

Pulmonale Folgen intrauteriner Wachstumsrestriktion
- Etablierung eines Mausmodells -

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des
Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von Torsten Böhner
aus Betzdorf

Gießen 2006

Aus dem Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen
Direktor: Prof. Dr. med. Alfred Reiter

Gutachter: Privatdozent Dr. med. Irwin Reiss

Gutachter: Privatdozent Dr. med. Susanne Grüßner

Tag der Disputation: 02.08.2007

Für meine Familie

Wenn es nicht verdammt schwer war,
hast du etwas falsch gemacht.

Dan Brown

Teile dieser Arbeit wurden publiziert in:

Gortner L, Hilgendorff A, Bähner T, Ebsen M, Reiss I, Rudloff S,
Hypoxia-induced intrauterine growth retardation: effects on pulmonary development and surfactant protein transcription. Biol Neonate, 2005. 88(2): p. 129-35.

Bähner T, Rudloff S, Hilgendorff A, Seliger AS, Reiss I, Gortner L
Maternale Hypoxie induziert Intrauterine Growth Retardation (IUGR): Konzeption eines Maus – Modells. (Abstract) Z Geburtshilfe Neonatol, 2004. 208(S1)

Bähner T, Hilgendorff A, Rudloff S, Rawer D, Gortner L
Influence of intrauterine growth restriction on gene expression of surfactant associated proteins in preterm mice. (Abstract) Pediatric Research, 2004. 56(3): p. 472.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	9
1.1. Intrauterine Wachstumsrestriktion	9
1.2. Stadien der pulmonalen Differenzierung bei Mensch und Maus	13
1.3. Physiologische Funktion und pathologische Bedeutung der untersuchten Gene	15
1.3.1. Insulin like growth factor-1 (IGF-1) und Insulin like growth factor 1 receptor (IGF1-R)	16
1.3.2. Hypoxia-inducible Factor (HIF) und Vascular endothelial growth factor (VEGF)	18
1.3.3. Surfactant-System	21
1.3.4. Inflammationsmediatoren	24
1.4. Fragestellung	27
2. Material und Methoden	29
2.1. Materialien	29
2.2. Tierexperimentelle Arbeit	29
2.2.1. Studienziel	29
2.2.2. Studiendesign	29
2.2.3. Versuchsaufbau Hyxpoxie-/Normoxiekammer	32
2.3. Histologische Untersuchungen	33
2.4. Molekularbiologische Untersuchungen	34
2.4.1. Isolation und Aufarbeitung der RNA	34
2.4.2. Bestimmung und Anpassung von Nukleinsäurekonzentrationen	35
2.4.3. cDNA – Synthese	35
2.4.4. Real-time PCR	36
2.4.5. Quantifizierungsstrategien der real – time PCR	39
2.4.6. Real-time PCR praktische Durchführung	41
2.4.7. Auswertung am Taqman®	42
2.4.8. Evaluation der real-time PCR Methode	44
2.5. Statistik	47
2.5.1. Tierexperimenteller Teil	47

2.5.2. Molekularbiologischer Teil.....	47
3. Ergebnisse	48
3.1. Tierexperimentelle Untersuchungen	48
3.1.1. Auxologie	48
3.1.2. Histologische Lungenentwicklung	51
3.2. Molekularbiologische Untersuchungen	53
3.2.1. Evaluation der Housekeeping-Gene	53
3.2.2. Expression pulmonaler mRNA	55
4. Diskussion	62
4.1. Methodische Aspekte.....	62
4.1.1. Tierexperimenteller Teil.....	62
4.1.2. Histologische Aufarbeitung	63
4.1.3. Real-time PCR	63
4.2. Diskussion der Ergebnisse.....	65
4.2.1. Hypoxie-induzierte IUGR – Tierexperimentelle Aspekte des Maus- Modells	65
4.2.2. Charakterisierung des pulmonalen Entwicklungsstadiums und Übertragungsmöglichkeit auf den Menschen	68
4.2.3. Vergleichende histomorphometrische Untersuchungen der fetalen Lungen	69
4.2.4. Messung der pulmonalen mRNA Expression zur Charakterisierung pulmonaler Anpassungsmechanismen.....	70
4.2.5. Einfluss der hypoxie-induzierten Wachstumsrestriktion auf die pulmonale IGF-1 und IGF-1Rezeptor mRNA Expression.....	70
4.2.6. Einfluss der hypoxie-induzierten Wachstumsrestriktion auf die pulmonale HIF und VEGF mRNA Expressionen	72
4.2.7. Einfluss der hypoxie-induzierten Wachstumsrestriktion auf die Expression Surfactant assoziierter Proteine.....	76
4.2.8. Pulmonale mRNA Expression pro- und anti-inflammatorischer Mediatoren in der hypoxie-induzierten IUGR.....	78
5. Zusammenfassung	80
6. Summary	84
7. Literaturverzeichnis.....	87
8. Anhang	101

8.1. Materialien	101
8.1.1. Sequenzen Primer und Sonden	101
8.1.2. Chemikalien und Substanzen.....	103
8.1.3. Enzyme und Kits	104
8.1.4. Geräte	104
8.1.5. Arbeitsmaterial	105
9. Erklärung	108
10. Lebenslauf	109
11. Danksagung.....	110

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Vergleichende Lungenentwicklung Mensch und Maus	14
Abbildung 2.1 Tierexperimenteller Versuchsablauf	29
Abbildung 2.2 Situs bei Hysterotomie.....	30
Abbildung 2.3 Lungenpräparation am thorakotomierten Feten.....	31
Abbildung 2.4 Aufbau der Hypoxie-/Normoxiekammer	32
Abbildung 2.6 Änderung der Fluoreszenzintensität im Fluoreszenzspektrum des Reporterfarbstoffs zu Beginn und am Ende der PCR.....	37
Abbildung 2.7 Taqman®-Aufzeichnung der Amplifikationskurven. Reportersignal- zunahme ΔR_n in Abhängigkeit vom PCR-Zyklus in halblogarithmischer Darstellung	42
Abbildung 3.1 Makroskopie zweier neonataler Feten unmittelbar nach Entbindung an Embryonaltag ET 17,5.....	48
Abbildung 3.2 Fetale auxologische Daten im Gruppenvergleich als Box-und-Whisker- Diagramme	49
Abbildung 3.3 Verhältnis der fetalen Kopfgößen zur Körperlänge im Vergleich zwischen Kontroll- und Hypoxiegruppe	50
Abbildung 3.4 Lichtmikroskopische Photographien fetaler Lungen der Normoxiegruppe am Embryonaltag ET 17,5.....	51
Abbildung 3.5 Histomorphometrische Untersuchungsergebnisse im Vergleich zwischen Kontroll- und Hypoxiegruppe	52
Abbildung 3.6 Box-und-Whisker-Diagramme des Quotienten der Housekeeping-Gen mRNA Expression zur Gesamt-cDNA im Gruppenvergleich	54
Abbildung 3.7 Relative pulmonale mRNA Expression von IGF-1 und IGF-1R	55
Abbildung 3.8 Relative pulmonale mRNA Expression von VEGF, VEGF1-R und VEGF2-R.....	56
Abbildung 3.9 Relative pulmonale mRNA Expression von HIF1- α und HIF2- α	57
Abbildung 3.10 Relative pulmonale mRNA Expression von SP-A und SP-D	58
Abbildung 3.11 Relative pulmonale mRNA Expression von SP-B und SP-C	58
Abbildung 3.12 Relative pulmonale mRNA Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-6, TNF-alpha sowie des anti-inflammatorischen IL-10.....	59
Abbildung 3.13 Korrelationsanalyse der pulmonalen mRNA Expression von VEGF und HIF-1 α sowie HIF-2 α	60
Abbildung 3.14 Streudiagramme der pulmonalen mRNA Expressionen	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 Maternale Risikofaktoren für die Entwicklung einer IUGR	10
Tabelle 1.2 Diagnostische Kriterien der BPD nach Jobe und Bancalari	11
Tabelle 3.1 Verhältnis der fetalen Kopfgröße/Körperlänge	50
Tabelle 3.2 Housekeeping-Gen-Evaluation, Quotient der mRNA Expression der Housekeeping-Gene zur gesamt cDNA.....	53
Tabelle 7.1 Auxologische fetale Daten	106

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
AEC	Alveolarepithelzellen
BAL	bronchoalveolären Lavage
BPD	bronchopulmonary dysplasia
cDNA	complementary DNA
CLD	chronic lung disease
CSIF	cytokine synthesis inhibitory factor, syn. IL-10
Ct	threshold cycle
d	Tag, day
DNA	deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EC	Endothelzelle
eNOS	endothelialen NO-Synthase
ET	Embryonaltag
EW	Embryonalwoche
FAM	carboxyfluorescein
FET	Förster Fluoreszenz Energietransfer
F _I O ₂	fraction of inspired oxygen
Flt	fms-liketyrosine kinase
GA	gestational age
gDNA	genomic deoxyribonucleic acid
HE	Hämatoxylin-Eosin
hGH	human growth hormon
HIF	hypoxia-inducible factor, HIF-1α-like factor (HLF), endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), member of the PAS superfamily 2 (MOP2)
IGF-1	insulin like growth factor 1
IGF1-R	insulin like growth factor 1 receptor

