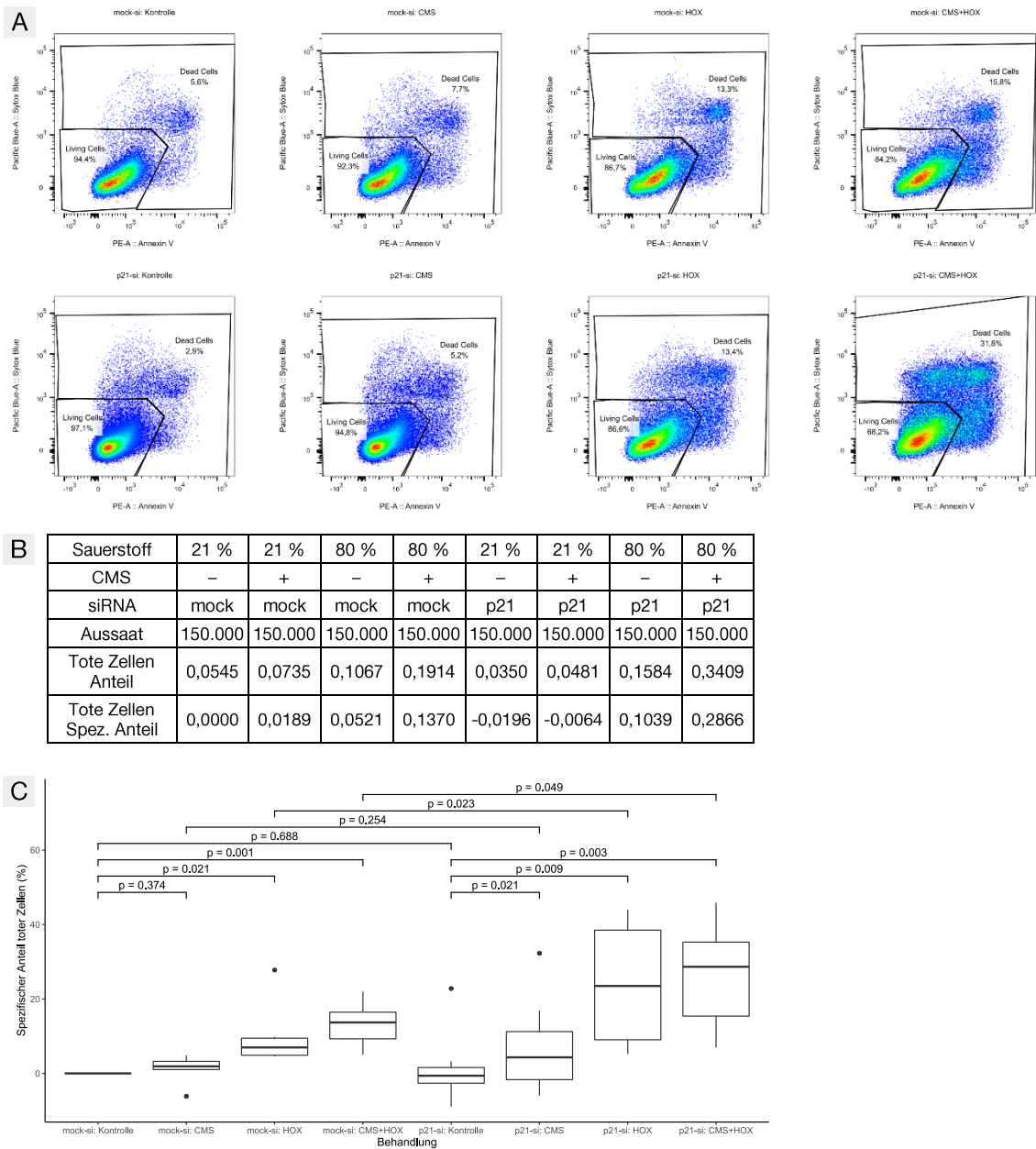
B



A: Repräsentative Quantifizierung eines Western Blots; $n=7$; vollständiger Western Blot in Anlage 3

B: Aktivierungsmuster von p21 unter mock-siRNA unverändert im Vergleich zu vorherigen Untersuchungen (Abbildung 19); Inhibition von p21 unter p21-siRNA um rund 75 %; ausbleibende Erhöhung der Expression von p21 unter p21-siRNA; statistische Auswertung von Western Blots mit gepaarten t-Tests; $n=7$

Abbildung 22: Zellzahl und programmierter Zelltod unter p21-Inhibition



A: Repräsentative durchflusszytometrische Messung; n=7; vollständige Messung in Anlage 1

B: Repräsentative Quantifizierung einer durchflusszytometrischen Messung; n=7

C: Erhöhung des programmierten Zelltods bei Behandlung mit HOX oder CMS+HOX durch p21-Inhibition im Vergleich zur nicht inhibierten Probe; statistische Auswertung von durchflusszytometrischen Messungen mit gepaarten t-Tests; n=7

Anschließend wurde untersucht, inwiefern die p21-siRNA auch eine erhöhte p21-Expression unter Zellstress verhindert. Im geprüften Versuchssetting waren keine statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich zwischen der mit p21-siRNA transfizierten Kontrolle und den analog transfizierten Proben, die CMS, HOX und

CMS+HOX ausgesetzt waren, nachweisbar ($p=0,352$; $p=0,189$; $p=0,112$). Die Hochregulation von p21 wurde somit zuverlässig unterbunden.

Im nächsten Schritt wurden die Auswirkungen der p21-Inhibition auf den programmierten Zelltod durchflusszytometrisch untersucht. Analog zur Analyse der Western Blots wurde zunächst sichergestellt, dass die Transfektion den Versuchsaufbau nicht grundlegend beeinflusst. Hierzu wurde wieder mit mock-siRNA transfiziert. Dementsprechend behandelte Zellen zeigten unter zunehmendem Stress ähnliche Tendenzen eines erhöhten programmierten Zelltods. Statistisch signifikant war hierbei die Erhöhung des programmierten Zelltods unter HOX ($p=0,021$) und unter CMS+HOX ($p=0,001$), jeweils im Vergleich zur Kontrolle. Es ergab sich folglich kein Anhalt für signifikante Veränderungen durch das Verfahren der Transfektion als solches.

Die vorbekannte Erhöhung des programmierten Zelltods in den Interventionsgruppen zeigte sich auch unter p21-siRNA ($p=0,021$; $p=0,009$; $p=0,003$ für CMS, HOX und CMS+HOX). Zudem bewirkte die p21-siRNA bei den gleich gestressten Interventionsgruppen HOX und CMS+HOX im Vergleich zur mock-siRNA eine signifikant verstärkte Erhöhung des programmierten Zelltods ($p=0,023$; $p=0,049$). Die Ausschaltung des Zellzyklusmodulators p21 führte folglich wie erwartet bei ohnehin gestressten Zellen zu einer weiteren Erhöhung des programmierten Zelltods.

C.3.2 phospho-Akt unter Akt-Inhibition

Zweiter Schritt in der Analyse der der Phänotypveränderung zugrundeliegenden Signalwege war die Betrachtung von phospho-Akt als Teil des PI3K/Akt-Signalwegs oberhalb von p21. Für phospho-Akt und phospho-Erk ist eine regulierende Wirkung auf p21 bekannt (Nicholson und Anderson 2002). Die Hochregulation von phospho-Akt nach 12 Stunden war in Vorversuchen der stärkste beobachtbare Effekt (Abbildung 20), so dass ein biochemischer Inhibitor etabliert wurde (Abbildung 23). Anschließend wurden dessen Effekte auf p21 untersucht.

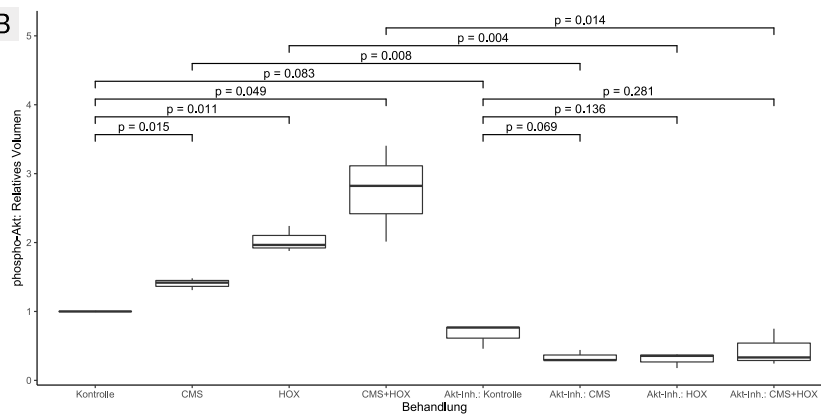
Für die mit Akt-Inhibitor behandelten Proben wurde zunächst die Effizienz der Inhibition geprüft, in dem die Expression von phospho-Akt mit der jeweils gleich gestressten, jedoch nicht inhibierten Probe verglichen wurde. Für die drei Probenpaare zu CMS, HOX und CMS+HOX war diese signifikant verringert, durchschnittlich um rund 70 % ($p=0,008$; $p=0,004$; $p=0,014$).

Abbildung 23: Expression von phospho-Akt unter Akt-Inhibition

A

| Sauerstoff | pos. Kontr. | 21 % | 21 % | 80 % | 80 % | 21 % | 21 % | 80 % | 80 % | 21 % | 21 % | 80 % | 80 % |
|-----------------------------|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| CMS | | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + |
| Akt-Inh. | | - | - | - | - | 1 µM | 1 µM | 1 µM | 1 µM | 3 µM | 3 µM | 3 µM | 3 µM |
| pAkt | | | | | | | | | | | | | |
| total Akt | | | | | | | | | | | | | |
| Abs. Vol. bAct ¹ | 286.872 | 834.084 | 1.470.480 | 1.055.424 | 852.552 | 915.060 | 984.084 | 933.756 | 910.296 | 810.672 | 1.485.144 | 1.917.816 | 1.344.480 |
| Norm.-Faktor | 0,1496 | 0,4349 | 0,7667 | 0,5503 | 0,4445 | 0,4771 | 0,5131 | 0,4869 | 0,4747 | 0,4227 | 0,7744 | 1,0000 | 0,7010 |
| Abs. Vol. pAkt | 124.488 | 131.748 | 133.164 | 188.244 | 169.140 | 128.676 | 73.056 | 80.700 | 100.260 | 40.560 | 38.232 | 71.136 | 40.824 |
| Norm. Vol. pAkt | 832.236 | 302.929 | 173.674 | 342.059 | 380.480 | 269.684 | 142.374 | 165.748 | 211.228 | 95.953 | 49.370 | 71.136 | 58.233 |
| Abs. Vol. bAct ² | 304.536 | 707.328 | 1.443.576 | 1.172.928 | 1.477.392 | 829.392 | 1.706.532 | 1.289.328 | 873.492 | 813.144 | 1.296.072 | 1.084.908 | 650.160 |
| Norm.-Faktor | 0,1785 | 0,4145 | 0,8459 | 0,6873 | 0,8657 | 0,4860 | 1,0000 | 0,7555 | 0,5119 | 0,4765 | 0,7595 | 0,6357 | 0,3810 |
| Abs. Vol. total Akt | 455.880 | 2.257.572 | 1.862.400 | 1.886.280 | 2.098.188 | 1.819.032 | 2.487.048 | 2.112.672 | 1.437.948 | 1.791.120 | 2.305.872 | 2.164.632 | 1.199.040 |
| Norm. Vol. total Akt | 2.554.620 | 5.446.722 | 2.201.647 | 2.744.412 | 2.423.612 | 3.742.785 | 2.487.048 | 2.796.296 | 2.809.304 | 3.758.994 | 3.036.131 | 3.404.910 | 3.147.225 |
| Norm.-Faktor | 0,4690 | 1,0000 | 0,4042 | 0,5039 | 0,4450 | 0,6872 | 0,4566 | 0,5134 | 0,5158 | 0,6901 | 0,5574 | 0,6251 | 0,5778 |
| Norm. Vol. pAkt/Akt | 1.774.415 | 302.929 | 429.657 | 678.871 | 855.076 | 392.460 | 311.804 | 322.849 | 409.533 | 139.035 | 88.569 | 113.794 | 100.780 |
| Rel. Vol. pAkt/Akt | 5,8575 | 1,0000 | 1,4183 | 2,2410 | 2,8227 | 1,2955 | 1,0293 | 1,0658 | 1,3519 | 0,4590 | 0,2924 | 0,3756 | 0,3327 |

B



A: Repräsentative Quantifizierung eines Western Blots; für total Akt und das zugehörige β -Actin wurde stets ein zusätzliches Gel erstellt (1, 2); die geringere Konzentration des Akt-Inhibitors von 1 μ M wurde zur Dosisfindung zusätzlich betrachtet, jedoch bei besserer Effektivität von 3 μ M nicht weiter in die Versuche einbezogen; n=3; vollständiger Western Blot in Anlage 4

B: Inhibition von phospho-Akt unter Akt-Inhibitor 3 μ M um rund 70 %; ausbleibende Erhöhung der Expression von phospho-Akt unter Akt-Inhibitor; statistische Auswertung von Western Blots mit gepaarten t-Tests; n=3

Anschließend wurde untersucht, inwiefern der Akt-Inhibitor auch eine erhöhte Expression von phospho-Akt unter Zellstress verhindert. Im geprüften Versuchssetting waren keine statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich von inhibierter Kontrollprobe und den inhibierten Proben, die CMS, HOX und CMS+HOX ausgesetzt waren, nachweisbar ($p=0,069$; $p=0,136$; $p=0,281$). Im Gegenteil, in den Interventionsgruppen wurden im Vergleich zu den Kontrollproben sogar tendenziell geringere Werte für die Expression von phospho-Akt gemessen. Die Akt-Phosphorylierung wurde auf Proteinebene durchschnittlich um rund 70 % reduziert, im Vergleich hierzu war die p21-Expression durch Inhibition um rund 75 % reduziert worden.

C.3.3 p21 unter Akt-Inhibition

Im letzten Schritt der Proteinanalytik wurden p21 und phospho-Akt in Relation zueinander gesetzt. Proben, die mit dem zuvor validierten Akt-Inhibitor behandelt wurden, wurden hierzu nach 24 Stunden unter Zellstress auf deren p21-Expression untersucht (Abbildung 24). Während bei den nicht inhibierten Proben die bekannten Erhöhungen der p21-Expression unter HOX und CMS+HOX in statistisch signifikantem Maße auftraten ($p=0,026$; $p=0,021$), war unter Akt-Inhibitor keine signifikante Änderung der p21-Expression unter CMS, HOX und CMS+HOX nachweisbar ($p=0,256$; $p=0,121$; $p=0,104$). Ferner konnte gezeigt werden, dass die p21-Expression unter HOX und unter CMS+HOX in den inhibierten Proben signifikant geringer als in den nicht inhibierten Proben war ($p=0,040$; $p=0,019$).

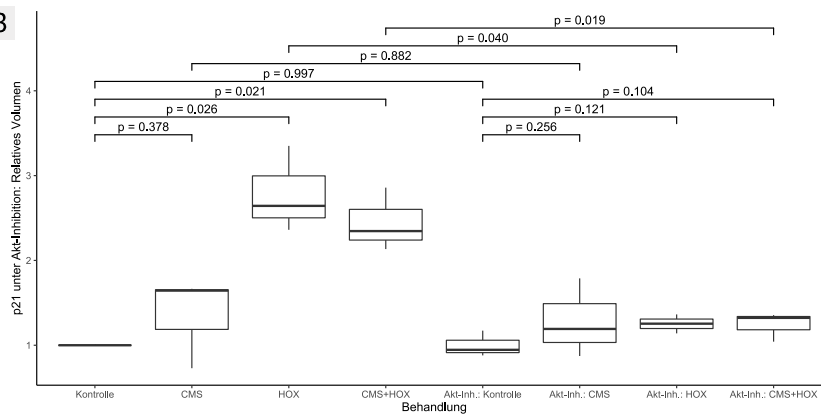
Insgesamt kann daher davon ausgegangen werden, dass die Hochregulation des PI3K/Akt-Signalwegs unter Stress einer p21-Erhöhung vorgeschaltet ist. Weiterführende Betrachtungen zu Zellzahl und Zellexpansionsindex unter Akt-Inhibition konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mit einem eindeutigen Ergebnis abgeschlossen werden, deshalb wird auf die Darstellung an dieser Stelle verzichtet. Stattdessen erfolgte die priorisierte Bearbeitung der dritten initial formulierten Forschungsfrage mit Untersuchungen zur Reversibilität des Zellzyklusarrests.

Abbildung 24: Expression von p21 unter Akt-Inhibition

A

| Sauerstoff | pos. Kontr. | 21 % | 21 % | 80 % | 80 % | 21 % | 21 % | 80 % | 80 % | 21 % | 21 % | 80 % | 80 % |
|----------------|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| CMS | | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + |
| Akt-Inh. | | - | - | - | - | 1 µM | 1 µM | 1 µM | 1 µM | 3 µM | 3 µM | 3 µM | 3 µM |
| p21 | | | | | | | | | | | | | |
| bAct | | | | | | | | | | | | | |
| Abs. Vol. bAct | 378.936 | 2.078.064 | 920.700 | 1.414.428 | 1.561.572 | 819.588 | 1.256.808 | 765.516 | 917.376 | 696.984 | 1.122.336 | 811.056 | 640.572 |
| Norm.-Faktor | 0,1824 | 1,0000 | 0,4431 | 0,6806 | 0,7515 | 0,3944 | 0,6048 | 0,3684 | 0,4415 | 0,3354 | 0,5401 | 0,3903 | 0,3083 |
| Abs. Vol. p21 | 146.796 | 1.269.660 | 924.984 | 2.284.212 | 2.035.956 | 676.656 | 873.828 | 744.000 | 649.224 | 374.856 | 598.788 | 564.972 | 407.952 |
| Norm. Vol. p21 | 805.021 | 1.269.660 | 2.087.733 | 3.355.942 | 2.709.351 | 1.715.660 | 1.444.827 | 2.019.657 | 1.470.639 | 1.117.637 | 1.108.687 | 1.447.555 | 1.323.427 |
| Rel. Vol. p21 | 0,6340 | 1,0000 | 1,6443 | 2,6432 | 2,1339 | 1,3513 | 1,1380 | 1,5907 | 1,1583 | 0,8803 | 0,8732 | 1,1401 | 1,0423 |

B



A: Repräsentative Quantifizierung eines Western Blots; die geringere Konzentration des Akt-Inhibitors von 1 µM wurde zur Dosisfindung zusätzlich betrachtet, jedoch in den weiterführenden Experimenten wegen der geringeren Wirkstärke nicht weiter berücksichtigt; n=3; vollständiger Western Blot in Anlage 5

B: Aktivierungsmuster von p21 ohne Inhibition unverändert im Vergleich zu vorherigen Untersuchungen (Abbildung 19); ausbleibende Erhöhung der Expression von p21 unter Akt-Inhibitor 3µM; statistische Auswertung von Western Blots mit gepaarten t-Testen; n=3

C.4 Reversibilität des Zellzyklusarrests

C.4.1 Zellmorphologie

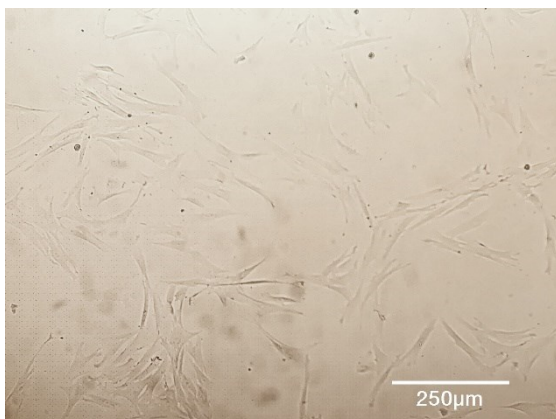
Untersuchungsgegenstand war, inwiefern die Wachstumsinhibition durch die Stressoren CMS, HOX und CMS+HOX reversibel ist, wenn die Kultivierung nach Beendigung der Exposition unter Normalbedingungen fortgeführt wird. Hierzu wurden die Expositionsdauern von 24 h, 48 h und 72 h für n=3 verglichen. Die Zellmorphologie wurde bei Versuchsbeginn, am Ende der Exposition und am Ende der Weiterkultivierung 3 bzw. 6 Tage nach Ende der Exposition dokumentiert. Für die meisten Proben wurde 3

Tage nach Ende der Exposition vollständige Konfluenz erreicht, so dass zu diesem Zeitpunkt die letzte Dokumentation erfolgte. Falls zu diesem Zeitpunkt keine vollständige Konfluenz vorlag, erfolgte die letzte Dokumentation 6 Tage nach Ende der Exposition. Die lichtmikroskopischen Bilder sind für den Versuchsbeginn in Abbildung 25 und für die späteren Zeitpunkte in Abbildung 26 zu finden; die Verweise in den folgenden Abschnitten beziehen sich auf Abbildung 26.

Zunächst wurden Rarefizierung, Vergrößerung, flacherer Phänotyp und verlängerte Zellfortsätze der Zellen in den Interventionsgruppen analog zu Abbildung 14 reproduziert. Die ursprünglich gewählte Expositionsdauer von 72 h ging auch hier mit den genannten Effekten nach Behandlung mit CMS, HOX und CMS+HOX einher (Q, S, U, W). Bei einer auf 48 h verkürzten Expositionsdauer waren Effekte nur noch bei Behandlung mit HOX und CMS+HOX deutlich abgrenzbar (I, K, M, O). Wurde die Exposition auf 24 h verkürzt, zeigten sich nahezu keine Effekte (A, C, E, G).

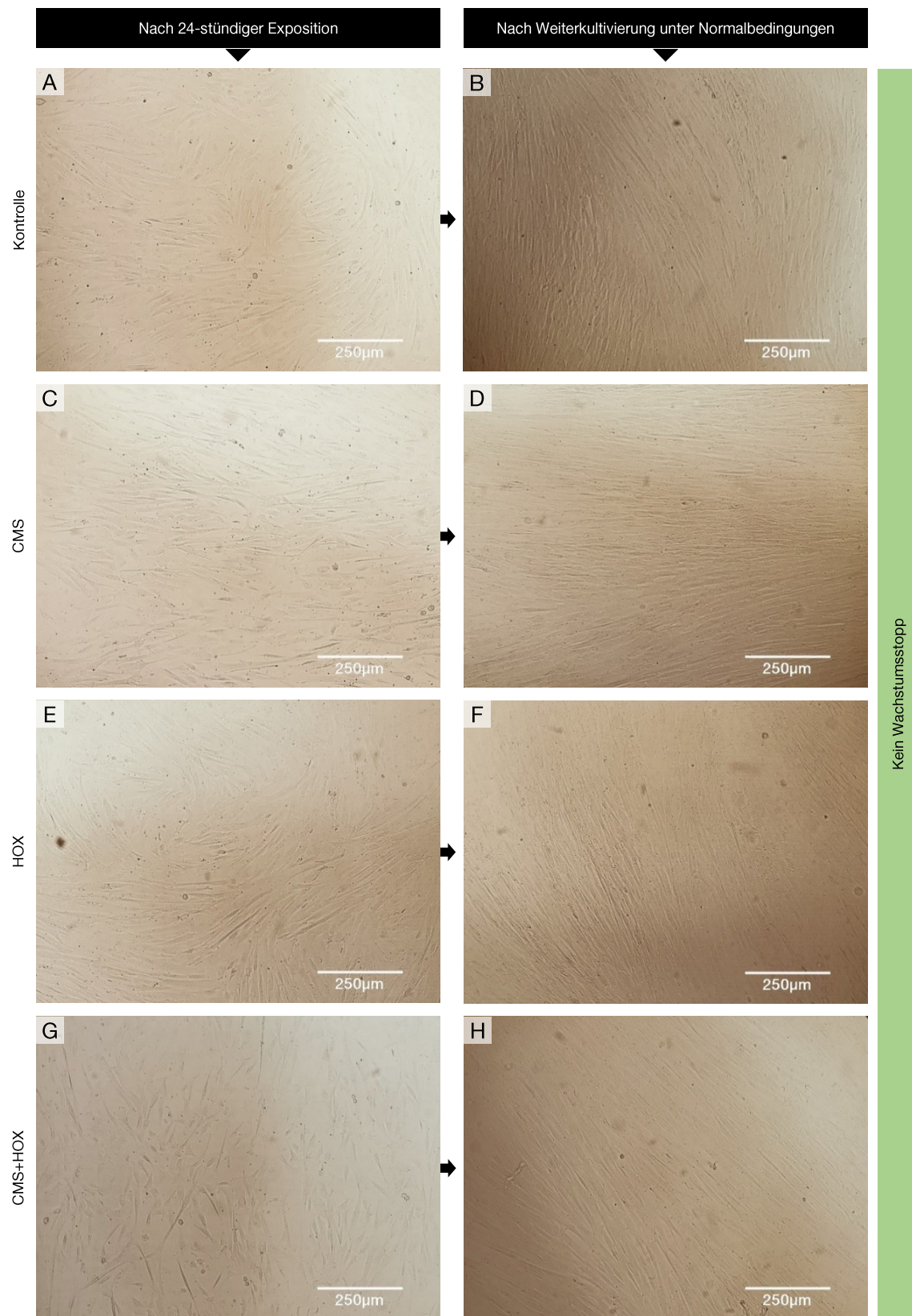
Für die Expositionsdauer von 24 h wurde vollständige Konfluenz 3 Tage nach Ende der Exposition in allen Interventionsgruppen erreicht, so dass keine Unterschiede mehr erkennbar waren (B, D, F, H). In Anbetracht der kaum vorhandenen initialen Effekte war dies erwartet worden. Bei den über 48 h exponierten Proben war bei stärkerer Zellschädigung mehr Zeit zwischen Ende der Exposition und vollständiger Konfluenz erforderlich (6 Tage für HOX und CMS+HOX statt 3 Tage bei Kontrolle und CMS; J, L, N, P). Vollständige Konfluenz konnte jedoch prinzipiell erreicht werden.

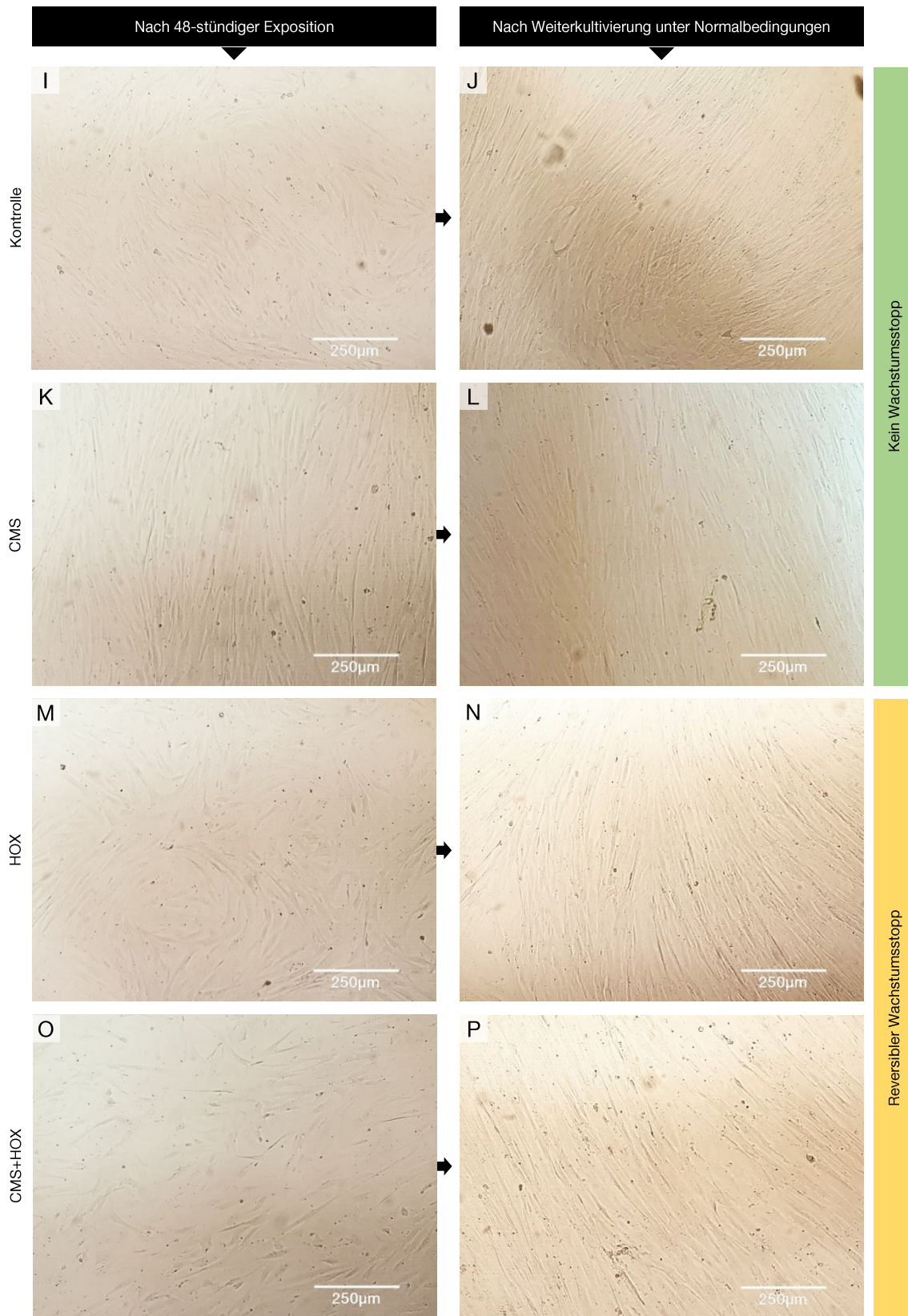
Abbildung 25: Zellmorphologie bei Versuchsbeginn