IGFBP	insulin like growth factor binding protein
IL	Interleukin
IUGR	intrauterine Wachstumsrestriktion
kDa	kilo Dalton
LB	Lamellar Bodies
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex
ml	Milliliter
ML	Monolayer
mM	milli-Molar
mRNA	messenger ribonucleic acid
MW	arithmetisches Mittel
n	Stichprobenanzahl
n.s.	nicht signifikant
NIH	national institutes of health
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NN	normal Null, Meereshöhe
NO	Stickstoffmonoxid
NTC	no template control
O ₂	Sauerstoff
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p.m.	post menstruationem
p.P.	post partum
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PL	Phospholipiden
PIGF	placental growth factor
RDS	respiratory distress syndrome
RNA	ribonucleic acid
ROX	carboxy-X-rhodamine
rpm	rotations per minute
r _s	Korrelationskoeffizient nach Spearman
RT	reverse Transkription

s	Sekunde
SEM	standard error of the mean
SF	surface active agent, Surfactant
SGA	small for gestational age
SP	Surfactant assoziierte Proteine
SP-A	Surfactant assoziiertes Protein A
SP-B	Surfactant assoziiertes Protein B
SP-C	Surfactant assoziiertes Protein C
SP-D	Surfactant assoziiertes Protein D
SSW	Schwangerschaftswoche
syn.	synonym
TAMRA	carboxytetramethylrhodamine
T _H -Zellen	T-Helferzellen
TM	tubuläres Myelin
TNF- α	tumor necrosis factor-alpha
U	Unit, Einheit
UK	united kingdom
UMM	universeller MasterMix
UNG	Uracil-N-Glycosylase
USA	United States of America
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
vs.	versus
w	Woche
wk	week
y	Jahr
$\Delta\Delta\text{Ct}$	Delta delta Ct
λ	Wellenlänge

1. Einleitung

1.1. Intrauterine Wachstumsrestriktion

Die intrauterine Wachstumsrestriktion (IUGR) wird als ein im Vergleich zur geographischen und ethnischen Referenzpopulation inadäquates pränatales Wachstum verstanden [1, 2]. Definitionsgemäß werden 10% der Geburten als *small for gestational age* (SGA) klassifiziert [2]. Ist die pathologische Ursache des verminderten intrauterinen Wachstums bekannt, so sind diese SGA-Patienten als intrauterin wachstumsretardiert zu bezeichnen [1]. Die IUGR tritt mit einer Häufigkeit von 4-6% aller Gestationen auf [3].

Die intrauterine Wachstumsrestriktion ist mit einer hohen perinatalen Morbidität und Mortalität assoziiert [2, 4-6]. Nach der Frühgeburt ist die IUGR der zweit- wichtigste Grund perinataler Mortalität [3]. Da sich bei IUGR Geburten die Wahrscheinlichkeit für eine spontane oder elektiven Frühgeburt entscheidend erhöht [7-10], gilt das Patientengut mit beiden Risikofaktoren, Frühgeburt und IUGR, als besonders gefährdet [4, 11]. So sind ca. 40% der elektiv zwischen der 22. und 36. Gestationswoche frühgeborenen Kinder als IUGR einzustufen [7].

Die neonatale Morbidität und Mortalität intrauterin wachstumsretardierter Frühgeborener steigt mit abnehmendem Gestationsalter im Vergleich zu den nicht wachstumsretardierten Frühgeborenen überproportional an [5, 6, 11-13]. Da IUGR Geburten ein hohes Maß an Hospitalisierung aufweisen, ist dieses Krankheitsbild nicht zuletzt auch von sozioökonomischer Bedeutung [4, 5].

Die IUGR wird entsprechend der kindlichen Proportionierung von Kopf zu Körper in asymmetrischen Typ I, ca. 75% der Fälle, und den symmetrischen oder hypoplastischen Typ II, ca. 25% der Fälle, eingeteilt [1, 14]. Der Übergang zwischen beiden Formen wird heute als fließend angesehen. Die IUGR Typ I entsteht vorwiegend in der späten Phase der Schwangerschaft, während die IUGR Typ II bereits in der frühen Phase der Schwangerschaft ausgelöst wird [15].

Bei Betrachtung der Ätiologie lassen sich drei Gruppen IUGR auslösender Faktoren identifizieren; genetische oder intrinsische Faktoren, ausgehend von Mutter oder Kind (I), umweltbedingte oder extrinsische Faktoren, die auf die Mutter einwirken oder von ihr ausgehen (II) sowie unbekannte Faktoren (III) [1].

Bei dem überwiegenden Teil der IUGR Geburten ist die Wachstumsrestriktion auf extrinsische Faktoren zurückzuführen [1]. Wesentliche extrinsische Faktoren, die eine IUGR bedingen, sind in Tabelle 1.1 aufgeführt.

Tabelle 1.1 Maternale Risikofaktoren für die Entwicklung einer IUGR [1, 2, 16, 17]

Schwangerschaftsinduzierte Hypertension, Präeklampsie
Chronische Infektion, Amnioninfektionssyndrom
Chronische Hypoxie bei Asthma, zyanotische Herzfehler, Cystische Fibrose
Diabetes, Glomerulonephritiden, Kollagenosen
Uterus- oder Plazentafehlbildungen
Nikotin- und Alkoholabusus
Drogen und Medikamente (Antikoagulantien, Antikonvulsiva)
Schwangerschaft in großer Höhe (über 2000m über NN)
Niedriger sozioökonomischer Status
Maternale Mangelernährung
Gerinnungsstörungen (z.B. Antiphospholipidsyndrom)

Bei der genaueren Betrachtung der postnatalen Morbidität intrauterin wachstumsretardierter Frühgeborener treten Komplikationen, wie die intraventrikuläre Hämorrhagie, die periventrikuläre Leukomalazie, der persistierender ductus arteriosus, die neonatale Sepsis und die nekrotisierende Enterokolitis [5, 6, 12] quantitativ hinter die wesentlich häufigeren pulmonalen Komplikationen [6, 12, 18, 19].

Bei den pulmonalen Erkrankungen ist zwischen der *acute* und *long-term pulmonary morbidity* zu differenzieren. Ein entscheidendes Krankheitsbild der *acute pulmonary morbidity* Frühgeborener mit IUGR ist das neonatale Atemnotsyndrom (RDS, *respiratory distress syndrome*). RDS ist eine Sammelbezeichnung für alle akuten mit Zyanose, Dyspnoe sowie der Notwendigkeit für zusätzliche respiratorische Unterstützung einhergehenden Zustände des Neugeborenen [20]. Die Inzidenz des RDS liegt bei Geburt im Gestationsalter von 24 Wochen bei annähernd 100% und fällt, wenn die Geburt zu einem späteren Zeitpunkt der Gestation erfolgt [4, 6]. Ob die IUGR als zusätzlicher Risikofaktor für die Entwicklung eines RDS des Neugeborenen anzusehen ist oder sogar eine protektive Wirkung auf dessen Entwicklung hat, wurde lange kontrovers diskutiert. In der Literatur finden sich bei Geburten mit intrauteriner Wachstumsrestriktion sowohl Belege für erniedrigtes oder gleiches [4, 21, 22] wie

auch erhöhtes Risiko [12, 23] für die Entwicklung eines RDS. Gründe für diese divergierenden Aussagen sind Fehlbestimmungen des Gestationsalters durch die Verwendung ungeeigneter Normogramme sowie uneinheitliche RDS-Diagnosekriterien [10]. Heute kann die IUGR, insbesondere bei Geburten mit niedrigem Gestationsalter (weniger als 27. SSW), als gesicherter zusätzlicher Risikofaktor für die Entwicklung eines RDS gelten [4, 6, 12].

Die bedeutendste Erkrankung der *long-term pulmonary morbidity* intrauterin wachstumsretardierter Frühgeborener ist die Bronchopulmonale Dysplasie (BPD, *bronchopulmonary dysplasia*). Vor allem IUGR-Frühgeborene unter der 30. Gestationswoche sind betroffen [24]. Die BPD ist eine multifaktoriell begründete Erkrankung, bei der die strukturelle und biochemische Immaturität der neonatalen Lunge eine erhöhte Vulnerabilität für postnatal einwirkende Noxen, wie Baro- und Volutrauma durch Beatmung, sowie Sauerstofftoxizität und Inflammation verursacht [24-26]. Jobe und Bancalari definieren die Diagnosekriterien der Bronchopulmonalen Dysplasie für Kinder, die vor der 32. Gestationswoche geboren wurden, als die Notwendigkeit von Sauerstoffsupplementation für mindestens 28 Tage. Der Schweregrad der BPD wird als retrospektive Diagnose bei Erreichen eines Alters von 36 Wochen p.m. durch die zu diesem Zeitpunkt notwendigen Therapiemaßnahmen bei persistierender Atemnotsymptomatik gestellt [24] (siehe Tabelle 1.2).