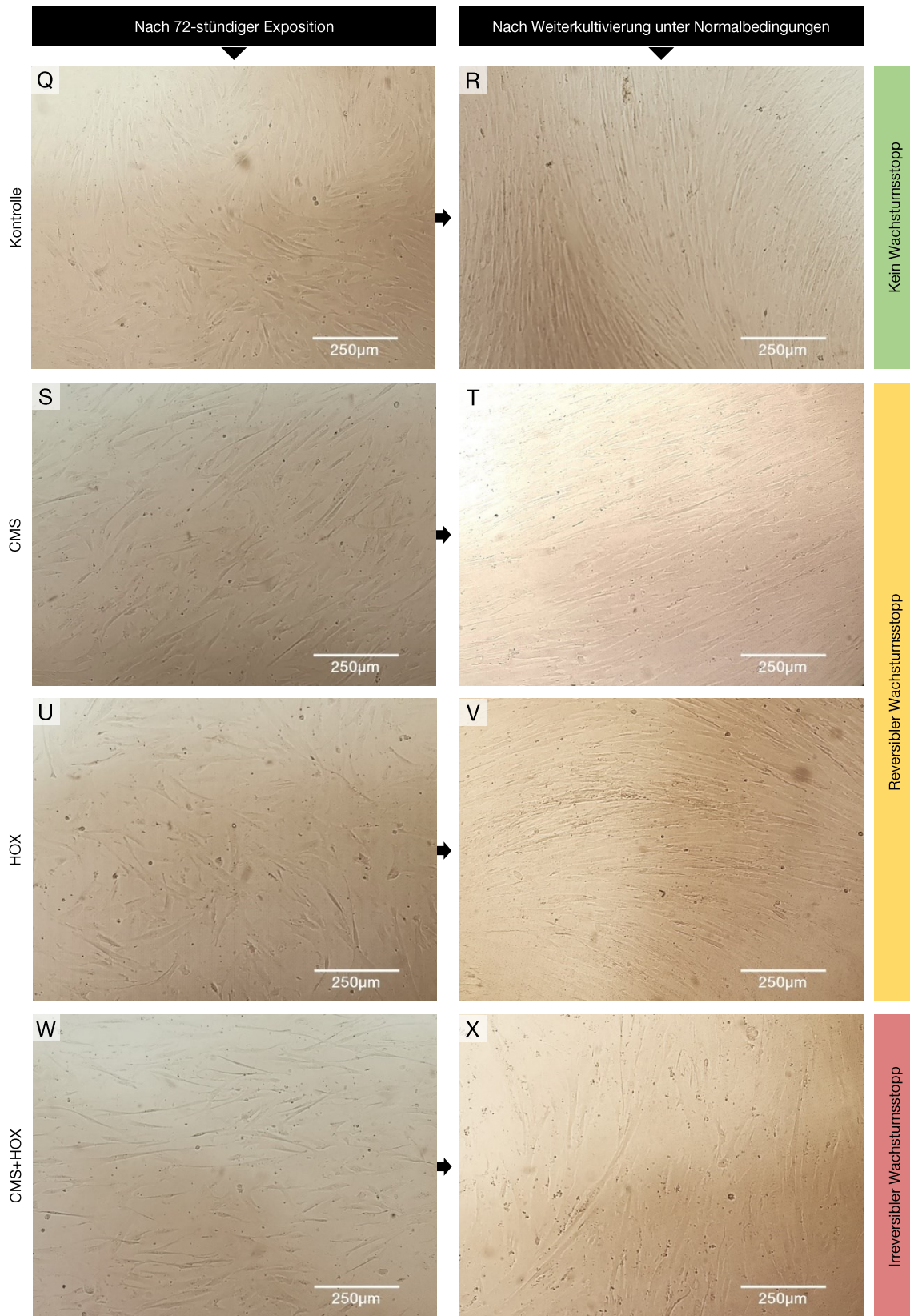


Repräsentatives lichtmikroskopisches Bild; für n=3 wurde jeweils 1 Bildausschnitt fotografiert

Abbildung 26: Zellmorphologie nach Interventionsende und nach Weiterkultivierung







Unterschiedlich stark ausgeprägter Wachstumsstopp der Zellen in Abhängigkeit von der Interventionsdauer; die Exposition gegenüber CMS+HOX führt bei einer Interventionsdauer bis zu 48 h zu einem reversiblen und ab 72 h zu einem irreversiblen Wachstumsstopp; repräsentative lichtmikroskopische Bilder; für n=3 wurde jeweils 1 Bildausschnitt fotografiert; die jeweilige Behandlung ist der folgenden Übersicht zu entnehmen:

| | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Sauerstoff | 21 % | 21 % | 80 % | 80 % | 21 % | 21 % | 80 % | 80 % | 21 % | 21 % | 80 % | 80 % |
| CMS | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + |
| Dauer der Exposition | 24 h | 24 h | 24 h | 24 h | 48 h | 48 h | 48 h | 48 h | 72 h | 72 h | 72 h | 72 h |
| Dauer der Weiterkultivierung | 3 Tage | 3 Tage | 3 Tage | 3 Tage | 3 Tage | 3 Tage | 6 Tage | 6 Tage | 3 Tage | 3 Tage | 6 Tage | 6 Tage |
| Bild-Nr. am Ende der Exposition | A | C | E | G | I | K | M | O | Q | S | U | W |
| Bild-Nr. am Ende der Weiterkultivierung | B | D | F | H | J | L | N | P | R | T | V | X |

Die nach 72 h auftretenden Effekte nach Behandlung mit CMS+HOX waren hingegen nicht mehr reversibel. Es erfolgte keine Rückkehr zu einer spindelförmigen Zellform. Die Zellschädigung mit Vergrößerung und deutlich abgrenzbarem Zellkern bestand auch über 6 Tage nach Ende der Exposition hinaus fort, es kam nicht zur Konfluenz. Nach Exposition gegenüber CMS bzw. HOX allein hingegen konnte Konfluenz noch verlangsamt erreicht werden (R, T, V, X).

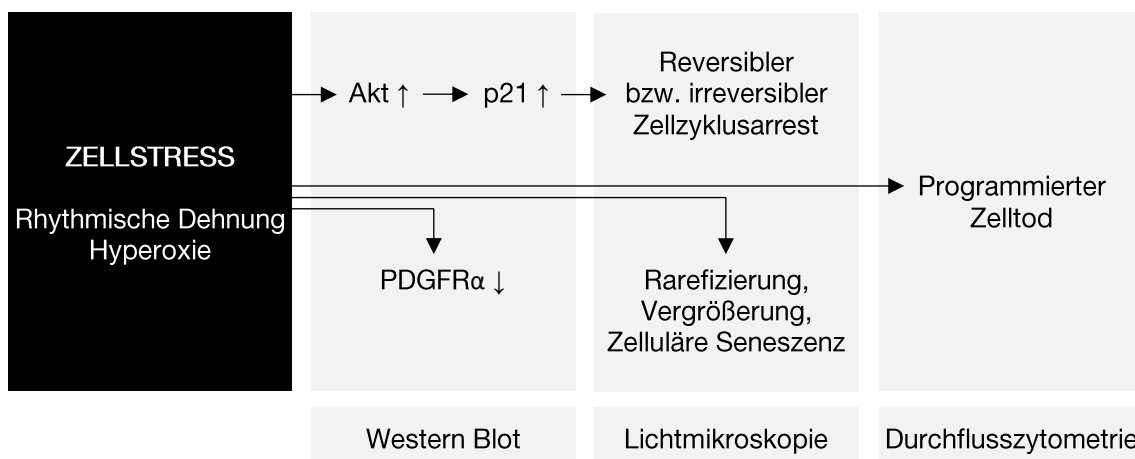
Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass eine bis zu 72-stündige Exposition gegenüber CMS bzw. HOX allein und eine bis zu 48-stündige Exposition gegenüber CMS+HOX einen reversiblen Wachstumsstopp induziert. Für dementsprechend behandelte Proben bleibt unabhängig von der Behandlung ein Wachstum bis zur Konfluenz möglich. Ab einer Expositionsdauer von 72 h ist die Schädigung unter CMS+HOX hingegen derart stark ausgeprägt, dass ein Wachstum zur Konfluenz auch nach längerer Weiterkultivierung unter Normalbedingungen nicht mehr möglich ist.

D. DISKUSSION

D.1 Diskussionsgrundlage

In der vorliegenden Arbeit wurden mesenchymale Stammzellen der Nabelschnur in einem Zellkulturmodell *in vitro* bei Exposition gegenüber CMS und/oder HOX untersucht, da diese Zellen als vielversprechende Therapieoption für die Behandlung der bronchopulmonalen Dysplasie angesehen werden. Der Zelltyp wurde gewählt, da für MSC der Nabelschnur besonders gute antiinflammatorische und wachstumsfördernde Wirkungen auf die Lunge belegt sind und sie somit für die Behandlung der bronchopulmonalen Dysplasie von Interesse sind. Um Bedingungen wie in der künstlich beatmeten Lunge des Frühgeborenen zu simulieren, wurde im Zellkulturmodell die Möglichkeit zur Exposition gegenüber rhythmischer Dehnung und Hyperoxie geschaffen.

Abbildung 27: Ergebnisse



Der Phänotyp der MSC veränderte sich nach Applikation von CMS, HOX und CMS+HOX mit in dieser Reihenfolge steigender Effektstärke hin zu lichtmikroskopisch nachweisbarer Rarefizierung, Vergrößerung und zellulärer Seneszenz. Die Zellschädigung wurde im Durchflusszytometer objektiviert, wo für HOX und für CMS+HOX eine Erhöhung des programmierten Zelltods messbar war. Auf Proteinebene konnten in Western Blots ein Verlust von Stammzellcharakteristika mit einer verringerten Expression von PDGFR α sowie eine frühzeitige Aktivierung von phospho-Akt und eine nachgelagerte Aktivierung von p21 gezeigt werden.

Um die Bedeutung von p21 und phospho-Akt für die zelluläre Viabilität zu beleuchten, wurden eine p21-siRNA sowie ein biochemischer Akt-Inhibitor etabliert. Eine p21-Inhibition führte durchflusszytometrisch unter HOX und CMS+HOX zu einer

signifikanten Erhöhung des programmierten Zelltods. Die in den Interventionsgruppen beobachtbare Hochregulation von p21 kann daher als Schutzmechanismus angesehen werden, der über Wachstumsarrest und zelluläre Seneszenz einen verstärkten programmierten Zelltod vermeidet. Die Akt-Inhibition verhinderte die Hochregulation von p21. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die verstärkte Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs einer p21-Erhöhung vorgeschaltet ist.

Zur Überprüfung auf eine Reversibilität des Zellzyklusarrests wurde schließlich die Dauer der Exposition gegenüber rhythmischer Dehnung und Hyperoxie variiert, wobei die Kultivierung anschließend unter Normalbedingungen fortgeführt wurde. Eine unter CMS+HOX sichtbare Phänotypveränderung war im gewählten Modell bis zu einer Expositionsdauer von 48 h reversibel. Ab einer Dauer von 72 h war die Schädigung hingegen derart stark, dass ein Wachstum zur Konfluenz auch nach längerer Weiterkultivierung unter Normalbedingungen nicht mehr erreicht wurde.

D.2 Diskussion der Methoden

Methodische Grundlage dieser Arbeit sind ein Zellkulturmodell sowie die validierten Analysemethoden Lichtmikroskopie, Durchflusszytometrie und Western Blot. Die Extrapolation von *in vitro* durchgeführten Experimenten nach *in vivo* unterliegt hierbei grundsätzlichen Limitationen. Die Kultivierung erfolgte in zweidimensionaler Monokultur unter Verwendung tierischer Wachstumsfaktoren in Form von fetalem Kälberserum. Obwohl übliches Vorgehen, kann ein solches Modell die komplexen inflammatorischen Prozesse der Lunge nur begrenzt abbilden. Eine mögliche Erweiterung des experimentellen Versuchsaufbaus wäre daher die Exposition gegenüber proinflammatorischen Zytokinen oder anderen inflammatorischen Stimuli, um die inflammatorischen Prozesse der Lunge besser abzubilden

Die Zellkultur erfolgte mit frisch isolierten MSC der Nabelschnur. Im Vergleich zu residenten MSC der Lunge handelt es sich zwar um ähnliche, jedoch nicht vollständig identische Zellpopulationen (Möbius et al. 2019). Zum bestmöglichen Erhalt der zellulären Integrität erfolgte kein enzymatischer Andau zur Inkulturnahme und kein Einfrieren der Zellen. Um eine bestehende Inflammation auszuschließen und um auf eine desinfizierende Behandlung verzichten zu können, wurden ausschließlich steril asservierte Nabelschnüre von reifen Neugeborenen aus Entbindungen per Sectio ohne Infektion des Neugeborenen verwendet. Der Nachweis von MSC-Charakteristika erfolgte

gemäß aktueller wissenschaftlicher Praxis; das Fehlen von für mesenchymale Stammzellen spezifischen Markern ist eine allgemeingültige Schwachstelle der aktuell verfügbaren Methodik (Renesme et al. 2022). Der Versuchsaufbau ermöglichte die separate und gleichzeitige Applikation von CMS und HOX, wobei Intensität und Frequenz des CMS in Vorversuchen in Analogie zu einer künstlichen Beatmung definiert wurden. In anderen Arbeitsgruppen wird die BPD typischerweise in Zellkulturmodellen ohne CMS und HOX oder in Tierversuchen abgebildet (Benny et al. 2022; Goetz et al. 2021). Insgesamt geht dieses Zellkulturmodell daher deutlich über andere Zellkulturmodelle hinaus und berücksichtigt durch den Verzicht auf Tierversuche die 3R-Prinzipien.

In der Lichtmikroskopie wurde die Zellmorphologie zunächst ungefärbt dokumentiert, der Vergleich zwischen den Interventionsgruppen erfolgte über den Zellexpansionsindex. Die manuelle Auszählung ist eine seit Jahrzehnten etablierte Methode zur Zellzahlbestimmung. Inzwischen stehen effiziente automatisierte Möglichkeiten zur Verfügung, sie lassen sich in impedanzbasierte, optische und lichtmikroskopische Methoden einteilen. Die manuelle Auszählung erfolgt jedoch weiterhin regelhaft, insbesondere für erste Analyseschritte (Vembadi et al. 2019). Auch in vorherigen Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe wurde daher auf diese zurückgegriffen (Reicherzer et al. 2018; Behnke et al. 2024). Eine an diese Arbeit anknüpfende automatische Zellzählung könnte beispielsweise mit einem bildbasierten Verfahren oder mit der bereits an anderer Stelle verwendeten Durchflusszytometrie erfolgen.

Die anschließend durchgeführte β -Galaktosidase-Färbung ist ebenfalls etabliert und in Verwendung als Darstellungsmethode für Seneszenz *in vitro* und *in vivo* (Debacq-Chainiaux et al. 2009) Eine aktuelle Bewertung liegt in Form eines Reviews von Mera-Rodríguez et al. (2021) vor: Demnach ist die β -Galaktosidase-Färbung derzeit die am häufigsten verwendete Technik zur Bestimmung zellulärer Seneszenz. Hauptkritikpunkt ist die Genauigkeit, da nicht alle seneszenten Zellen eine Erhöhung von β -Galaktosidase aufweisen. Ferner ist die Färbung nicht immer indikativ. Eine Erhöhung der Genauigkeit kann durch fluoreszenzbasierte Methoden und die Kombination mit einer durchflusszytometrischen Quantifizierung erreicht werden; letztere ist im gewählten Versuchsaufbau erfolgt. Wegen der deutlichen Effekte in der β -Galaktosidase-Färbung wurde auf sensitivere, aufwendigere Methoden der Detektion zellulärer Seneszenz verzichtet.