Tabelle 1.2 Diagnostische Kriterien der BPD nach Jobe und Bancalari [24]

Gestational Age	< 32 wk	≥ 32 wk
Time point of assessment	36 wk PMA or discharge to home, whichever comes first	> 28 d but < 56 d postnatal age or discharge to home, whichever comes first
Treatment with oxygen > 21% for at least 28 d plus		
Mild BPD	Breathing room air at 36 wk PMA or discharge, whichever comes first	Breathing room air by 56 d postnatal age or discharge, whichever comes first
Moderate BPD	Need for < 30% oxygen at 36 wk PMA or discharge, whichever comes first	Need for < 30% oxygen at 56 d postnatal age or discharge, whichever comes first
Severe BPD	Need for ≥ 30% oxygen and/or positive pressure, (PPV or NCPAP) at 36 wk PMA or discharge, whichever comes first	Need for ≥ 30% oxygen and/or positive pressure (PPV or NCPAP) at 56 d postnatal age or discharge, whichever comes first

Reiss et al. beschreiben eine Verdopplung der BPD Inzidenz bei nicht wachstumsretardierten Frühgeborenen mit einem Gestationsalter <32 Wochen von 14% auf 28% bei wachstumsretardierten Frühgeborenen [5]. Dies betont die Bedeutung der BPD für das Patientenkollektiv der Frühgeborenen mit Wachstumsrestriktion.

Barker stellte 1995 die Hypothese auf, dass gestörtes intrauterines Wachstum Konsequenzen für das gesamte Leben im Sinne intrauteriner Programmierung hat [27]. Sowohl durch tierexperimentelle Untersuchungen [28] als auch durch Langzeitbeobachtungen am Menschen konnte vielfach belegt werden, dass die Barkers Hypothese, IUGR stehe im Zusammenhang mit der koronaren Herzerkrankung [29] und Diabetes mellitus Typ II [30-32], berechtigt war. Die Annahme, die erhöhte Koinzidenz dieser Erkrankungen mit der IUGR sei durch die oft auch nach der neonatalen Periode persistierenden Risikofaktoren, z.B. niedriger sozialer Status, begründet, konnte nicht nachgewiesen werden [33, 34].

Barker erweiterte seine Hypothese der intrauterinen Programmierung auf die pulmonale Langzeitmorbidity [35]. Derzeit kann als belegt gelten, dass die IUGR unabhängig von zusätzlichen Risikofaktoren mit einer wesentlichen Einschränkung der Lungenfunktion von Geburt bis ins Erwachsenenalter einhergeht [36-39].

Aufgrund der hier dargelegten Bedeutung der intrauterinen Wachstumsrestriktion bei Frühgeborenen, ist es das Ziel dieser Arbeit, ein Tiermodell zur experimentellen Induktion einer IUGR zu etablieren, auf dessen Grundlage die pulmonalen Folgen der IUGR untersucht werden können.

Da aus der Vielzahl der IUGR auslösenden Faktoren, wie sie in Tabelle 1.1 aufgeführt sind, eine primäre oder sekundäre Plazentainsuffizienz mit konsekutiver fetaler Hypoxie und/oder fetaler Substratmangelversorgung resultiert [2, 40, 41], nutzen bestehende Tiermodelle eine experimentell induzierte Plazentainsuffizienz zur Induktion der IUGR. Die Plazentainsuffizienz wird in etablierten Tiermodellen entweder direkt durch Reduktion der utero-plazentaren Perfusion mittels Ligation der uterinen Gefäße [42, 43], bzw. Mikroembolisation der Plazenta [44, 45] oder indirekt durch Malnutrition der Mutter erzeugt [46]. Die vorliegende Studie nutzt maternale Hypoxie während der Gestation zur experimentellen Induktion einer IUGR bei frühgeborenen Mäusen.

Aufgrund der besonderen Bedeutung der pulmonalen Morbidität bei intrauterin wachstumsretardierten Frühgeborenen, ist das hier zu etablierende Modell Grundlage für die weitere Untersuchung pulmonaler Veränderungen der intrauterin wachstumsretardierten Mäuse.

Der Einfluss der hypoxie-induzierten intrauterinen Wachstumsrestriktion auf die Lungenentwicklung wird daher auf Ebene der histologischen pulmonalen Differenzierung sowie der pulmonalen mRNA Expression essentieller Gene der Lungenentwicklung und Lungenfunktion untersucht.

1.2. Stadien der pulmonalen Differenzierung bei Mensch und Maus [47-49]

In der vorliegenden Arbeit wird der potentielle Einfluss der IUGR auf die histologische Differenzierung der Lunge untersucht. Daher wird im Folgenden der chronologische und morphologische Ablauf der Lungenentwicklung bei Mensch und Maus vergleichend erläutert.

Die Lungenentwicklung wird in sechs, durch den Fortschritt der histologischen Differenzierung bestimmten, Stadien untergliedert. Die Übergänge zwischen den Stadien sind fließend und überschneidend.

Analog zu den humanen Verhältnissen entwickelt sich die Lungenanlage der Maus aus der Laryngotrachealrinne, einer ventralen Ausstülpung des Darmrohrs. Dies geschieht bei der Maus am Embryonaltag (ET) 9-9,5 und beim Menschen in der 5. Embryonalwoche (EW).

In der *Embryonalphase* (I) (Mensch 3-7 EW, Maus 9-9,5 ET) teilt sich die zunächst noch mit dem Darmrohr verbundene Trachea von diesem ab. Die Lungenanlage erhält Anschluss an die Kiemenbogenarterien und das linke Atrium.

Im *Pseudoglandulären Stadium* (II) (Mensch 5 – 17 EW, Maus 9,5 – 16,6 ET) bilden sich erste praeacinäre Lufträume. Im sich bildenden Bronchialbaum sind Inseln differenzierten Knorpels, Muskelgewebe und Bronchialdrüsen zu erkennen.

Das folgende *Kanalikuläre Stadium* (III) (Mensch 16 – 26 EW, Maus 16,6 – 17,4 ET) ist durch die Differenzierung von Typ I und II Alveolarepithelzellen (AEC) gekennzeichnet. Die Produktion des Lungensurfactant (SF) ist elektronenmikroskopisch anhand erster *lamellar bodies* (LB) in den AEC Typ II zu erkennen. Der Tracheobronchialbaum ist ausgereift.

Im *Sakkulären Stadium* (IV) (Mensch 24 EW – Geburt, Maus 17,4 ET – 5 postnataler Tag) werden die distalen Lufträume ausgebildet. Es kommt zu einer dramatischen Reduktion der Interzellulärsubstanz. Der Surfactant wird nach intraalveolär sezerniert.

Das folgende *Alveolar Stadium* (V) (Mensch 36 EW – 1-2 Jahre p.P., Maus 5 – 30 postnataler Tag) dient der Aufrichtung des bis dahin doppelten Kapillarnetzes der primären Alveolarsepten zu den Sekundärsepten, wodurch die definitiven Alveolen gebildet werden. Es schließt sich die Phase der *mikrovaskulären Reifung* (VI) an. Diese Phase ist durch ein pulmonal-vaskuläres Remodeling gekennzeichnet und wird im 2. – 3. Lebensjahr abgeschlossen.

Eine vergleichende grafische Darstellung der Lungenentwicklung bei Mensch und Maus ist in Abbildung 1.1 wiedergegeben.

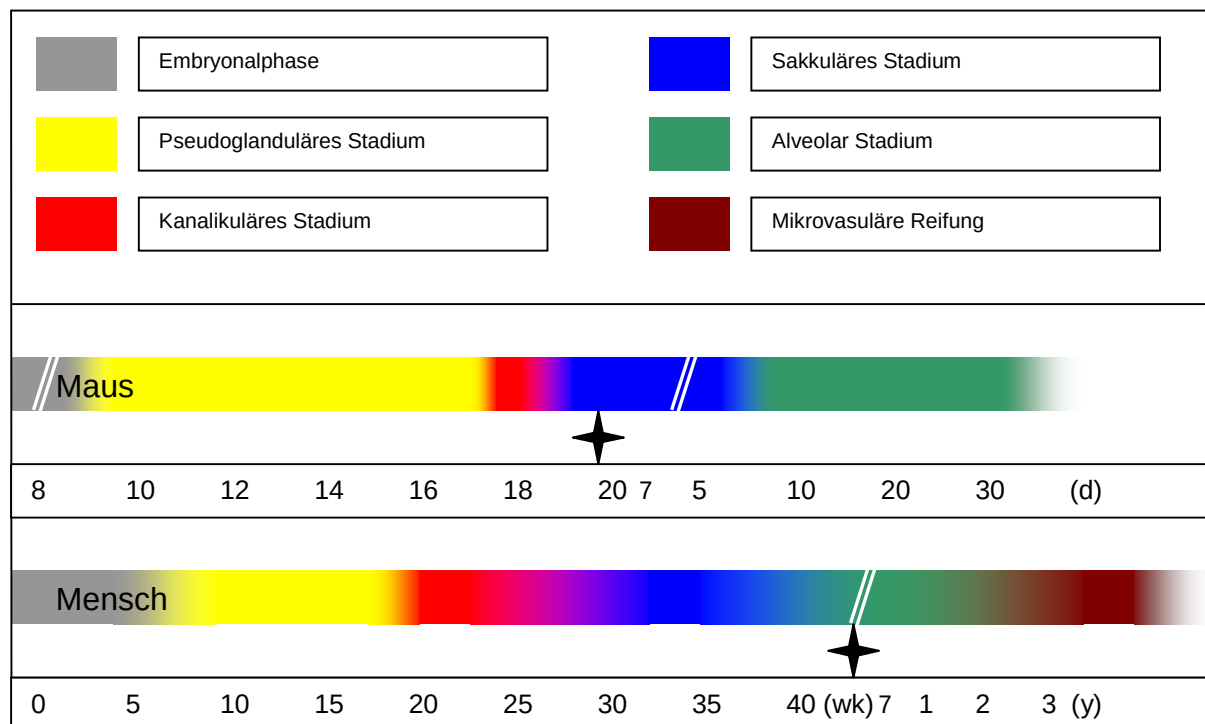


Abbildung 1.1 Vergleichende Lungenentwicklung Maus vs. Mensch, [™] Geburt, d Tag, wk Woche, y Jahr, 7 Zeitachsensprung

1.3. Physiologische Funktion und pathologische Bedeutung der untersuchten Gene

Neben der Betrachtung der histologischen Differenzierung der fetalen Lungen, ist es ein Ziel der vorliegenden Studie, die möglichen pulmonalen Veränderungen bei intrauterin wachstumsretardierten Mäusen auf Ebene der mRNA Expression essentieller Gene der Lungenentwicklung und Lungenfunktion zu untersuchen.

Eine Vielzahl an Genen steuert die Proliferation und Differenzierung während der Lungenentwicklung [50-52]. Hierbei interagieren die einzelnen Gene multipel in Abhängigkeit vom Fortschritt der Lungenentwicklung sowie der intrauterinen fetalen und maternalen Situation. Für die Lungenentwicklung und respiratorische Funktion sind die folgenden Entwicklungsschritte entscheidend:

1. Zur Oxygenierung des Blutes muss eine ausreichende gasaustauschende Oberfläche vorhanden sein. Daher muss **ein Mindestmaß an Lungenwachstum** gewährleistet sein.
2. Da der Gasaustausch auf Diffusion beruht, müssen die Diffusionswege möglichst gering gehalten werden, was durch die **mikroarchitektonische Reifung** des Lungengewebes geschehen muss.
3. Zur Oxygenierung des Blutes bedarf es einer adäquaten Zirkulation, die von pulmonaler Seite durch ein entsprechend **differenziertes vaskuläres System** sichergestellt werden muss.
4. Um den Gasaustausch zu ermöglichen, muss die Lunge ausreichend ventiliert werden. Die hierzu notwendige zyklische Expansion der Alveolen ist physikalisch nur durch den **Lungensurfactant** möglich.
5. Der Atemapparat besitzt eine erhebliche Expositionsfläche, durch den das Neugeborene mit Umwelteinflüssen konfrontiert wird. Daher kommt der Lunge eine bedeutende **immunologische Funktion** zu.

Bei der Entwicklung der oben genannten Voraussetzung bzw. deren potentiell inadäquater Entwicklung bei IUGR-Frühgeborenen sind

- Wachstumsfaktoren (IGF-System, VEGF-HIF-System)
- Surfactant assoziierten Proteine (SP-A – D)
- sowie Mediatoren der Inflammation (IL-6, IL-10, TNF- α)

essentiell beteiligt.

Daher wird in der vorliegenden Arbeit die pulmonale mRNA Expression dieser Faktoren untersucht. Die physiologische Funktion und die pathologische Bedeutung der einzelnen Faktoren, insbesondere in pulmonaler Hinsicht, werden im Folgenden genauer erläutert.

1.3.1. *Insulin like growth factor-1 (IGF-1) und Insulin like growth factor 1 receptor (IGF1-R)*

Die Wirkung des zentralen Wachstumshormons *human growth hormon* (hGH) wird durch eine Anzahl von Wachstumsfaktoren vermittelt, die aufgrund ihrer Sequenzhomologie zu Proinsulin [53] als *Insulin like growth factors* (IGFs) bezeichnet werden [54-56]. Heute sind die *Insulin like growth factors* (IGFs) IGF-1 und IGF-2 bekannt [54, 55].

IGF-1 ist ein Progressionsfaktor, der die Zellproliferation und Differenzierung unterschiedlicher Gewebe fördert [54, 55]. Das humane IGF-1 Gen besteht aus 5 Exons auf Chromosom 12 (Maus Chromosom 10). IGF-1 und IGF-2 liegen sowohl in löslicher als auch in gewebeassoziiierter Form vor [54, 55]. Für das lösliche IGF-1 ist die Leber der wichtigste Produzent [55]. Daneben sind jedoch fast alle Organe zur IGF-1 Synthese befähigt, so dass der quantitativ bedeutendste Teil des IGF-1 in den verschiedenen Organsystemen entsteht und hier autokrin und/oder parakrin wirkt [55].

Untersuchungen an transgenetischen Mäusen mit einem *knock-out* für das IGF-1 Genprodukt zeigen, dass durch den Verlust von IGF-1 vornehmlich das spätfetale Wachstum gestört wird, bei dem auch, sofern die Feten überleben, das postnatale Wachstum therapierefraktär eingeschränkt bleibt [57, 58]. Der Verlust des IGF-1 Genprodukts führt beim Menschen ebenfalls zu einem stark eingeschränkten intrauterinen und postnatalen Wachstum sowie einer abnormalen neurologischen Entwicklung [59, 60]. Die Nabelschnurkonzentration von IGF-1 bei Geburt korreliert positiv mit dem Geburtsgewicht und Gestationsalter [61, 62]. Bei der IUGR ist eine Reduktion des IGF-1 Serumspiegels im Nabelschnurblut belegt [63, 64]. Daher wird im Zusammenhang mit Barkers Hypothese der intrauteriner Prägung, eine Störung der IGF-1 – hGH Achse bei IUGR - Patienten diskutiert [65]. Dies erlangt Bedeutung, da bekannt ist, dass niedrige IGF-1 Spiegel mit einem erhöhten Risiko für die koronare Herzkrankheit und Diabetes Mellitus Typ 2 assoziiert sind [66-68].

Im Serum ist IGF-1 zu ca. 99% an die *Insulin like growth factor binding proteins* (IGFBPs) gebunden, die ebenfalls in löslicher und matrixassoziierter Form vorliegen [55, 69]. Neben der generell angenommenen inhibitorischen Wirkung der IGFBPs, sind in speziellen Situationen auch aktivierende Einflüsse beschrieben, wodurch ihnen eine wesentliche Bedeutung bei der IGF-1 Funktionsregulation auf Proteinebene zukommt [55, 69, 70].

IGF-1 vermittelt seine Hauptwirkung durch den *Insulin like growth factor 1 receptor* (IGF1-R) (Mensch Chromosom 15, Maus Chromosom 7) [55, 71]. Der IGF1-R ist mit dem Insulinrezeptor strukturverwandt und ist wie dieser ein Tyrosinkinase Rezeptor mit zwei extrazellulären α -Untereinheiten für die IGF-1 Bindung sowie zwei transmembranären β -Untereinheiten mit Tyrosinkinaseaktivität [71]. Er wird in praktisch allen Geweben außer der Leber exprimiert. IGF-1 ist der Hauptagonist des Rezeptors, während andere Faktoren, wie Insulin und IGF-2, einen weit geringeren biologischen Effekt haben [72].

Untersuchungen an Mäusen, die einen Verlust des IGF1-R Genprodukts durch *knock-out* aufweisen, zeigen ein um 45% reduziertes Körpergewicht mit einer generalisierten Organhypoplasie [57, 58]. Eine reduzierte IGF1-R Rezeptorfunktion verursacht auch beim Menschen ein gestörtes intrauterines Wachstum im Sinne einer IUGR sowie ein eingeschränktes postnatales Wachstum [60, 73].