Die Durchflusszytometrie ist eine seit Jahrzehnten etablierte, zuverlässige Methode zur Immunphänotypisierung und zur Identifikation apoptotischer und nekrotischer Zellen. Die zur Identifikation toter Zellen verwendeten Farbstoffe Annexin V und Sytox sind ebenfalls langjährig etabliert (McKinnon 2018). Im Vergleich zu im selben Gerät gemessenen Leukozyten zeigten sich MSC dieser Arbeit deutlich anspruchsvoller in der Quantifizierung. Einer erhöhten Autofluoreszenz wurde begegnet, in dem je nach Messung individuelle Gates definiert wurden.

Der Western Blot ist die am häufigsten verwendete semiquantitative Methode der Proteinanalytik. Western Blots sind in der Durchführung vergleichsweise günstig und daher oftmals Mittel der Wahl in der Grundlagenforschung. An der Methode geäußerte Kritik bezüglich nicht immer gegebener Reproduzierbarkeit ließ sich empirisch bestätigen, ist jedoch nicht allein auf die Methode Western Blot beschränkt. Sofern die verwendete Prozedur validiert, einheitlich und auf dem aktuellen Stand der Technik ist, ist die Aussagekraft anderen Labormethoden ebenbürtig (Pillai-Kastoori et al. 2020). In Vorversuchen der Arbeitsgruppe an trachealen MSC wurden die untersuchten Zielproteine bei Exposition gegenüber selbigen Stressoren mittels Microarray identifiziert (Behnke et al. 2024). Western Blots wurden anschließend zur Bestätigung relevanter Effekte an Zellen unterschiedlicher Herkunft verwendet, da sie durch geringere Kosten höhere Fallzahlen ermöglichen.

D.3 Diskussion der Ergebnisse

Im Rahmen der Etablierung der Zellkultur wurden die untersuchten Zelleigenschaften zum Nachweis mesenchymaler Stammzellen im Vergleich zu den Kriterien der ISCGT leicht abgewandelt, da seit deren Definition vor 16 Jahren weitere Marker bekannt wurden. Die Grundpfeiler kunststoffadhärentes Wachstum, Differenzierungspotenzial und Expressionsmuster von Oberflächenmarkern blieben erhalten. Ihnen wurde an vierter Stelle der Nachweis von PDGFR α im Western Blot zur Seite gestellt, da PDGFR α als charakteristisch für Stammzellen beschrieben wurde (Farahani und Xaymardan 2015). Im Gegenzug wurde der zeitaufwendige Nachweis des Differenzierungspotenzial auf Adipozyten und Osteoblasten beschränkt. Im Durchflusszytometer wurden die Anwesenheit von CD105, CD73 und CD90 und die Abwesenheit von CD45, CD34 und CD11b wie vorgesehen nachgewiesen. Statt mit CD79 α /CD19 und HLA-DR weitere Oberflächenmarker lediglich zum Ausschluss von Leukozyten zu untersuchen, wurden

CD146, CD165 und CD91 untersucht. Diese drei Marker wurden in Publikationen als potenziell für MSC charakteristisch identifiziert (Wang et al. 2021; Rahmani-Moghadam et al. 2022). Die hier isolierten Zellen waren positiv für CD146 und schwach positiv für CD165 und CD91. Für den regelhaften Einsatz zum Nachweis von Stammzellcharakteristika an MSC der Nabelschnur scheint CD146 daher eher geeignet als CD165 und CD91.

Die **erste untersuchte Hypothese** war, dass CMS, HOX und CMS+HOX zytotoxisch auf MSC der Nabelschnur wirken und eine Phänotypveränderung bedingen. Lichtmikroskopisch zeigten sich abgestufte Effekte in Abhängigkeit der applizierten Stressoren: Die nur mit CMS behandelten Zellen zeigten bereits eine Rarefizierung, die mit HOX behandelten Zellen eine verstärkte Rarefizierung sowie zusätzlich einen flacheren Phänotyp, die mit CMS+HOX behandelten Zellen die stärkste Rarefizierung, ebenfalls einen flacheren Phänotyp und außerdem eine Verlängerung der Zellfortsätze. In der Quantifizierung wurde dies in Form einer Verringerung des Zellexpansionsindex und einer Erhöhung des programmierten Zelltods für HOX und CMS+HOX bestätigt.

Auf molekularer Ebene war eine signifikant verringerte PDGFR α -Expression unter HOX sowie unter CMS+HOX nachweisbar. Dieser von Tiermodellen und Frühgeborenen vorbekannte Effekt (Popova et al. 2014) konnte somit reproduziert werden. Eine unter zunehmendem Zellstress signifikant veränderte Expression von α SMA trat nicht auf. Reicherzer et al. (2018) hatten eine Assoziation zwischen einer verringerten Expression von α SMA und einem höheren Schweregrad einer BPD gezeigt, so dass α SMA in dieser Arbeit untersucht wurde. Die ursprüngliche Beobachtung ging einher mit einer vermehrten Proliferation von residenten pulmonalen MSC in einem Milieu mit zahlreichen Stressoren *in vivo*, während die Proliferation der MSC der Nabelschnur im vorliegenden Modell *in vitro* bedingt durch starke Sauerstofftoxizität verringert war. Möglicherweise wurden weitere Faktoren zellulärer Schädigung, die eine Herunterregulation von α SMA induzieren, nicht ausreichend abgebildet, um Effekte auf α SMA nachzuweisen.

Effekte auf den Zellzyklus konnten auf mehrere Weisen nachgewiesen werden. In der β -Galaktosidase-Färbung zeigte sich mit zunehmendem Zellstress ein ansteigender Anteil seneszenten Zellen. Dem voraus gingen eine vermehrte Expression von p21 im Western Blot nach 24 h und eine vermehrte Expression von phospho-Akt im Western Blot nach 12 h. Beide Effekte waren erwartet worden: Für p21 ist eine vermehrte Expression u. a.

im Nagetiermodell unter Hyperoxie vorbeschrieben (Londhe et al. 2011), für phospho-Akt u. a. im Zellkulturmodell für pulmonale Endothelzellen unter Hyperoxie (Ahmad et al. 2006). Auch für CMS sind Effekte in Form einer höheren Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs im Zellkulturmodell mit rhythmisch gedehnten Alginat-Hydrogelen bei Erhöhung der Dehnungsfrequenz vorbeschrieben (Lin et al. 2021). Mehrwert dieser Arbeit ist folglich die Zusammenführung der vorbeschriebenen Veränderungen in Bezug auf Seneszenz, p21 und phospho-Akt für CMS und HOX, um die Grundlage für eine detaillierte Untersuchung zellulärer Signalwege zu schaffen. Gleichzeitig zeigen die Ergebnisse, dass verschiedene Stressoren in der unreifen Lunge gleichgerichtet Signalwege aktivieren, die die Funktionsfähigkeit von MSC schädigen und die weitere Lungenentwicklung beeinträchtigen können.

Die einzelne und kombinierte Betrachtung der Stressoren CMS und HOX ist eine Stärke der Arbeit. In der Gesamtschau ist HOX im Vergleich zu CMS der stärkere Stimulus; eine Kombination beider Stressoren verstärkt die Effekte zusätzlich. Die beobachteten Veränderungen stehen im Einklang mit in der Arbeitsgruppe parallel durchgeführten Experimenten an trachealen MSC (Behnke et al. 2024). Die gezeigten Veränderungen liefern einen Erklärungsansatz, warum durch die Gabe allogener MSC bei Frühgeborenen bisher keine nachhaltigen Effekte erzielt werden konnten: Da sich der Phänotyp von MSC unter Exposition gegenüber Stressoren rasch verändert und mit einem Funktionsverlust einhergeht, ist eine einmalige Gabe von MSC bei einer mehrwöchigen Atemunterstützung möglicherweise unzureichend. In Nagetiermodellen nachweisbare positive Effekte wurden unter deutlich kürzeren Expositionsdauern erzielt (Augustine et al. 2017). Insgesamt konnte die Ausgangshypothese verifiziert werden.

Die **zweite untersuchte Hypothese** besagte, dass die Phänotypveränderung mit der Regulation von Signalwegen des Zellzyklus einhergeht, und dass ein selektives Ausschalten hochregulierter Zellzyklusmodulatoren die Phänotypveränderung beeinflusst. Daher wurden p21 mittels siRNA und phospho-Akt mittels biochemischen Inhibitors ausgeschaltet und die Zellen anschließend im Western Blot und im Durchflusszytometer untersucht.

Für p21 wurde eine hinreichende Knockdowneffizienz von rund 75 % erreicht. Eine Inhibition von p21 beeinflusste in den nicht gestressten Kontrollproben das zelluläre Überleben nicht. Unter HOX und CMS+HOX bewirkte die p21-Inhibition jedoch eine Erhöhung des programmierten Zelltods. Eine Ursache hierfür könnte sein, dass die

siRNA eine durch p21 vermittelte Zellzyklusinhibition verhindert (Plasilova et al. 2009). Dies steht im Einklang mit der bereits erwähnten Wirkung von p21 als zellulärer Schutzmechanismus. Helt et al. (2001) hatten diese Wirkung an Kolonkarzinom-Zellen beobachtet und begründeten sie auf molekularer Ebene wie folgt: Üblicherweise verhindert die durch Hyperoxie vermittelte p21-Hochregulation das Eintreten in S-Phase. Wird p21 inhibiert, erfolgt ein Zellzyklusarrest dagegen vermehrt in den vulnerableren Phasen S und G2/M. Die Möglichkeit zur Limitierung der DNA-Replikation während genotoxischem Stress in Form der Exposition gegenüber Hyperoxie wird den Zellen so genommen. Da CMS allein nicht zu einer signifikanten Hochregulation von p21 führte, scheint p21 bei Exposition gegenüber einem schwachen Stressor als zellulärer Schutzfaktor weniger benötigt zu werden.

Unter Akt-Inhibition zeigte sich im Western Blot eine ausbleibende Hochregulation von p21 für HOX und CMS+HOX. Dies ist vereinbar mit der vorbeschriebenen Aktivierung von p21 durch phospho-Akt. So kann die Proteinkinase Akt nach Aktivierung durch Phosphorylierung (phospho-Akt) ihrerseits p21 durch Phosphorylierung an den Stellen Thr145 und Ser146 aktivieren und so die Stabilität von p21 erhöhen (Li et al. 2002). Es konnte somit die Bedeutung der direkten Verbindung von Akt-Phosphorylierung und p21-Aktivierung gezeigt werden. In einem nächsten Schritt wäre es interessant, die Auswirkungen auf Zellexpansionsindex und programmierten Zelltod zu untersuchen. Aus Zeitgründen konnte ein hierfür notwendiger Versuchsaufbau nicht mehr vollständig etabliert werden, dies könnte in einer künftigen Arbeit folgen. In dieser Arbeit erfolgten stattdessen Untersuchungen zur Reversibilität eines induzierbaren Zellzyklusarrests im Rahmen der Bearbeitung der dritten Hypothese.

Insgesamt konnte die zweite Hypothese angenommen werden; die beobachtbare Phänotypveränderung unter HOX und CMS+HOX erfolgte tatsächlich über p21 und möglicherweise zuvor über phospho-Akt. Die Inhibition von Zellzyklusmodulatoren ist eine Stärke dieser Arbeit, da sie den Zusammenhang zwischen den als relevant identifizierten Zielproteinen zeigt. Im gewählten Versuchsaufbau konnten für CMS allein häufig keine signifikanten Effekte nachgewiesen werden, so dass HOX mit großer Wahrscheinlichkeit der stärkere Stressor ist.

Die **dritte untersuchte Hypothese** war, dass es in Abhängigkeit von der Expositionsdauer gegenüber CMS und HOX zunächst zum reversiblen Zellzyklusarrest, später zum irreversiblen Zellzyklusarrest und schließlich zum programmierten Zelltod

kommt. Induktion von programmiertem Zelltod und vorherige zelluläre Seneszenz wurden mit den Untersuchungen zur ersten Hypothese bereits nachgewiesen. Zelluläre Seneszenz wurde lange als irreversibel betrachtet, ist nach aktuellem Forschungsstand jedoch eher ein biologisches Kontinuum und unter bestimmten Bedingungen reversibel (Lee und Schmitt 2019). Daher wurde zusätzlich untersucht, inwiefern eine unterschiedlich lange Exposition gegenüber CMS und HOX reversible bzw. irreversible Effekte induziert.

Es zeigte sich, dass die Exposition gegenüber HOX und CMS+HOX bei einer Dauer von 48 h einen reversiblen Wachstumsstopp induziert. Vollständige Konfluenz war verzögert, jedoch prinzipiell erreichbar. Bei einer Dauer von 72 h waren die Effekte von CMS+HOX hingegen derart stark ausgeprägt, dass kein Auswachsen und keine Konfluenz mehr erreicht werden konnte. Folglich konnte durch Variation der Expositionsdauer das sequenzielle Auftreten von reversibler und irreversibler Phänotypveränderung gezeigt werden. Klinisch könnte somit durch Verringerung der Expositionsdauer gegenüber CMS und HOX der Effekt einer MSC-Einmalgabe gesteigert werden.

Stärke des Versuchsaufbaus ist der Nachweis, dass bei Applikation von Stressoren bis zu einer gewissen Dauer eine Erholung der Zellpopulation möglich ist. Unmittelbar wurde eine Reversibilität jedoch nur für die lichtmikroskopische Phänotypveränderung gezeigt. In vorherigen Versuchen bewirkten stärkere Stressoren sowohl stärkere Phänotypveränderungen als auch eine stärkere zelluläre Seneszenz. Da zelluläre Seneszenz als biologisches Kontinuum verstanden werden kann, scheint bei Applikation von Stressoren eine graduelle Zunahme zellulärer Seneszenz über die gesamte Zellpopulation wahrscheinlich. Eine mit der Erholung des Phänotyps nach Beendigung der Applikation von Stressoren auftretende graduelle Abnahme zellulärer Seneszenz wäre daher grundsätzlich denkbar. Es ist eine Schwäche dieser Arbeit, dass Färbungen auf β -Galaktosidase nur unmittelbar 72-stündiger Applikation von Stressoren durchgeführt wurden. Ergänzende Seneszenzfärbungen für kürzere Expositionsdauern und an zusätzlichen Zeitpunkten könnten die Frage der Reversibilität zellulärer Seneszenz daher weitergehend klären und so die Hypothese abschließend beantworten.

D.4 Ausblick

Die gemachten Beobachtungen liefern eindeutige Hinweise dafür, dass auch allogene MSC der Nabelschnur durch Bedingungen, wie sie in der Lunge eines beatmeten

Frühgeborenen herrschen, analog zu den residenten MSC der Lunge von Frühgeborenen geschädigt werden. Möglicherweise ist dies der Grund für die kurze Nachweisbarkeit allogener mesenchymaler Stammzellen im Lungengewebe nach intratrachealer Gabe zu therapeutischen Zwecken (Thébaud 2018). Ein Anhalt für eine Verbesserung von MSC-basierten Zellprodukten durch Interventionen mit dem mittel- oder unmittelbaren Ziel p21 ergab sich in dieser Arbeit nicht. Derartige Interventionen können unter Normalbedingungen proliferations- und funktionsverbessernd sein, haben unter für eine BPD kausalen Bedingungen jedoch nachteilige Auswirkungen. Die repetitive Gabe von MSC oder deren Exosomen könnte einen alternativen Lösungsansatz darstellen (Goetz et al. 2021).

Um eine therapiebedürftige BPD grundsätzlich zu vermeiden, stehen insbesondere drei Hebel zur Verfügung: Milde Beatmungsregimes, postnatale Kortikosteroide und Surfactant (Collins et al. 2017). Eine Optimierung der pulmonalen Funktionsfähigkeit anhand dieser Ansätze könnte gleichzeitig die Notwendigkeit hoher Sauerstoffkonzentrationen senken. Neben der unmittelbaren Prophylaxe einer BPD könnte so über eine Verringerung reaktiver Sauerstoffspezies auch die Wirksamkeit allogener MSC erhöht werden.

Weitere vielversprechende Ansatzpunkte stellen die Beeinflussung des pulmonalen Mikrobioms, die Behandlung anderer Ursachen einer Inflammation wie Präeklampsie und Dysbiose sowie die umfassendere Betrachtung des Immunsystems jenseits der körpereigenen Abwehr dar (Collins et al. 2017). So stützt diese Arbeit die u. a. von Oak et al. (2017) geäußerte These einer bei BPD potenziell therapeutisch wirksamen Beeinflussung von PDGFR α . Präklinisch nachweislich wirksam und damit ebenfalls potenziell zielführend sind antiinflammatorisch wirksame Inhibitionen von Interleukin 1 α , Rac1 (*Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate 1*), Caspase 1, Interleukin 6 und Elastase (Holzfurtnner et al. 2022).

E. ZUSAMMENFASSUNGEN

E.1 Deutsche Zusammenfassung

Frühgeburtlichkeit mit ihrer Komplikation bronchopulmonale Dysplasie beeinflusst die Lungenentwicklung negativ und stellt für Betroffene ein schwerwiegendes Problem dar. Allogene mesenchymale Stammzellen der Nabelschnur gelten als vielversprechender Therapieansatz; auf ihnen basierende Zellprodukte zeigten sich in Studien bislang verbesserungsfähig hinsichtlich Wirksamkeit und Wirkdauer. Für diese Arbeit wurden diese Zellen daher analog zur Lunge eines beatmeten Neugeborenen gegenüber Hyperoxie und rhythmischer Dehnung exponiert. CMS und/oder HOX führten eine Phänotypveränderung herbei, die in Lichtmikroskop, Durchflusszytometer und Western Blot objektiviert wurde. Die applizierten Stressoren bewirkten u. a. eine Rarefizierung und Vergrößerung der Zellen, eine Erhöhung der zellulären Seneszenz, eine Erhöhung des programmierten Zelltods und eine Verringerung der Expression von PDGFR α . p21 und Akt wurden durch jeweilige Inhibition als zugrundeliegenden Signalwegen zugehörig identifiziert. Inhibitionsversuche zeigten die Rolle von p21 als Schutzfaktor gegen programmierten Zelltod unter zellulärem Stress. Der Zellzyklusarrest wurde auf Reversibilität geprüft, in dem die Expositionsdauer variiert wurde. Wurde ein Zellzyklusarrest durch CMS+HOX induziert, war er für eine Expositionsdauer von bis zu 48 h reversibel und ab 72 h irreversibel. Insgesamt wurde die Schädigung von exogenen MSC für die Prävention der BPD durch Bedingungen analog zur Beatmung Neugeborener nachgewiesen. Dies bestätigt die Notwendigkeit möglichst kurzer Beatmungsregimes und Vermeidung der Exposition gegenüber prolongierter Hyperoxie für eine Effektivitätssteigerung und stützt repetitive MSC-Gaben als künftigen Therapieansatz.

E.2 English Summary

Prematurity with its complication bronchopulmonary dysplasia impairs lung development and imposes serious constraints to the affected. Allogeneic umbilical cord mesenchymal stem cells form a promising approach, yet derived cell-based products used in trials need to be improved in terms of efficacy and durability. For this work, these cells were hence exposed to hyperoxia and mechanical stretch mimicking a ventilated newborn's lung. Phenotype changes were induced and characterized using light microscopy, flow cytometry, and western blots. Stressor application resulted in cell

rarefication and enlargement, increased programmed cell death, and reduced PDGFR α expression. Underlying signaling pathways were elucidated through quantification and inhibition of p21 and phospho-Akt. Inhibition experiments identified p21 as a cellular stress protection factor. Reversibility of an inducible cell cycle arrest was assessed by varying exposure duration. A reversible arrest of cell cycle was observable until 48 hours of CMS+HOX exposition and turned to be irreversible after 72 hours of exposition. Overall, conditions resembling neonatal mechanical ventilation were proven to damage MSC. This confirms the necessity of mild ventilation regimens and endorses repetitive MSC administration for therapeutic purposes.

F. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|--------------------|---------------------------------------|
| Akt-Inh. | Akt-Inhibitor |
| ANGPT1 | Angiopoietin 1 |
| APC | Allophycocyanin |
| bAct | β -Actin |
| BCA | Bicinchoninic Acid |
| BPD | Bronchopulmonale Dysplasie |
| BV | Brilliant Violet |
| CD | Cluster of Differentiation |
| CDK | Cyclin-Dependant Kinase |
| CMS | Cyclic Mechanical Stretch |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| CXCL | C-X-C Motif Ligand |
| Cy7 | Cyanin 7 |
| DC | Duty Cycle |
| ddH ₂ O | Doppelt destilliertes Wasser |
| DMEM | Dulbecco's Minimal Essential Medium |
| ECL | Enhanced Chemiluminescence |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EGF | Epidermal Growth Factor |
| ELBW | Extremely Low Birth Weight |
| Erk | Extracellular-Signal Regulated Kinase |
| EV | Extrazelluläres Vesikel |
| FACS | Fluorescence-Activated Cell Sorting |
| FCS | Fetal Calf Serum |
| FiO ₂ | Inspiratorische Sauerstofffraktion |

| | |
|--------|-----------------------------------------------------------|
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| FSC | Forward Scatter |
| FSC-A | Forward Scatter Area |
| FSC-W | Forward Scatter Width |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase |
| HGF | Hepatocyte Growth Factor |
| HELLP | Hemolysis, Elevated Liver Enzymes, and Low Platelet Count |
| HLA-DR | Human Leucocyte Antigen – DR Isotype |
| HOX | Hyperoxie |
| IDO | Indolamin-2,3-Dioxygenase |
| IL | Interleukin |
| ISCGT | International Society for Cell & Gene Therapy |
| IUGR | Intrauterine Growth Retardation |
| JAK | Januskinase |
| KGF | Keratinocyte Growth Factor |
| LBW | Low Birth Weight |
| LGA | Large for Gestational Age |
| LXA4 | Lipoxin A4 |
| MAPK | Mitogen-Activated Protein Kinase |
| MCP1 | Monocyte Chemoattractant Protein 1 |
| MEK | MAPK/Erk Kinase |
| MEM | Minimal Essential Medium |
| MIP2 | Macrophage Inflammatory Protein 2 |
| MMP | Matrixmetallopeptidase |
| MSC | Mesenchymale Stammzelle |
| MW | Molecular Weight |

| | |
|-----------------------|--------------------------------------------------|
| NHLBI | National Heart, Lung, and Blood Institute |
| NK-Zelle | Natürliche Killerzelle |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| pAkt | phospho-Akt |
| Pat.-Nr. | Patientennummer |
| PBS | Phosphate-Buffered Saline |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| PDGFR α | Platelet-Derived Growth Factor Receptor α |
| PE | Phycoerythrin |
| PerCP | Peridininchlorophyllprotein |
| PGE2 | Prostaglandin E2 |
| PI3K | Phosphatidylinositol-3-Kinase |
| Rac1 | Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate 1 |
| RIPA | Radio Immunoprecipitation Assay |
| SDS | Sodium Dodecyl Sulfate |
| SGA | Small for Gestational Age |
| siRNA | Small Interfering Ribonucleic Acid |
| SMA | Smooth Muscle Actin |
| SSC | Side Scatter |
| SSW | Schwangerschaftswoche post menstruationem |
| STAT | Signal Transducer and Activator of Transcription |
| TBS | Tris-Buffered Saline |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| TGF β | Transforming Growth Factor β |
| T _H -Zelle | T-Helferzelle |
| TNF α | Tumor Necrosis Factor α |

| | |
|-------------------------|--------------------------------------|
| T _{Reg} -Zelle | Regulatorische T-Zelle |
| u. a. | unter anderem |
| V500 | Violet 500 |
| VEGFA | Vascular Endothelial Growth Factor A |
| VE-Wasser | Vollentsalztes Wasser |
| VLBW | Very Low Birth Weight |
| vs. | versus |
| Z. n. | Zustand nach |

G. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 1: Wirkungen autologer und allogener MSC der Lunge | 5 |
| Abbildung 2: PI3K/Akt-Signalweg | 8 |
| Abbildung 3: Forschungsfragen | 9 |
| Abbildung 4: Hypothesen..... | 10 |
| Abbildung 5: Herkunft der Gewebeproben | 11 |
| Abbildung 6: Antikörper und Färbungen | 16 |
| Abbildung 7: Fragestellungen und verwendete Methoden..... | 20 |
| Abbildung 8: Kultivierungsprotokoll | 21 |
| Abbildung 9: Durchflusszytometrische Gating-Strategie..... | 26 |
| Abbildung 10: Adipogene Differenzierung..... | 30 |
| Abbildung 11: Osteogene Differenzierung..... | 30 |
| Abbildung 12: Phänotypisierung | 31 |
| Abbildung 13: Zellmorphologie bei Versuchsbeginn | 33 |
| Abbildung 14: Zellmorphologie nach Interventionsende..... | 33 |
| Abbildung 15: Zellzahl und Zellexpansionsindex | 34 |
| Abbildung 16: Zelluläre Seneszenz nach Interventionsende..... | 35 |
| Abbildung 17: Zellexpansionsindex und programmierter Zelltod | 36 |
| Abbildung 18: Expression von PDGFR α und α SMA | 38 |
| Abbildung 19: Expression von p21 | 39 |
| Abbildung 20: Expression von phospho-Akt | 40 |
| Abbildung 21: Expression von p21 unter p21-Inhibition..... | 41 |
| Abbildung 22: Zellzahl und programmierter Zelltod unter p21-Inhibition..... | 42 |
| Abbildung 23: Expression von phospho-Akt unter Akt-Inhibition..... | 44 |
| Abbildung 24: Expression von p21 unter Akt-Inhibition..... | 46 |
| Abbildung 25: Zellmorphologie bei Versuchsbeginn | 47 |
| Abbildung 26: Zellmorphologie nach Interventionsende und nach Weiterkultivierung | 48 |
| Abbildung 27: Ergebnisse | 52 |

H. LITERATURVERZEICHNIS

Ahmad, Aftab; Ahmad, Shama; Chang, Ling-Yi; Schaack, Jerome; White, Carl W. (2006): Endothelial Akt activation by hyperoxia: role in cell survival. In: *Free radical biology & medicine* 40 (7), S. 1108–1118. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.10.045.

Ahn, So Yoon; Chang, Yun Sil; Lee, Myung Hee; Sung, Se In; Lee, Byong Sop; Kim, Ki Soo et al. (2021): Stem cells for bronchopulmonary dysplasia in preterm infants: A randomized controlled phase II trial. In: *Stem cells translational medicine* 10 (8), S. 1129–1137. DOI: 10.1002/sctm.20-0330.

Augustine, Sajit; Avey, Marc T.; Harrison, Brittany; Locke, Tiffany; Ghannad, Mona; Moher, David; Thébaud, Bernard (2017): Mesenchymal Stromal Cell Therapy in Bronchopulmonary Dysplasia: Systematic Review and Meta-Analysis of Preclinical Studies. In: *Stem cells translational medicine* 6 (12), S. 2079–2093. DOI: 10.1002/sctm.17-0126.

Beeravolu, Naimisha; McKee, Christina; Alamri, Ali; Mikhael, Sasha; Brown, Christina; Perez-Cruet, Mick; Chaudhry, G. Rasul (2017): Isolation and Characterization of Mesenchymal Stromal Cells from Human Umbilical Cord and Fetal Placenta. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (122). DOI: 10.3791/55224.

Behnke, Judith; Dippel, Constanze M.; Choi, Yesi; Rekers, Lisa; Schmidt, Annesuse; Lauer, Tina et al. (2021): Oxygen Toxicity to the Immature Lung-Part II: The Unmet Clinical Need for Causal Therapy. In: *International journal of molecular sciences* 22 (19). DOI: 10.3390/ijms221910694.

Behnke, Judith; Goetz, Maurizio J.; Holzfurtner, Lena; Korte, Pauline; Weiss, Astrid; Shahzad, Tayyab et al. (2024): Senescence of lung mesenchymal stem cells of preterm infants by cyclic stretch and hyperoxia via p21. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. DOI: 10.1152/ajplung.00355.2023.

Behnke, Judith; Kremer, Sarah; Shahzad, Tayyab; Chao, Cho-Ming; Böttcher-Friebertshäuser, Eva; Morty, Rory E. et al. (2020): MSC Based Therapies-New Perspectives for the Injured Lung. In: *Journal of clinical medicine* 9 (3). DOI: 10.3390/jcm9030682.

Benny, Merline; Courchia, Benjamin; Shrager, Sebastian; Sharma, Mayank; Chen, Pingping; Duara, Joanne et al. (2022): Comparative Effects of Bone Marrow-derived

Versus Umbilical Cord Tissue Mesenchymal Stem Cells in an Experimental Model of Bronchopulmonary Dysplasia. In: *Stem cells translational medicine* 11 (2), S. 189–199. DOI: 10.1093/stcltm/szab011.

Bland, Richard D.; Mokres, Lucia M.; Ertsey, Robert; Jacobson, Berit E.; Jiang, Shu; Rabinovitch, Marlene et al. (2007): Mechanical ventilation with 40% oxygen reduces pulmonary expression of genes that regulate lung development and impairs alveolar septation in newborn mice. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 293 (5), L1099-110. DOI: 10.1152/ajplung.00217.2007.

Bonner, James C.; Osornio-Vargas, Alvaro R.; Badgett, Annette; Brody, Arnold R. (1991): Differential proliferation of rat lung fibroblasts induced by the platelet-derived growth factor-AA, -AB, and -BB isoforms secreted by rat alveolar macrophages. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 5 (6), S. 539–547. DOI: 10.1165/ajrcmb/5.6.539.

Boström, H.; Willetts, K.; Pekny, M.; Levéen, P.; Lindahl, P.; Hedstrand, H. et al. (1996): PDGF-A signaling is a critical event in lung alveolar myofibroblast development and alveogenesis. In: *Cell* 85 (6), S. 863–873. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81270-2.

Chang, Yun Sil; Ahn, So Yoon; Yoo, Hye Soo; Sung, Se In; Choi, Soo Jin; Oh, Won Il; Park, Won Soon (2014): Mesenchymal stem cells for bronchopulmonary dysplasia: phase 1 dose-escalation clinical trial. In: *The Journal of pediatrics* 164 (5), 966-972.e6. DOI: 10.1016/j.jpeds.2013.12.011.

Chawanpaiboon, Saifon; Vogel, Joshua P.; Moller, Ann-Beth; Lumbiganon, Pisake; Petzold, Max; Hogan, Daniel et al. (2019): Global, regional, and national estimates of levels of preterm birth in 2014: a systematic review and modelling analysis. In: *The Lancet Global Health* 7 (1), e37-e46. DOI: 10.1016/S2214-109X(18)30451-0.