IGF-1 und IGF1-R sind an der strukturellen und funktionellen Lungenentwicklung beteiligt [74, 75]. Die Reduktion oder der Verlust der IGF-1 oder IGF1-R Expression hat respiratorisches Versagen zur Folge [57, 58]. Eine geänderte IGF-1 und IGF1-R Expression wird in der Pathogenese des RDS und BPD diskutiert [76, 77].

1.3.2. Hypoxia-inducible Factor (HIF) und Vascular endothelial growth factor (VEGF)

Ein zentraler Aspekt der Lungenentwicklung ist die Interaktion des Gefäßsystems mit den respiratorischen Epithelien [47, 50-52, 78-81]. Die Entwicklung dieser Komponenten ist nach heutiger Meinung nicht als isoliert anzusehen, sondern basiert auf einer ständigen Zell-Zell-Kommunikation, wodurch eine flexible Wachstumsregulation ermöglicht wird [47, 51, 52, 78, 79].

Die hervorgehobene Stellung des vaskulären Systems wird durch in-vivo Experimente belegt die zeigen, dass Funktionsänderungen essentieller Mediatoren des vaskulären Systems fatale pulmonale Malformationen und respiratorische Dysfunktionen zur Folge haben [50, 82-84]. Bei der Betrachtung der unterschiedlichen vaskulären Wachstumsfaktoren kommt dem *vascular endothelial growth factor-A* (VEGF-A) größte Bedeutung zu [85-87]. Weitere, dem VEGF-A in Struktur und Rezeptorspezifität verwandte Wachstumsfaktoren wurden identifiziert. Zu ihnen gehören VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E und der *placental growth factor* (PlGF). VEGF-A kommt quantitativ und qualitativ die größte biologische Bedeutung zu [85, 88]. In der vorliegenden Arbeit wird der Begriff VEGF synonym mit VEGF-A verwendet.

Das humane VEGF Gen besitzt 8 Exons auf Chromosom 6 (Maus Chromosom 17) [89]. Natives VEGF ist ein Heparin bindendes, dimeres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 45 kDa [90]. Die durch alternatives Splicing entstandenen Isoformen des VEGF wurden nach ihrer Aminosäureanzahl benannt. Bis heute sind die Isoformen VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ bekannt [86]. VEGF₁₆₅ und VEGF₁₄₅ werden direkt sezerniert, die höheren basischen Isoformen sind zunächst mit der extrazellulären Matrix assoziiert und werden durch Plasmin vermittelte proteolytische Spaltung in die lösliche Form überführt [91]. VEGF₁₆₅ weist das höchste biologische Potential auf [85].

Die murinen Isoformen unterscheiden sich bei analoger Nomenklatur und äquivalenten Funktionen durch den Verlust einer Aminosäure [88]. In der vorliegenden Arbeit wurde bei der Bestimmung der pulmonalen VEGF mRNA Expression eine Basen-Sequenz verwendet, die alle bekannten VEGF Splicevarianten erfasst.

Seine vaskulo- und angiogenetischen Eigenschaften vermittelt VEGF, indem es die Migration, Proliferation und Differenzierung von Endothelzellen stimuliert und anti-apoptotische Wirkung hat [88, 92-94]. Weiterhin sind nicht gefäßassoziierte VEGF Wirkungen beschrieben, wie mitogenetischer Einfluss auf nicht Epithelzellen [95] Stimulation der Surfactantproduktion [87, 96], unterschiedliche Einflüsse auf Knochenmarkszellen [97], Kanzerogenese und Metastasierung [98], sowie chemotaktische Wirkung auf Monozyten [99].

Die essentielle Bedeutung von VEGF wird bei Carmeliet et al. deutlich, die zeigen konnten, dass bereits der Verlust eines VEGF Allels letale pränatale Fehlbildungen des kardiovaskulären Systems verursacht [100]. Die postnatale Störung der VEGF-VEGF-Rezeptor Interaktion führt zum Sistieren der pulmonalen Alveolarisation mit Reduktion der Alveolarzahl und Rarefizierung der alveolaren Mikroarchitektur [83, 84].

Zu den VEGF assoziierten Rezeptoren zählen die Rezeptoren VEGFR 1 - 3 und die Neuropilinrezeptoren 1 und 2 [85, 86, 88]. Diese Arbeit beschränkt sich auf die Einführung von VEGFR-1 und 2. Beide Rezeptoren bestehen aus sieben Immunglobulin-ähnlichen extrazellulären Domänen, einer transmembranären Domäne sowie einer intrazellulären Sequenz mit Tyrosinkinaseaktivität [85].

Bisher wurden eine Zelloberflächen assoziierte und eine lösliche Variante des VEGFR-1 (syn. Flt-1, fms-liketyrosine kinase, Mensch Chromosom 13, Maus Chromosom 5) beschrieben [101]. VEGF hat eine hohe Affinität zu VEGFR-1, vermittelt aber durch diesen Rezeptor nur eine geringe mitogenetische [88] und angioproliferative Wirkung [85, 102]. Durch die Bindung von VEGF an VEGFR-1 steht anderen Rezeptoren mit stärkerer angiogenetischer Wirkung, wie VEGFR-2, eine geringere freie VEGF Menge zur Verfügung, wodurch in der Summe eine Inhibition des durch VEGF vermittelten angiogenetischen Potentials resultiert [85, 103, 104]. Der Einfluss von VEGFR-1 ist wesentlich für die Organisation von Endothelzellen in Gefäßen verantwortlich. Mäuse mit einem VEGFR-1 Defekt weisen eine ungeordnete und überschießende Endothelzellproliferation auf [105].

VEGFR-2 (syn. KDR (kinase domain region); Flk-1 (fetal liver kinase-1), Mensch Chromosom 4, Maus Chromosom 5) ist wesentlich verantwortlich für die VEGF vermittelte Endothelzell-Mitogenese, Endothelzell-Migration, Vasopermeabilität [106, 107] und Antiapoptose [85].

Es bestehen Hinweise, dass die VEGF vermittelte Angiogenese und Endothelzellproliferation durch eine VEGFR-2 abhängige Induktion der Stickstoffmonoxid (NO) Produktion vermittelt wird [50, 108]. Die NO Freisetzung erfolgt VEGFR-2 abhängig durch die endothelialen NO-Synthase (eNOS) [50]. NO nimmt auto- und parakrin Einfluss auf die Expression des *Hypoxia-inducible Factor 1α* (HIF-1α), welcher wiederum wesentlich an der Regulation der VEGF Expression beteiligt ist [50, 108].

HIF-1 ist ein systemischer Transkriptionsfaktor der zellulären Sauerstoffhomöostase, der an der Regulation multipler Gene mit metabolischen, proliferativen, angiogenetischen sowie apoptitischen Funktionen beteiligt ist [109]. Neben seinen physiologischen Funktionen ist HIF-1 bei pathologischen Vorgängen, wie Tumorwachstum oder zerebralen, retinalen und myokardialen Ischämien, beteiligt (zusammengefasst bei Semenza [109]).

HIF-1 ist ein Heterodimer aus einer 120 kDa Alpha- (HIF-1α; Mensch Chromosom 14, Maus Chromosom 12) und einer 91-94 kDa Beta-Untereinheit (HIF-1β) [110]. Die Beta-Untereinheit ist konstitutionell im Zellkern exprimiert, wohingegen die Alpha-Untereinheit differentiell exprimiert wird [111]. Kommt es zu einem Expressionsanstieg von HIF1-α, dimerisiert dieses mit der beta-Untereinheit, bindet in dieser aktiven Form in der Promotorregion unterschiedlicher Gene, wie z.B. Erythropoetin und VEGF, und induziert so deren Transkription [109, 112-120].

Die HIF-1α Untereinheit ist von essentieller Bedeutung für die pränatale Entwicklung. Mäuse mit einem Verlust der HIF-1α Expression durch *knock-out* weisen letale kardiovaskuläre Malformationen und Neuralrohrdefekte auf, die parallel zur erstmaligen Expression von HIF-1α am Embryonaltag ET 8,5 –9,5 auftreten [121].

HIF-1α ist ein ubiquitäres Protein, wohingegen die verwandten Untereinheiten HIF-2α und HIF-3α eine gewebsspezifische Expression aufweisen [111, 118, 122]. HIF-2α (syn. *HIF-1α-like factor* (HLF), *Endothelial PAS Domain Protein 1* (EPAS1), *member of the PAS superfamily 2* (MOP2), Mensch Chromosom 2, Maus Chromosom 17) ist ein dem HIF-1α ähnliches Genprodukt, welches mit der konstitutionell exprimierten HIF-1β Untereinheit dimerisiert und analog zur Funktionsweise des HIF-1 zur Initiation der Transkription führt [111].