Chen, Jiezhong; Crawford, Ross; Chen, Chen; Xiao, Yin (2013): The key regulatory roles of the PI3K/Akt signaling pathway in the functionalities of mesenchymal stem cells and applications in tissue regeneration. In: *Tissue engineering. Part B, Reviews* 19 (6), S. 516–528. DOI: 10.1089/ten.TEB.2012.0672.

Collins, Jennifer J. P.; Tibboel, Dick; Kleer, Ismé M. de; Reiss, Irwin K. M.; Rottier, Robbert J. (2017): The Future of Bronchopulmonary Dysplasia: Emerging

Pathophysiological Concepts and Potential New Avenues of Treatment. In: *Frontiers in medicine* 4, S. 61. DOI: 10.3389/fmed.2017.00061.

Darby, Ian; Skalli, Omar; Gabbiani, Giulio (1990): Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 63 (1), S. 21–29.

Debacq-Chainiaux, Florence; Erusalimsky, Jorge D.; Campisi, Judith; Toussaint, Olivier (2009): Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. In: *Nature protocols* 4 (12), S. 1798–1806. DOI: 10.1038/nprot.2009.191.

Dimri, Goberdhan P.; Lee, Xinhua; Basile, George; Acosta, Meileen; Scott, Glynis; Roskelley, Calvin et al. (1995): A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (20), S. 9363–9367. DOI: 10.1073/pnas.92.20.9363.

Dominici, Massimo; Le Blanc, Katarina; Mueller, Ingo; Slaper-Cortenbach, Ineke; Marini, Frank C.; Krause, Diane S. et al. (2006): Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. In: *Cytotherapy* 8 (4), S. 315–317. DOI: 10.1080/14653240600855905.

Farahani, Ramin M.; Xaymardan, Munira (2015): Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha as a Marker of Mesenchymal Stem Cells in Development and Stem Cell Biology. In: *Stem cells international* 2015, S. 362753. DOI: 10.1155/2015/362753.

Friedenstein, Alexander J.; Gorskaja, Yulya F.; Kulagina, NN. (1976): Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. In: *Experimental hematology* 4 (5), S. 267–274.

Goetz, Maurizio J.; Kremer, Sarah; Behnke, Judith; Staude, Birte; Shahzad, Tayyab; Holzfurtner, Lena et al. (2021): MSC Based Therapies to Prevent or Treat BPD-A Narrative Review on Advances and Ongoing Challenges. In: *International journal of molecular sciences* 22 (3). DOI: 10.3390/ijms22031138.

Gough, Aisling; Spence, Dale; Linden, Mark; Halliday, Henry L.; McGarvey, Lorcan P. A. (2012): General and respiratory health outcomes in adult survivors of

bronchopulmonary dysplasia: a systematic review. In: *Chest* 141 (6), S. 1554–1567.
DOI: 10.1378/chest.11-1306.

Haniffa, Muzlifah A.; Collin, Matthew P.; Buckley, Christopher D.; Dazzi, Francesco (2009): Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? In: *Haematologica* 94 (2), S. 258–263. DOI: 10.3324/haematol.13699.

Hayflick, Leonard; Moorhead, Paul S. (1961): The serial cultivation of human diploid cell strains. In: *Experimental Cell Research* 25 (3), S. 585–621. DOI: 10.1016/0014-4827(61)90192-6.

Helt, C. E.; Rancourt, R. C.; Staversky, R. J.; O'Reilly, M. A. (2001): p53-dependent induction of p21(Cip1/WAF1/Sdi1) protects against oxygen-induced toxicity. In: *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 63 (2), S. 214–222. DOI: 10.1093/toxsci/63.2.214.

Hennrick, Kenneth T.; Keeton, Angela G.; Nanua, Suparna; Kijek, Theresa G.; Goldsmith, Adam M.; Sajjan, Umadevi S. et al. (2007): Lung cells from neonates show a mesenchymal stem cell phenotype. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 175 (11), S. 1158–1164. DOI: 10.1164/rccm.200607-941OC.

Higgins, Rosemary D.; Jobe, Alan H.; Koso-Thomas, Marion; Bancalari, Eduardo; Viscardi, Rose M.; Hartert, Tina V. et al. (2018): Bronchopulmonary Dysplasia: Executive Summary of a Workshop. In: *The Journal of pediatrics* 197, S. 300–308. DOI: 10.1016/j.jpeds.2018.01.043.

Holzfurtner, Lena; Shahzad, Tayyab; Dong, Ying; Rekers, Lisa; Selting, Ariane; Staude, Birte et al. (2022): When inflammation meets lung development-an update on the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. In: *Molecular and cellular pediatrics* 9 (1), S. 7. DOI: 10.1186/s40348-022-00137-z.

IQTIG (2023a): Geburtshilfe. Qualitätsindikatoren und Kennzahlen. Bundesauswertung zum Erfassungsjahr 2022. Berlin. Online verfügbar unter https://iqtig.org/downloads/auswertung/2022/pmgebh/DeQS_PM-GEBH_2022_BUAW_Bund_2023-07-20.pdf, zuletzt geprüft am 19.08.2024.

IQTIG (2023b): Neonatologie. Qualitätsindikatoren und Kennzahlen. Bundesauswertung zum Erfassungsjahr 2022. Berlin. Online verfügbar unter

https://iqtig.org/downloads/auswertung/2022/pmneo/DeQS_PM-NEO_2022_BUAW_Bund_2023-07-20.pdf, zuletzt geprüft am 19.08.2024.

Islam, Jessica Y.; Keller, Roberta L.; Aschner, Judy L.; Hartert, Tina V.; Moore, Paul E. (2015): Understanding the Short- and Long-Term Respiratory Outcomes of Prematurity and Bronchopulmonary Dysplasia. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 192 (2), S. 134–156. DOI: 10.1164/rccm.201412-2142PP.

Jin, Hye Jin; Bae, Yun Kyung; Kim, Miyeon; Kwon, Soon-Jae; Jeon, Hong Bae; Choi, Soo Jin et al. (2013): Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy. In: *International journal of molecular sciences* 14 (9), S. 17986–18001. DOI: 10.3390/ijms140917986.

Jobe, Alan H.; Bancalari, Eduardo (2001): Bronchopulmonary dysplasia. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 163 (7), S. 1723–1729. DOI: 10.1164/ajrccm.163.7.2011060.

Jobe, Alan J. (1999): The new BPD: an arrest of lung development. In: *Pediatric research* 46 (6), S. 641–643. DOI: 10.1203/00006450-199912000-00007.

Kegg Pathway Database (2024): PI3K-Akt signaling pathway - Homo sapiens (human). Pathway hsa04151. Kyoto. Online verfügbar unter https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?hsa04151, zuletzt geprüft am 18.09.2024.

Kim, Faith; Bateman, David A.; Goldshtrom, Nimrod; Sahni, Rakesh; Wung, Jen Tien; Wallman-Stokes, Aaron (2021): Revisiting the definition of bronchopulmonary dysplasia in premature infants at a single center quaternary neonatal intensive care unit. In: *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association* 41 (4), S. 756–763. DOI: 10.1038/s41372-021-00980-4.

Lee, Soyoung; Schmitt, Clemens A. (2019): The dynamic nature of senescence in cancer. In: *Nature cell biology* 21 (1), S. 94–101. DOI: 10.1038/s41556-018-0249-2.

Li, Ying; Dowbenko, Donald; Lasky, Laurence A. (2002): AKT/PKB phosphorylation of p21Cip/WAF1 enhances protein stability of p21Cip/WAF1 and promotes cell survival. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (13), S. 11352–11361. DOI: 10.1074/jbc.M109062200.

- Liang, Wenqing; Chen, Xiaozhen; Zhang, Songou; Fang, Jian; Chen, Meikai; Xu, Yifan; Chen, Xuerong (2021): Mesenchymal stem cells as a double-edged sword in tumor growth: focusing on MSC-derived cytokines. In: *Cellular & molecular biology letters* 26 (1), S. 3. DOI: 10.1186/s11658-020-00246-5.
- Lim, Rebecca; Malhotra, Atul; Tan, Jean; Chan, Siow Teng; Lau, Sinne; Zhu, Dandan et al. (2018): First-In-Human Administration of Allogeneic Amnion Cells in Premature Infants With Bronchopulmonary Dysplasia: A Safety Study. In: *Stem cells translational medicine* 7 (9), S. 628–635. DOI: 10.1002/sctm.18-0079.
- Lin, Chuanchuan; He, Ye; Feng, Qian; Xu, Kun; Chen, Zhe; Tao, Bailong et al. (2021): Self-renewal or quiescence? Orchestrating the fate of mesenchymal stem cells by matrix viscoelasticity via PI3K/Akt-CDK1 pathway. In: *Biomaterials* 279, S. 121235. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2021.121235.
- Liu, Meichen; Lei, Hua; Dong, Ping; Fu, Xin; Yang, Zhigang; Yang, Ying et al. (2017): Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells from the Elderly Exhibit Decreased Migration and Differentiation Abilities with Senescent Properties. In: *Cell transplantation* 26 (9), S. 1505–1519. DOI: 10.1177/0963689717721221.
- Londhe, Vedang A.; Sundar, Isaac K.; Lopez, Benjamin; Maisonet, Tiffany M.; Yu, Yang; Aghai, Zubair H.; Rahman, Irfan (2011): Hyperoxia impairs alveolar formation and induces senescence through decreased histone deacetylase activity and up-regulation of p21 in neonatal mouse lung. In: *Pediatric research* 69 (5 Pt 1), S. 371–377. DOI: 10.1203/PDR.0b013e318211c917.
- McElreavey, Kenneth D.; Irvine, Alexandra I.; Ennis, Kevin T.; McLean, W. H. Irwin (1991): Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. In: *Biochemical Society transactions* 19 (1), 29S. DOI: 10.1042/bst019029s.
- McGrath-Morrow, Sharon A.; Cho, Cecilia; Soutiere, Shawn; Mitzner, Wayne; Tuder, Rubin (2004): The effect of neonatal hyperoxia on the lung of p21Waf1/Cip1/Sdi1-deficient mice. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 30 (5), S. 635–640. DOI: 10.1165/rcmb.2003-0049OC.
- McKinnon, Katherine M. (2018): Flow Cytometry: An Overview. In: *Current protocols in immunology* 120, 5.1.1-5.1.11. DOI: 10.1002/cpim.40.

- Mera-Rodríguez, José Antonio de; Álvarez-Hernán, Guadalupe; Gañán, Yolanda; Martín-Partido, Gervasio; Rodríguez-León, Joaquín; Francisco-Morcillo, Javier (2021): Is Senescence-Associated β -Galactosidase a Reliable in vivo Marker of Cellular Senescence During Embryonic Development? In: *Frontiers in cell and developmental biology* 9, S. 623175. DOI: 10.3389/fcell.2021.623175.
- Möbius, Marius A.; Freund, Daniel; Vadivel, Arul; Koss, Sarah; McConaghy, Suzanne; Ohls, Robin K. et al. (2019): Oxygen Disrupts Human Fetal Lung Mesenchymal Cells. Implications for Bronchopulmonary Dysplasia. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 60 (5), S. 592–600. DOI: 10.1165/rcmb.2018-0358OC.
- Nicholson, Karleen M.; Anderson, Neil G. (2002): The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. In: *Cellular signalling* 14 (5), S. 381–395. DOI: 10.1016/s0898-6568(01)00271-6.
- Northway, William H.; Rosan, Robert C.; Porter, David Y. (1967): Pulmonary disease following respirator therapy of hyaline-membrane disease. Bronchopulmonary dysplasia. In: *The New England journal of medicine* 276 (7), S. 357–368. DOI: 10.1056/NEJM196702162760701.
- Oak, Prajakta; Pritzke, Tina; Thiel, Isabella; Koschlig, Markus; Mous, Daphne S.; Windhorst, Anita et al. (2017): Attenuated PDGF signaling drives alveolar and microvascular defects in neonatal chronic lung disease. In: *EMBO molecular medicine* 9 (11), S. 1504–1520. DOI: 10.15252/emmm.201607308.
- Pillai-Kastoori, Lakshmi; Schutz-Geschwender, Amy R.; Harford, Jeff A. (2020): A systematic approach to quantitative Western blot analysis. In: *Analytical biochemistry* 593, S. 113608. DOI: 10.1016/j.ab.2020.113608.
- Plasilova, Magdalena; Schonmyer, Bjorn; Fernandez, John; Clavin, Nicholas; Soares, Mark; Mehrara, Babak J. (2009): Accelerating stem cell proliferation by down-regulation of cell cycle regulator p21. In: *Plastic and reconstructive surgery* 123 (2 Suppl), 149S-157S. DOI: 10.1097/PRS.0b013e318191c82b.
- Popova, Antonia P.; Bentley, J. Kelley; Cui, Tracy X.; Richardson, Michelle N.; Linn, Marisa J.; Lei, Jing et al. (2014): Reduced platelet-derived growth factor receptor expression is a primary feature of human bronchopulmonary dysplasia. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 307 (3), L231-9. DOI: 10.1152/ajplung.00342.2013.

- Rahmani-Moghadam, Ebrahim; Zarrin, Vahideh; Mahmoodzadeh, Amir; Owrang, Marzieh; Talaei-Khozani, Tahereh (2022): Comparison of the Characteristics of Breast Milk-derived Stem Cells with the Stem Cells Derived from the Other Sources: A Comparative Review. In: *Current stem cell research & therapy* 17 (1), S. 71–90. DOI: 10.2174/1574888X16666210622125309.
- Rehman, Sana; Bacha, Dhouha (2022): StatPearls. Embryology, Pulmonary. Treasure Island (FL).
- Reicherzer, Tobias; Häffner, Susanne; Shahzad, Tayyab; Gronbach, Judith; Mysliwietz, Josef; Hübener, Christoph et al. (2018): Activation of the NF- κ B pathway alters the phenotype of MSCs in the tracheal aspirates of preterm infants with severe BPD. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 315 (1), L87-L101. DOI: 10.1152/ajplung.00505.2017.
- Renesme, Laurent; Pierro, Maria; Cobey, Kelly D.; Mital, Rhea; Nangle, Kennedy; Shorr, Risa et al. (2022): Definition and Characteristics of Mesenchymal Stromal Cells in Preclinical and Clinical Studies: A Scoping Review. In: *Stem cells translational medicine* 11 (1), S. 44–54. DOI: 10.1093/stcltm/szab009.
- Ross, Russell; Glomset, John; Kariya, Beverly; Harker, Laurence (1974): A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71 (4), S. 1207–1210. DOI: 10.1073/pnas.71.4.1207.
- Sethe, Sebastian; Scutt, Andrew; Stolzing, Alexandra (2006): Aging of mesenchymal stem cells. In: *Ageing research reviews* 5 (1), S. 91–116. DOI: 10.1016/j.arr.2005.10.001.
- Staal, Stephen P.; Hartley, Janet W.; Rowe, Will P. (1977): Isolation of transforming murine leukemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (7), S. 3065–3067. DOI: 10.1073/pnas.74.7.3065.
- Thébaud, Bernard (2018): Stem cell-based therapies in neonatology: a new hope. In: *Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition* 103 (6), F583-F588. DOI: 10.1136/archdischild-2017-314451.