HIF-2α ist auch unter normoxischen Bedingungen in der Lunge exprimiert, wohingegen HIF-1α in Normoxie nur schwach exprimiert ist [122, 123]. HIF-2α ist schon während der frühen Phase der pulmonalen Entwicklung der Maus stärker als

HIF-1 α exprimiert und steigt am Ende der Gestation stark an [96, 124]. Ema und Kollegen folgern, dass HIF-2 α eine wesentliche Bedeutung in der Regulation der pulmonal-vaskulären Entwicklung zukommt [122]. Compernelle et al. fanden weitere Belege für HIF-2 α abhängige Lungenentwicklung anhand eines *knock-out* Modells. HIF-2 α $-/-$ Mäuse zeigten eine Reduktion der belüfteten Lungenareale und eine Verbreiterung der Alveolarsepten, was als Hinweis auf eine verzögerte Lungenreife gewertet werden kann [96].

1.3.3. Surfactant-System

Entsprechend ihrer geometrischen Form neigt die Alveole dem Gesetz von Laplace folgend zum Kollaps. Die Summe der kollabierend wirkenden Kräfte der Alveolen überschreitet das Kraftpotential der Atemmuskulatur um ein Vielfaches. Um die Ventilation der Alveolen zu gewährleisten, muß diese zyklisch expandieren. Daher benötigt die Lunge eine Oberflächenspannung reduzierende Substanz, die von Pattle und Clements beschrieben und entsprechend ihrer Funktion als *surface active agent* (*Surfactant*, *SF*) bezeichnet wurde [125, 126]. Der SF wird von den Alveolarepithelzellen (AEC) Typ II gebildet und besteht aus einem Gemisch von Phospholipiden (PL), Kohlenhydraten und Proteinen [127]. Die Oberflächenspannung reduzierenden Eigenschaften des SF werden primär durch die PL vermittelt, indem sie eine Lipid - Monolayer (ML) ausbilden, bei dem die hydrophoben Fettsäurereste der PL in den Alveolarraum hineinreichen [128]. Die Oberflächenspannung der Alveole drängt die PL zusammen, wodurch die hydrophoben Fettsäurereste gegeneinander stoßen und so die kollabierenden Kräfte kompensieren [128].

Unter Einfluss der Surfactant assoziierten Proteine (SP) wird der SF organisiert, dessen biophysikalische Eigenschaften verstärkt und die Reabsorption durch die AEC und Alveolarmakrophagen gesteuert [127]. Heute sind vier Surfactant assoziierte Proteine bekannt, SP-A, SP-B, SP-C und SP-D,

1.3.3.1. Surfactant assoziiertes Protein A (SP-A)

Das SP-A ist ein hydrophiles octadecameres Glycoprotein mit einer Molekülgröße von 30 – 36 kDa [129]. Es wird durch zwei Gene auf dem langen Arm von Chromosom 10 (Maus Chromosom 14) codiert [130]. Als gesichert kann die immunologische Funktion von SP-A betrachtet werden [131-134]. Gemeinsam mit SP-D ist es ein wesentlicher Teil der angeborenen immunologischen Verteidigung,

der *innate host defense*. Durch SP-A werden Makrophagen in Anwesenheit von pathogenen Bakterien [135], Viren [133] oder Pilzen aktiviert [132, 136, 137]. Neben seinen direkten bakteriotoxischen Wirkung, opsonisiert es pathogene Keime und beschleunigt deren Phagozytose [136]. SP-A ist an den biophysikalischen Eigenschaften des Surfactants beteiligt [138], ein selektiver Verlust von SP-A beeinflusst die physiologische SF – Funktion jedoch nicht maßgeblich [139, 140]. In-vitro Experimente weisen weiterhin auf eine Beteiligung an der Surfactanthomöostase hin [129, 141]. Die Bestimmung von SP-A in der Amnionflüssigkeit gilt, aufgrund des proportional zur Lungenepithelreife anwachsenden Gehalts, als verwertbarer Indikator der Lungenentwicklung [142, 143].

1.3.3.2. Surfactant assoziiertes Protein D (SP-D)

Das zweite hydrophile Surfactant assoziierte Protein ist SP-D. Es ist ebenfalls ein Glykoprotein, das eine Tetra- oder Duodecamer Quartärstruktur mit einer Molekülgröße von 43 kDa aufweist [129]. Es wird analog zu SP-A auf Chromosom 10 (Maus Chromosom 14) codiert [129]. Die SP-D Expression ist jedoch nicht auf AEC Typ II begrenzt, sondern findet sich auch in Bronchialzellen und anderen Körperzellen, wie Speicheldrüsen oder Pankreas [144, 145]. Wie SP-A gehört auch SP-D zum System der angeborenen Immunabwehr, der *innate immunity*, und vermag Bakterien, Viren [146] und Pilze zu binden und agglutinieren [137]. SP-D fällt keine entscheidende Rolle in der Organisation des SF zu, dennoch zeigen Mäuse mit SP-D *knock-out*, neben der erklärbaren Immunschwäche, eine Akkumulation von Lipiden im Alveolarraum [140, 147].

1.3.3.3. Surfactant assoziiertes Protein B (SP-B)

Das Gen des hydrophoben SP-B (Mensch Chromosom 2, Maus Chromosom 6) codiert für ein 8 kDa schweres Molekül mit einer dimeren oder tertameren Quartärstruktur [129]. SP-B kommt eine wesentliche Aufgabe bei der Organisation des tubulären Myelin (TM) zu, indem es in Abhängigkeit von SP-A und in Anwesenheit von Calcium aus den vesikulär ungeordneten PL, den so genannten multivesikulären Körperchen, die hoch organisierten PL – Membranen des TM bildet [141, 148]. Intraalveolär beschleunigt SP-B die Verteilung der PL und stabilisiert die PL – Monolayer [149]. Die herausragende Bedeutung von SP-B wird bei genetischen

Defekten klar. Der vollständige Verlust der SP-B Funktion führt auch bei sonst reifen Neugeborenen innerhalb von Stunden zu einem therapierefraktären RDS [150, 151].

1.3.3.4. Surfactant assoziiertes Protein C (SP-C)

Das SP-C Gen (Mensch Chromosom 8, Maus Chromosom 6) codiert für ein 3,8 kDa schweres hydrophobes Protein, das eine dimere Quartärstruktur besitzt [129]. Funktionell beteiligt sich SP-C an der Organisation des Monolayers und verbessert vor allem während der dynamischen Phase der Alveole zusammen mit SP-B die biophysikalischen Eigenschaften des SF [152].

SP-C *knock-out* Mäuse zeigen progressive pulmonale Erkrankungen mit der Ausbildung von Emphyseblasen, atypischen intrazellulären Lipidakkumulationen und chronischer interstitieller Pneumonitis [153]. Ähnliche Veränderungen werden auch bei hereditären Defekten im humanen SP-C Gen beobachtet [151, 154].

1.3.4. Inflammationsmediatoren

Die pränatale Inflammation ist ein wesentlicher Risikofaktor für die vorzeitige Geburt [155]. Das lokale pulmonale Immunsystem des Neugeborenen unterscheidet sich maßgeblich von dem des Adulten. Zum Zeitpunkt der Geburt ist die Lunge durch die angeborene Abwehr, die *innate immunity*, geschützt. Ein nicht unwesentlicher Teil dieser angeborenen Abwehrfunktion wird in der Lunge durch die hydrophilen Surfactant assoziierten Proteine SP-A und SP-D realisiert [131, 136, 137, 140, 156, 157] (siehe Kapitel 1.3.3.1-2).

Eine Vielzahl von Studien weist darauf hin, dass die komplexen Interaktionen der einzelnen Komponenten in der Frühgeborenenlunge noch unausgereift sind. So konnte gezeigt werden, dass bei der Entwicklung der BPD pro-inflammatorische Mediatoren, wie TNF- α , IL-1, IL-6, im Ungleichgewicht zu den unter- oder nicht repräsentierten anti-inflammatorischen Faktoren, wie IL-10, stehen [158, 159]. De Dooy und Kollegen gehen daher davon aus, dass bei Frühgeborenen die verminderte oder fehlende Inflamationsregulation ein wesentlicher pathogenetischer Faktor in der Entwicklung chronischer Lungenerkrankungen ist [157]. Andererseits belegt eine Anzahl von Studien, dass die pränatale Infektionen die Lungenentwicklung stärker vorantreibt als Glukokortikoid Supplementation [160, 161]. In dieser Arbeit soll daher die mRNA Expression einiger ausgewählter Faktoren der prä- und postnatalen pulmonalen Inflammation untersucht werden.

1.3.4.1. Interleukin -10

Interleukin-10 (IL-10) wurde zunächst seiner primären Funktion entsprechend als *cytokine synthesis inhibitory factor* (CSIF) bekannt [162]. IL-10 wird sowohl bei der Maus als auch beim Menschen durch 5 Exone auf Chromosom 1 codiert [163]. Im Gegensatz zu anderen Interleukinen wird IL-10 zu einem gewissen Teil konstitutiv in vielen Zelltypen exprimiert und im wesentlichen durch posttranskriptionale Degradation reguliert [164].

IL -10 wird von den TH₂-Zellen, Monozyten und B-Lymphozyten sezerniert [165]. Es hat inhibitorische Wirkung auf die Produktion fast aller Interleukine antigenstimulierter TH₁-Zellen [164]. Von Bedeutung ist in diesem Zusammenhang insbesondere die Hemmung von TNF- α und IL-1, da diese Faktoren die Expression weiterer

inflammatorischer Folgemediatoren, wie dem Plättchenaktivierenden Faktor und Prostaglandinen, induzieren [164].

IL-10 führt zu einer verminderten Expression von MHC-Klasse II Rezeptoren des Monozyten-Makrophagen-Systems mit konsekutiv verminderter Antigenpräsentation. Hieraus resultiert eine Inhibition der antigenabhängigen T-Zell-Proliferation [166]. Neben der Inhibition pro-inflammatorischer Mediatoren vermittelt IL-10 auch die Inaktivierung bereits freigesetzter Faktoren, z.B. durch Expressionsinduktion des Interleukin-1 Rezeptor Antagonist (IL-1RA) [164]. IL-10 bewirkt somit systemische Anti-inflammation durch Inhibition pro-inflammatorischer Interleukine, deren Folgemediatoren und hat direkten Einfluss auf TH₁-Zellen, Makrophagen und NK-Zellen.

Frühgeborene die eine chronische respiratorische Insuffizienz entwickeln weisen keine oder nur geringe IL-10 Konzentration in der bronchoalveolären Lavage (BAL) [158] und im Nabelschnurblut auf [167].

1.3.4.2. Interleukin -6

Interleukin-6 (IL-6) ist ein pleiotropes Interleukin mit lokaler und systemischer Wirkung [168]. Es wird als Antwort auf bakterielle oder virale Infektion sowie Zellzerstörung oder Verletzung von T-Zellen, Monozyten/Makrophagen sowie Fibroblasten produziert [168]. Es ist an der Akute-Phase-Reaktion beteiligt, indem es in der Leber die Bildung von Akute-Phase-Proteinen induziert [169-171]. In Synergismus mit IL-1 erhöht es die Immunglobulinsynthese in B-Zellen, aktiviert T-Zellen und ist an der Umwandlung von T-Zelle in zytotoxische T-Zelle beteiligt [171]. Der IL-6 Anstieg im Nabelschnurblut [167, 172] und in der bronchoalveolären Lavage (BAL) Frühgeborener [173] ist ein geeigneter Prädiktor für die Entstehung neonataler pulmonaler Erkrankungen. Die inadäquat hohe IL-6 Expression und das Missverhältnis zu anti-inflammatorischen Mediatoren wird bei Frühgeborenen als pathogenetischer Faktor in der Entstehung neonataler pulmonaler Erkrankungen, wie der BPD, angesehen [157, 174, 175].

1.3.4.3. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-α)

Tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) ist ein weiterer wichtiger pro-inflammatorischer Mediator mit Wirkungen auf Gerinnung, Insulintoleranz, Lipidmetabolismus und Endothelfunktion [171]. Aktivierte Makrophagen sind die Hauptquelle von TNF-α

[171]. Es ist nach seiner Eigenschaft benannt, Tumorzellen in-vitro und in-vivo zu töten [171].

TNF- α ist ein Faktor in der Pathogenese einer Vielzahl von Erkrankungen, wie z.B. Multiple Sklerose [176, 177], Psoriasis [178], systemischer Lupus erythematodes, Morbus Crohn und Malignomen [179].

Die Zytokin vermittelte lokale Immunabwehr Neugeborener gegen Bakterien, Pilze und Parasiten wird in erheblichem Maß durch TNF- α beeinflusst [157, 171]. Wesentlicher Mechanismus ist die indirekte chemotaktische Wirkung durch Expressionsinduktion endothelialer Adhäsionsmoleküle sowie die folgende Forcierung der leukozytären Phagozytose [157, 171]. TNF- α ist an pulmonalen inflammatorischen Prozessen, wie dem RDS und der chronischen Lungenerkrankung Neugeborener, beteiligt [157, 180].

1.4. Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, ein Tiermodell zur experimentellen Induktion einer intrauterinen Wachstumsrestriktion durch maternale Hypoxie für die Maus zu etablieren. Da die Frühgeburt ein entscheidender Risikofaktor der postnatalen Morbidität intrauterin Wachstumsretardierter ist, wurde die Gestation vorzeitig beendet.

Der Einfluss der so induzierten IUGR auf die Lungenentwicklung wurde auf Ebene der histologischen pulmonalen Differenzierung sowie der mRNA Expression essentieller Gene der Lungenentwicklung untersucht.

Im Einzelnen wurden folgende Fragen bearbeitet:

1. Ist maternale Hypoxie im letzten Drittel der Gestation ein geeignetes Mittel zur experimentellen Induktion einer intrauterinen Wachstumsrestriktion bei der Maus?
2. Löst die so induzierte IUGR eine symmetrische oder asymmetrische Wachstumsrestriktion aus?
3. Besteht bei einer intrauterinen Wachstumsrestriktion eine durch histomorphometrische Untersuchungen quantifizierbare Beeinflussung der pränatalen Lungenentwicklung?
4. Hat die hypoxie-induzierte intrauterine Wachstumsrestriktion Einfluss auf die pulmonale mRNA Expression des für die Organentwicklung und Differenzierung wesentlichen Wachstumsfaktors IGF-1 und seines Hauptrezeptors IGF1-R?
5. Wird die mRNA Expression des für die pulmonal vaskuläre Entwicklung essentiellen Wachstumsfaktors VEGF sowie die seiner assoziierten Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 durch die intrauterine Wachstumsrestriktion beeinflusst?
6. Wird die mRNA Expression der hypoxie-sensitiven Alpha-Untereinheiten des Transkriptionsfaktors HIF (HIF-1 α , HIF-2 α), welche entscheidend an der Expressionsregulation von VEGF beteiligt sind, durch die hypoxie-induzierte intrauterine Wachstumsrestriktion beeinflusst?
7. Wird die mRNA Expression der Surfactant assoziierten Proteine A-D, die von essentieller Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Surfactant-Funktion und

lokalen Immunabwehr sind, durch die hypoxie-induzierte intrauterine Wachstumsrestriktion beeinflusst?

8. Wird die pulmonale mRNA Expression pro- und anti-inflammatorischer Mediatoren (IL-6, IL-10, TNF- α), von denen eine Beteiligung in der Pathogenese chronischer Lungenerkrankungen bekannt ist, durch die hypoxie-induzierte intrauterine Wachstumsrestriktion beeinflusst?

2. Material und Methoden

2.1. Materialien siehe Kapitel 8.1 des Anhangs

2.2. Tierexperimentelle Arbeit

Die Tierhaltung und -experimente der vorliegenden Studie wurden in Übereinstimmung mit der „*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*“ des National Institutes of Health [NIH publication 85-92, revised 1985] durchgeführt.

2.2.1. Studienziel

Ziel dieser Arbeit war es ein Mausmodell für die intrauterine Wachstumsrestriktion Frühgeborener zu etablieren. Für die Induktion der IUGR wurde maternale Hypoxie im letzten Drittel der Gestation genutzt. Die Auswirkungen der IUGR wurden auf makroskopischer sowie pulmonal auf histologischer und molekularbiologischer Ebene betrachtet.

2.2.2. Studiendesign

Die Versuchstiere des Inzuchtstammes C57BL/6 (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) wurden vom Tierzüchter verpaart. Die Lieferung der Tiere erfolgte am Tag 11 der Gestation. Alle Versuchstiere befanden sich bis zum Embryonaltag ET 14 in normoxischer Umgebung. Am Embryonaltag ET 14 der Gestation wurden die Muttertiere in Normoxiegruppe und Hypoxiegruppe zu je n=5 randomisiert und anschließend entsprechend ihrer Gruppenzuteilung in die Normoxie- (F_iO_2 0,21) bzw. Hypoxieversuchsbox (F_iO_2 0,10) gebracht (Schema zum chronologischen Studienablauf siehe Abbildung 2.1). Der Aufbau und die Funktion der Normoxie-/Hypoxieversuchsboxen wird in Kapitel 2.2.3 erläutert.