Thébaud, Bernard; Goss, Kara N.; Laughon, Matthew; Whitsett, Jeffrey A.; Abman, Steven H.; Steinhorn, Robin H. et al. (2019): Bronchopulmonary dysplasia. In: *Nature reviews. Disease primers* 5 (1), S. 78. DOI: 10.1038/s41572-019-0127-7.

Vembadi, Abhishek; Menachery, Anoop; Qasaimeh, Mohammad A. (2019): Cell Cytometry: Review and Perspective on Biotechnological Advances. In: *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 7. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00147.

Wang, Hwai-Shi; Hung, Shih-Chieh; Peng, Shu-Tine; Huang, Chun-Chieh; Wei, Hung-Mu; Guo, Yi-Jhih et al. (2004): Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 22 (7), S. 1330–1337. DOI: 10.1634/stemcells.2004-0013.

Wang, Zun; Li, Xiaohua; Yang, Junxiao; Gong, Yun; Zhang, Huixi; Qiu, Xiang et al. (2021): Single-cell RNA sequencing deconvolutes the in vivo heterogeneity of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. In: *International journal of biological sciences* 17 (15), S. 4192–4206. DOI: 10.7150/ijbs.61950.

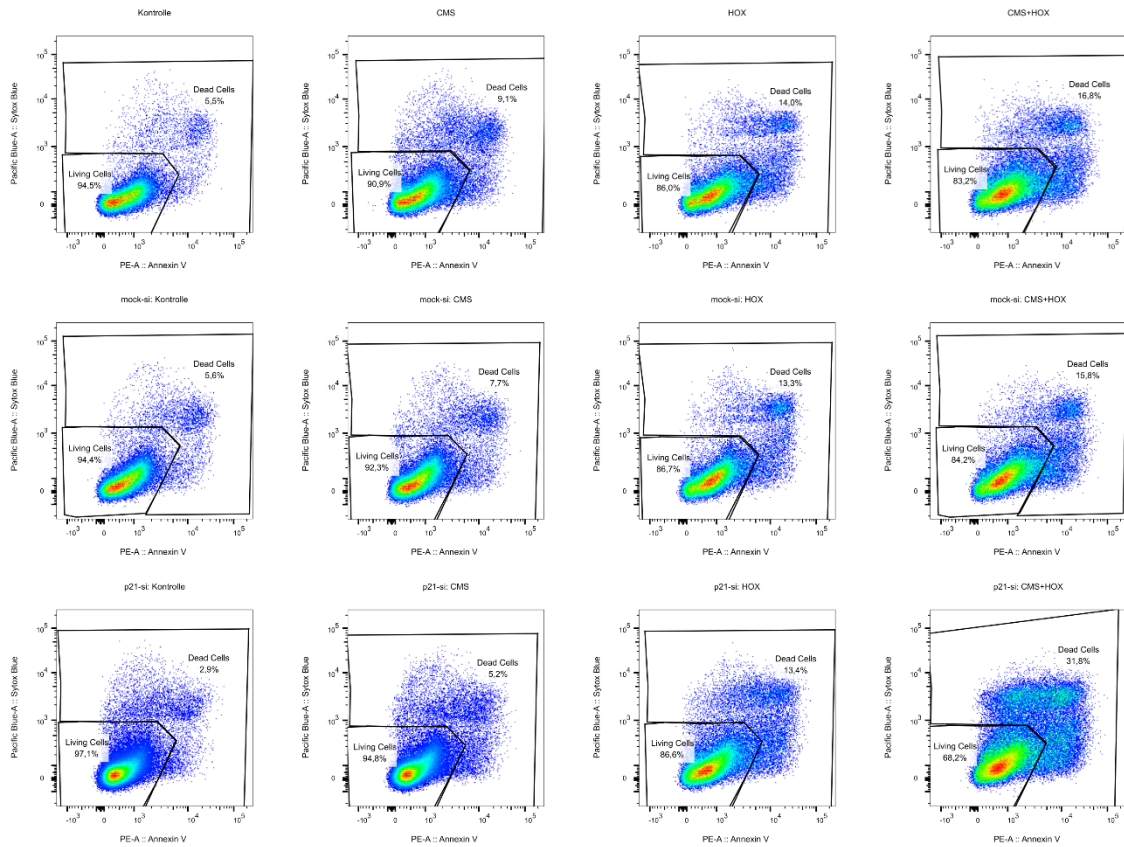
WHO (2004): International statistical classification of diseases and related health problems. 10. rev., 2. ed. Genf (2).

Xia, Yunqiu; Lang, Tingyuan; Niu, Yuqin; Wu, Xian; Zhou, Ou; Dai, Jihong et al. (2023): Phase I trial of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells for treatment of severe bronchopulmonary dysplasia. In: *Genes & diseases* 10 (2), S. 521–530. DOI: 10.1016/j.gendis.2022.02.001.

I. ANHANG

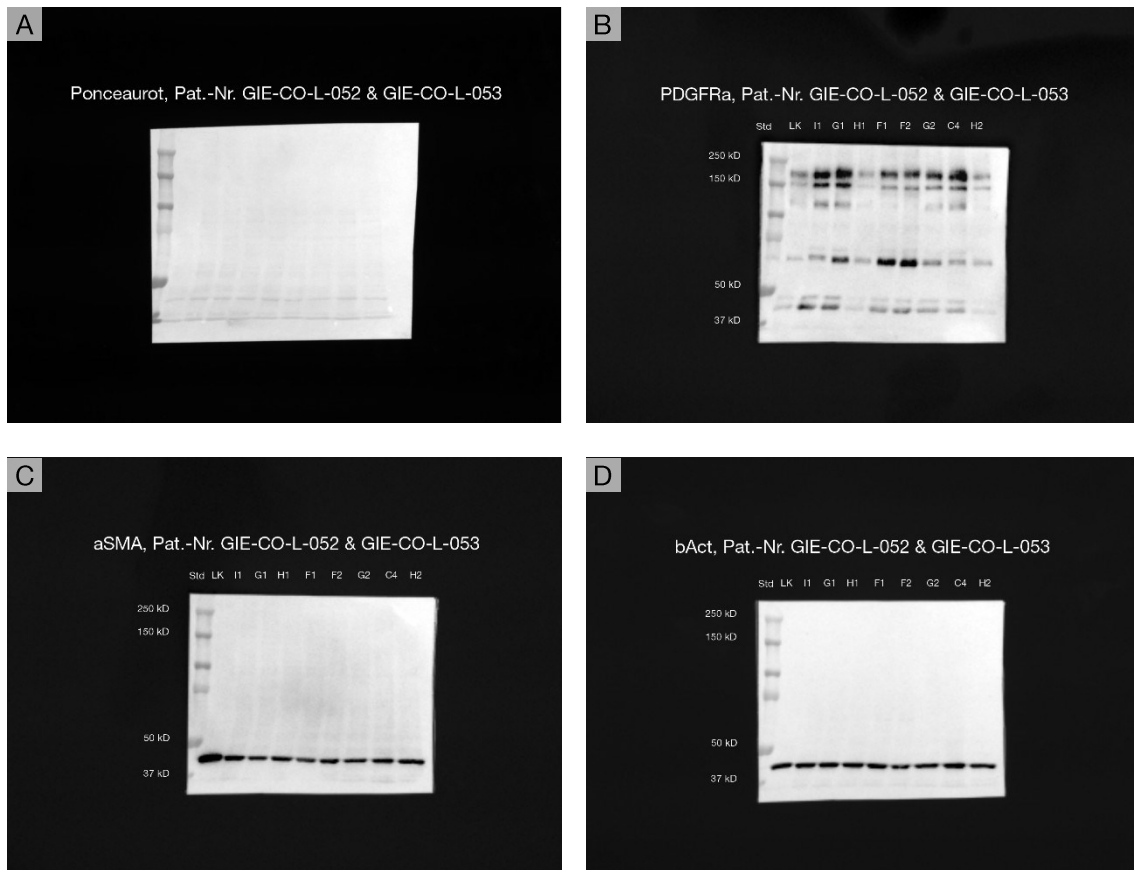
| | |
|------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Anlage 1: Durchflusszytometrische Messung; vollständige Darstellung..... | XXII |
| Anlage 2: PDGFR α und α SMA; repräsentativer Western Blot..... | XXIII |
| Anlage 3: p21; repräsentativer Western Blot | XXIV |
| Anlage 4: phospho-Akt; repräsentativer Western Blot..... | XXV |
| Anlage 5: p21 unter Akt-Inhibitor; repräsentativer Western Blot..... | XXVI |

Anlage 1: Durchflusszytometrische Messung; vollständige Darstellung



Repräsentative durchflusszytometrische Messung; nicht inhibierte Proben: n=12; p21-Inhibition: n=7

Anlage 2: PDGFR α und α SMA; repräsentativer Western Blot

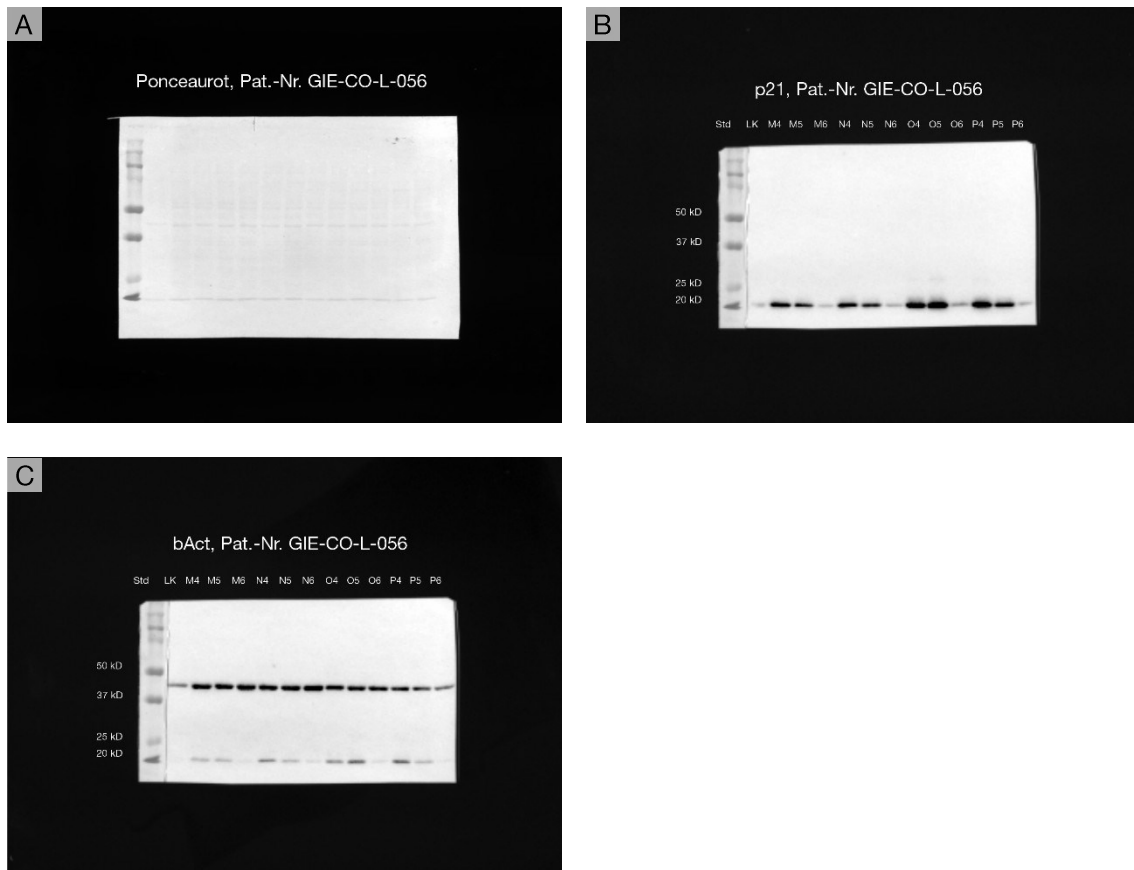


| | |
|----|--------------------------------------------------------------------------|
| LK | 10 μ g Protein |
| I1 | 72 h, 21 % Sauerstoff, kein CMS, keine Inhibition, Pat.-Nr. GIE-CO-L-052 |
| G1 | 72 h, 21 % Sauerstoff, CMS, keine Inhibition, Pat.-Nr. GIE-CO-L-052 |
| H1 | 72 h, 80 % Sauerstoff, kein CMS, keine Inhibition, Pat.-Nr. GIE-CO-L-052 |
| F1 | 72 h, 80 % Sauerstoff, CMS, keine Inhibition, Pat.-Nr. GIE-CO-L-052 |
| F2 | 72 h, 80 % Sauerstoff, CMS, keine Inhibition, Pat.-Nr. GIE-CO-L-053 |
| G2 | 72 h, 21 % Sauerstoff, CMS, keine Inhibition, Pat.-Nr. GIE-CO-L-053 |
| C4 | 72 h, 21 % Sauerstoff, kein CMS, keine Inhibition, Pat.-Nr. GIE-CO-L-053 |
| H2 | 72 h, 80 % Sauerstoff, kein CMS, keine Inhibition, Pat.-Nr. GIE-CO-L-053 |

A: Proteinübersichtsfärbung, B: PDGFR α , C: α SMA, D: β -Actin

Repräsentativer Western Blot für n=3; für PDGFR α wurde die Doppelbande bei rund 190 kD quantifiziert

Anlage 3: p21; repräsentativer Western Blot

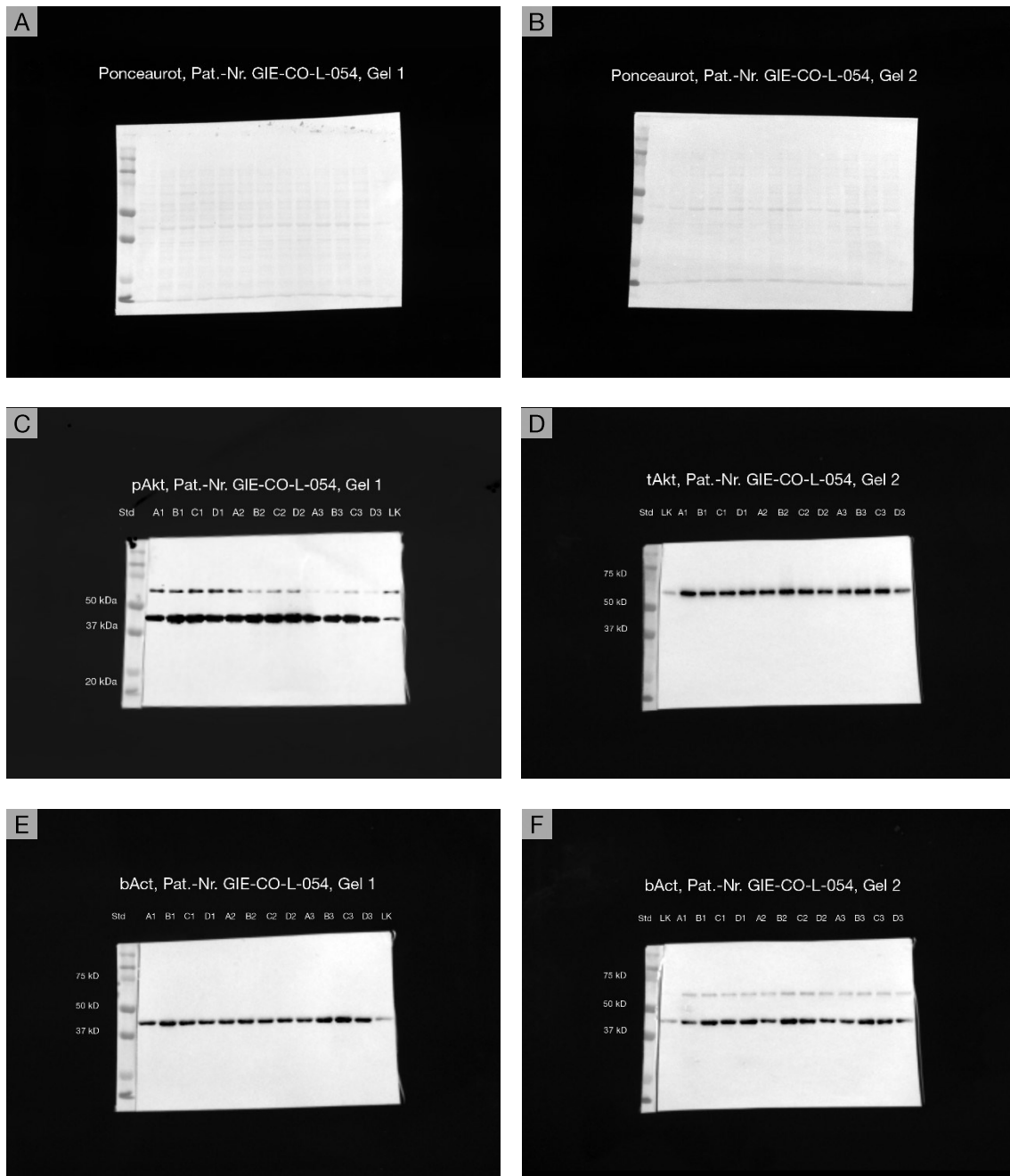


| | |
|----|--------------------------------------------------------------------------|
| LK | 5 µg Protein |
| M4 | 24 h, 21 % Sauerstoff, kein CMS, keine Inhibition, Pat.-Nr. GIE-CO-L-056 |
| M5 | 24 h, 21 % Sauerstoff, kein CMS, mock-siRNA, Pat.-Nr. GIE-CO-L-056 |
| M6 | 24 h, 21 % Sauerstoff, kein CMS, p21-siRNA, Pat.-Nr. GIE-CO-L-056 |
| N4 | 24 h, 21 % Sauerstoff, CMS, keine Inhibition, Pat.-Nr. GIE-CO-L-056 |
| N5 | 24 h, 21 % Sauerstoff, CMS, mock-siRNA, Pat.-Nr. GIE-CO-L-056 |
| N6 | 24 h, 21 % Sauerstoff, CMS, p21-siRNA, Pat.-Nr. GIE-CO-L-056 |
| O4 | 24 h, 80 % Sauerstoff, kein CMS, keine Inhibition, Pat.-Nr. GIE-CO-L-056 |
| O5 | 24 h, 80 % Sauerstoff, kein CMS, mock-siRNA, Pat.-Nr. GIE-CO-L-056 |
| O6 | 24 h, 80 % Sauerstoff, kein CMS, p21-siRNA, Pat.-Nr. GIE-CO-L-056 |
| P4 | 24 h, 80 % Sauerstoff, CMS, keine Inhibition, Pat.-Nr. GIE-CO-L-056 |
| P5 | 24 h, 80 % Sauerstoff, CMS, mock-siRNA, Pat.-Nr. GIE-CO-L-056 |
| P6 | 24 h, 80 % Sauerstoff, CMS, p21-siRNA, Pat.-Nr. GIE-CO-L-056 |

A: Proteinübersichtsfärbung, B: p21, C: β-Actin

Repräsentativer Western Blot für n=7

Anlage 4: phospho-Akt; repräsentativer Western Blot



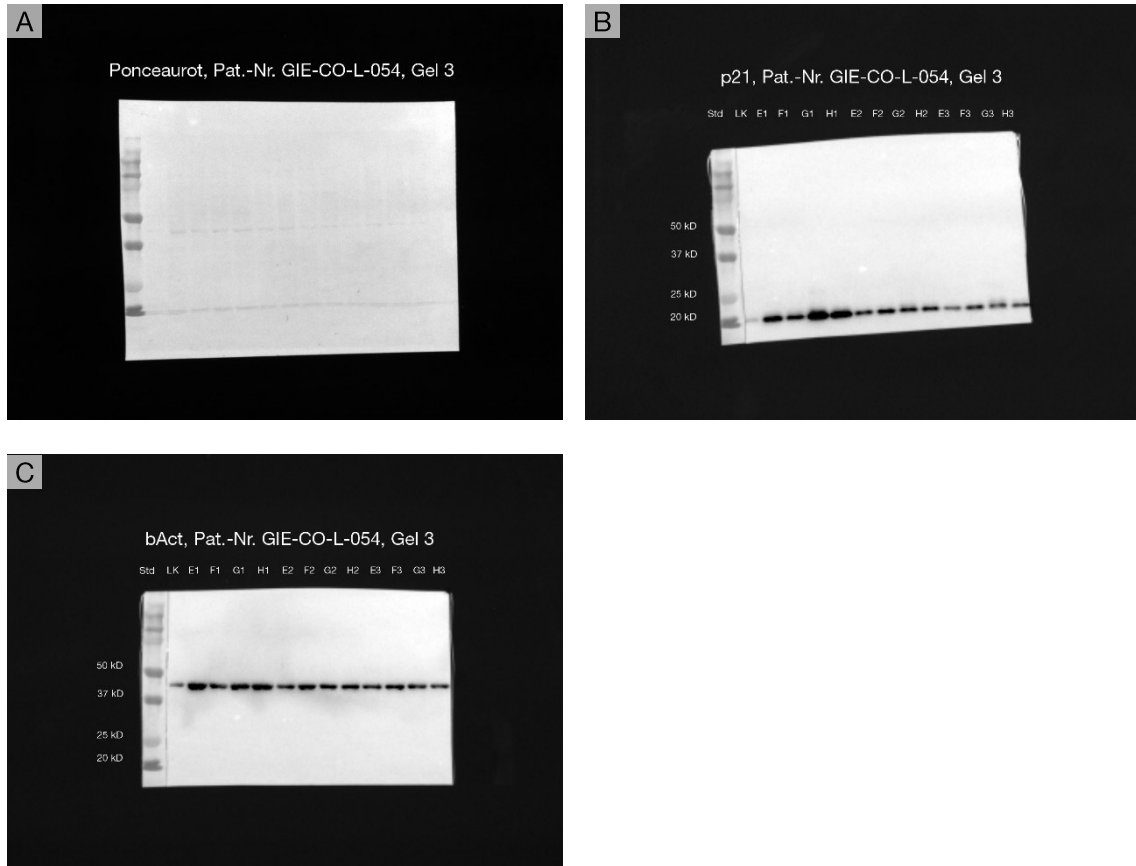
| | |
|----|--------------------------------------------------------------------------|
| LK | 10 µg Protein (Gel 1) / 5 µg Protein (Gel 2) |
| A1 | 12 h, 21 % Sauerstoff, kein CMS, keine Inhibition, Pat.-Nr. GIE-CO-L-054 |
| B1 | 12 h, 21 % Sauerstoff, CMS, keine Inhibition, Pat.-Nr. GIE-CO-L-054 |
| C1 | 12 h, 80 % Sauerstoff, kein CMS, keine Inhibition, Pat.-Nr. GIE-CO-L-054 |
| D1 | 12 h, 80 % Sauerstoff, CMS, keine Inhibition, Pat.-Nr. GIE-CO-L-054 |
| A2 | 12 h, 21 % Sauerstoff, kein CMS, Akt-Inh.: 1 µM, Pat.-Nr. GIE-CO-L-054 |
| B2 | 12 h, 21 % Sauerstoff, CMS, Akt-Inh.: 1 µM, Pat.-Nr. GIE-CO-L-054 |
| C2 | 12 h, 80 % Sauerstoff, kein CMS, Akt-Inh.: 1 µM, Pat.-Nr. GIE-CO-L-054 |
| D2 | 12 h, 80 % Sauerstoff, CMS, Akt-Inh.: 1 µM, Pat.-Nr. GIE-CO-L-054 |
| A3 | 12 h, 21 % Sauerstoff, kein CMS, Akt-Inh.: 3 µM, Pat.-Nr. GIE-CO-L-054 |
| B3 | 12 h, 21 % Sauerstoff, CMS, Akt-Inh.: 3 µM, Pat.-Nr. GIE-CO-L-054 |

| | |
|----|------------------------------------------------------------------------|
| C3 | 12 h, 80 % Sauerstoff, kein CMS, Akt-Inh.: 3 µM, Pat.-Nr. GIE-CO-L-054 |
| D3 | 12 h, 80 % Sauerstoff, CMS, Akt-Inh.: 3 µM, Pat.-Nr. GIE-CO-L-054 |

A: Proteinübersichtsfärbung Gel 1, B: Proteinübersichtsfärbung Gel 2, C: phospho-Akt Gel 1, D: Akt Gel 2, E: β-Actin Gel 1, F: β-Actin Gel 2

Repräsentativer Western Blot für n=3; für phospho-Akt wurde die Bande bei rund 60 kD quantifiziert

Anlage 5: p21 unter Akt-Inhibitor; repräsentativer Western Blot



| | |
|----|--------------------------------------------------------------------------|
| LK | 5 µg Protein |
| E1 | 24 h, 21 % Sauerstoff, kein CMS, keine Inhibition, Pat.-Nr. GIE-CO-L-054 |
| F1 | 24 h, 21 % Sauerstoff, CMS, keine Inhibition, Pat.-Nr. GIE-CO-L-054 |
| G1 | 24 h, 80 % Sauerstoff, kein CMS, keine Inhibition, Pat.-Nr. GIE-CO-L-054 |
| H1 | 24 h, 80 % Sauerstoff, CMS, keine Inhibition, Pat.-Nr. GIE-CO-L-054 |
| E2 | 24 h, 21 % Sauerstoff, kein CMS, Akt-Inh.: 1 µM, Pat.-Nr. GIE-CO-L-054 |
| F2 | 24 h, 21 % Sauerstoff, CMS, Akt-Inh.: 1 µM, Pat.-Nr. GIE-CO-L-054 |
| G2 | 24 h, 80 % Sauerstoff, kein CMS, Akt-Inh.: 1 µM, Pat.-Nr. GIE-CO-L-054 |
| H2 | 24 h, 80 % Sauerstoff, CMS, Akt-Inh.: 1 µM, Pat.-Nr. GIE-CO-L-054 |
| E3 | 24 h, 21 % Sauerstoff, kein CMS, Akt-Inh.: 3 µM, Pat.-Nr. GIE-CO-L-054 |
| F3 | 24 h, 21 % Sauerstoff, CMS, Akt-Inh.: 3 µM, Pat.-Nr. GIE-CO-L-054 |
| G3 | 24 h, 80 % Sauerstoff, kein CMS, Akt-Inh.: 3 µM, Pat.-Nr. GIE-CO-L-054 |
| H3 | 24 h, 80 % Sauerstoff, CMS, Akt-Inh.: 3 µM, Pat.-Nr. GIE-CO-L-054 |

A: Proteinübersichtsfärbung, B: p21, C: β-Actin

Repräsentativer Western Blot für n=3

J. PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

Behnke, Judith; Goetz, Maurizio J.; Holzfurtner, Lena; Korte, Pauline; Weiss, Astrid; Shahzad, Tayyab et al. (2024): Senescence of lung mesenchymal stem cells of preterm infants by cyclic stretch and hyperoxia via p21. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. DOI: 10.1152/ajplung.00355.2023.

Choi, Yesi; Rekers, Lisa; Dong, Ying; Holzfurtner, Lena; Goetz, Maurizio J.; Shahzad, Tayyab et al. (2021): Oxygen Toxicity to the Immature Lung-Part I: Pathomechanistic Understanding and Preclinical Perspectives. In: *International journal of molecular sciences* 22 (20). DOI: 10.3390/ijms222011006.

Goetz, Maurizio J.; Kremer, Sarah; Behnke, Judith; Staude, Birte; Shahzad, Tayyab; Holzfurtner, Lena et al. (2021): MSC Based Therapies to Prevent or Treat BPD-A Narrative Review on Advances and Ongoing Challenges. In: *International journal of molecular sciences* 22 (3). DOI: 10.3390/ijms22031138.

K. ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Gießen, den 20.10.2024

Maurizio Johannes Götz

L. DANKSAGUNG

Bei allen Eltern der eingeschlossenen Neugeborenen bedanke ich mich für das Vertrauen. Ich hoffe, der Verantwortung gerecht geworden zu sein.

Mein großer Dank gilt Prof. Dr. Harald Ehrhardt, für den diese Zeilen nie ausreichend wären – für die Möglichkeit, bei ihm promovieren zu können, für die stets besonnene und wertschätzende Art und für den überaus lehrreichen fachlichen Austausch.

Ebenfalls gilt mein großer Dank Dr. Judith Behnke für das leidenschaftliche Heranführen an die Grundlagenforschung, für die schlagfertige Hilfe bei Problemen und für die gemeinschaftliche Art bei der Arbeit an wissenschaftlichen Veröffentlichungen.

Ich danke außerdem der gesamten Arbeitsgruppe der Abteilung für Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie für die Unterstützung, insbesondere Prof. Dr. Klaus-Peter Zimmer, Prof. Dr. Silvia Rudloff, Prof. Dr. Bernd Neubauer, PhD Tayyab Shahzad, Dr. Sebastian Stricker, Gabriela Michel, Nadine Böcher, Larissa Thiessen, Lena Holzfurtner und Pauline Korte.

Für die gute Nachbarschaft bedanke ich mich bei den Arbeitsgruppen der Abteilungen für Pädiatrische Hämatologie, Onkologie & Immundefekte; für Pädiatrische Kardiologie, Intensivmedizin und angeborene Herzfehler; für pädiatrische Neurologie, Muskelerkrankungen & Sozialpädiatrie; für Lungenentwicklung und Stammzellen und für Klinische Immunologie, Transfusionsmedizin und Hämostaseologie. Insbesondere möchte ich Prof. Dr. Saverio Bellusci, PhD Stefano Rivetti, PhD Vijay Singh, PhD Tahira Zar, Paniz Adibi, Simone Schwalm, Susanne Süßlin, Ebru Erdogan, Kirstin Salser, Stefanie Garkisch, Paula Ames, Anne Baier und Lea Koog erwähnen.

Ich danke dem Team der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe für die Möglichkeit zum Sammeln von Gewebeproben, insbesondere Prof. Dr. Ivo Meinhold-Heerlein, Dr. Frank Oehmke, Dr. Ann Askevold und Ewa Pawlak.

Schließlich möchte ich in tiefer Dankbarkeit für Rat zu jeder Tages- und Nachtzeit meine Mama Dagmar, für Gelassenheit und Zuspruch meinen Papa Johannes, für den unerschütterlichen Glauben an mich meine Oma Margot und meine ganze Familie mit Andrea, Jana, Boris und Miryam erwähnen. Schön, dass es euch gibt!