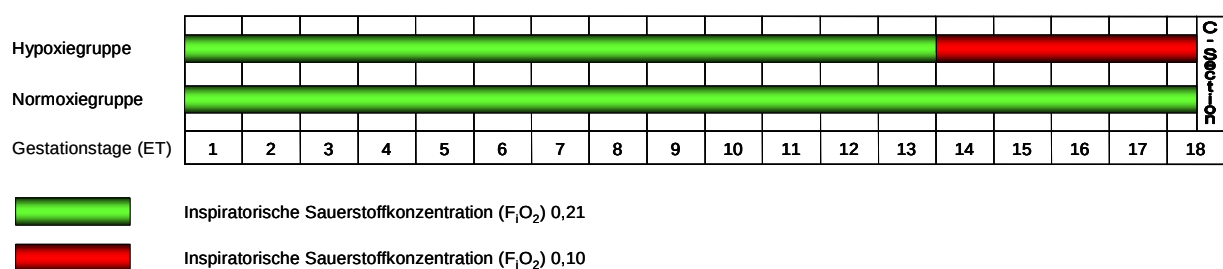


Abbildung 2.1 Tierexperimenteller Versuchsablauf, grüner Balken entspricht 21% Luftsauerstoff in Versuchsbox, roter Balken entspricht 10% Luftsauerstoff in Versuchsbox.

Am Embryonaltag ET 17,5 wurden die Muttertiere durch eine intraperitoneale Injektion Ketavet® (Wirkstoff: Ketaminhydrochlorid) sediert. Nach Eröffnung des Uterus wurden in jeder Gruppe n=31 Feten entnommen (Abbildung 2.2). Ein Wurf wurde nur in die Studie aufgenommen, falls keine intrauterin verstorbenen oder kongenital malformierten Feten enthalten waren.

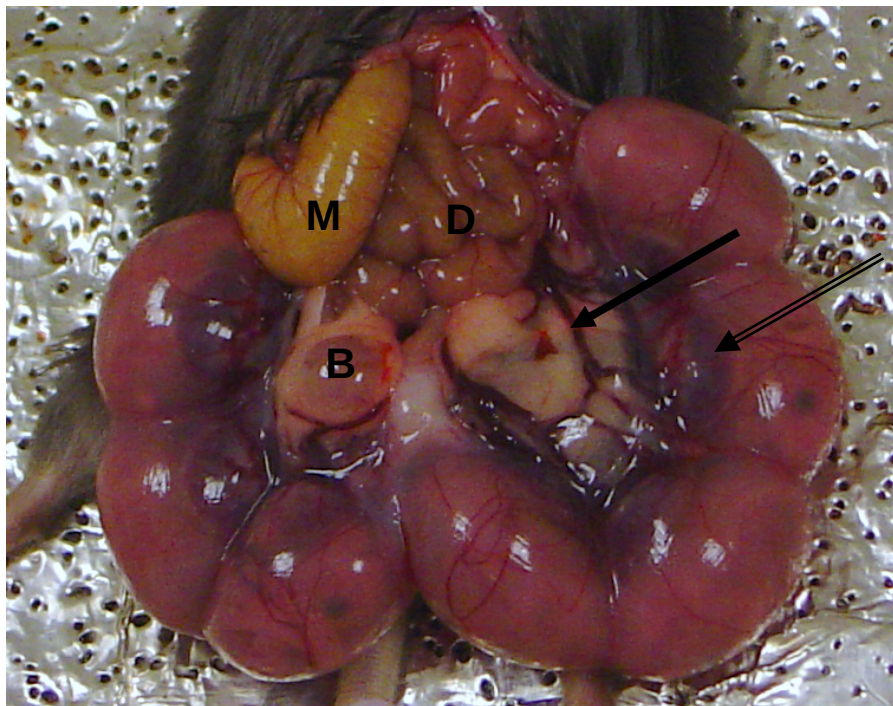


Abbildung 2.2 Situs nach Laparotomie. Zu erkennen ist das linke Uterushorn mit 4 Feten sowie das rechte Uterushorn mit 3 Feten. Beide Uterushörner sind durch starke arkadenförmig angeordnete uterine Gefäße versorgt (Pfeil). Durch die transparente Uterusmuskulatur sind die dunkel erscheinenden Plazenten der Feten zu erkennen (Doppelpfeil). Weiterhin sind der Magen (M), Teile des Darms (D) sowie die Blase (B) abgebildet.

Es wurden folgende Daten erhoben:

- Geburtsgewicht (digitale Feinwaage, Mitutoyo, UK)
- Körperlänge, gemessen vom Scheitel bis zum Steiß (digitale Schieblehre, Mettler-Toledo, Wiesbaden, Deutschland)
- Kopfgröße, gemessen von der Schnauzenspitze bis zum Hinterhaupt (digitale Schieblehre, Mettler-Toledo, Wiesbaden, Deutschland)
- Wurfgröße
- Geschwisterfeten im gleichen Uterushorn

Im Anschluss wurden die Feten unter Verwendung eines Präparationsmikroskops thorakotomiert und die Lunge entnommen (Abbildung 2.3).

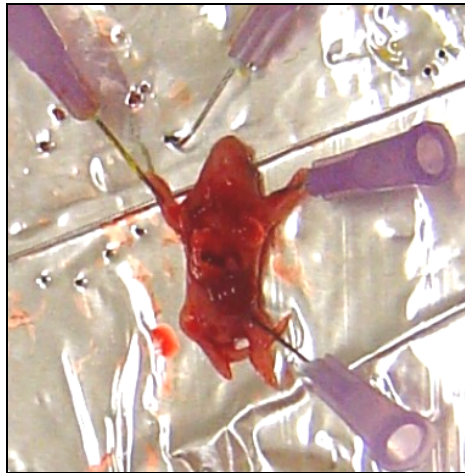


Abbildung 2.3 Lungenpräparation am thorakotomierten Feten

Die exzidierten Lungen wurden alternierend zur molekularbiologischen und histologischen Auswertung asserviert. Die Lungen für die molekularbiologische Aufarbeitung (Kontrollgruppe n=18, Hypoxiegruppe n=17) wurden in flüssigem Stickstoff kryokonserviert und bei -80°C gelagert. Die Lungen für die histologische Aufarbeitung (Kontrollgruppe n=13, Hypoxiegruppe n=14) wurden nativ in 4%igen Paraformaldehyd (PFA) fixiert (siehe hierzu Kapitel 2.3).

2.2.3. Versuchsaufbau Hyxpoxie-/Normoxiekammer

Die Hypoxie-/Normoxiekammern sind gasdichte Boxen, deren Sauerstoffkonzentration durch eine automatische Kontrolleinheit (model 4010, O₂ controller, Labotect, Göttingen, Deutschland) konstant gehalten wurde. Kohlenstoffdioxid wurde permanent durch einen Natronkalkfilter entfernt. Eine automatische Kondensations-/Kühleinheit gewährleistete eine gleich bleibende Luftfeuchtigkeit.

Die Boxen wurden einmal täglich für wenige Minuten zur Reinigung und Fütterung geöffnet. Den Tieren war Wasser und Futter stets frei zugänglich.



Abbildung 2.4 Die Abbildung zeigt eine Hypoxie-/Normoxiekammer. In den Seiten und der Rückwand befinden sich Öffnungen, die mittels Schlauchsystemen mit der Ventilationseinheit verbunden sind. Im vorderen Bereich der Kammer befindet sich der Sensor zur ständigen Sauerstoffkonzentrationsmessung, der mit der automatischen Kontrolleinheit (model 4010, O₂ controller, Labotect, Göttingen, Deutschland) verbunden ist. Die Vorderseite der Hypoxie-/Normoxiekammer besteht aus einer gasdichten Plexiglasabdeckung mit Arbeitszugängen.

2.3. Histologische Untersuchungen

Die Beurteilung der pulmonalen Differenzierung erfolgte durch die histomorphometrische Bestimmung der Wandstärke der sakkulären Lufträume sowie der Ermittlung der Anzahl der sakkulären Lufträume pro Gesichtsfeld.

Die exzidierten Lungen wurden zur standardisierten histologischen Evaluation nativ in 4%igen Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Die Feten wiesen bis zum Zeitpunkt der Pneumektomie keine sichtbaren Atemexkursionen auf, so dass davon auszugehen ist, dass die Lungen zum Zeitpunkt der Fixation mit fetaler Lungenflüssigkeit gefüllt waren.

Die histologische Beurteilung des pulmonalen Gewebes der Kontrollgruppe (n=15) und der Hypoxiegruppe (n=14) erfolgte an Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Präparaten durch einen Pathologen (Dr. med. M. Ebsen, Abteilung für Allgemeine und Spezielle Pathologie der Ruhr-Universität Bochum). Dieser hatte keine Kenntnis bezüglich der Gruppenzugehörigkeit der Präparate. Aufgrund der begrenzten Präparatgrößen wurden aus den dorsalen und ventralen Anteilen beider Lungenflügel 5 Gesichtsfelder randomisiert.

Die histomorphometrische Beurteilung der Wandstärke der sakkulären Lufträume erfolgte nach Fotodokumentation unter Verwendung des Programms Axiovision 3.0 für AxioCam MRc (Zeiss, Deutschland). Hierbei wurden pro Gesichtsfeld mindestens 10 Wände der sakkulären Lufträume an ihrer dünnsten Stelle vermessen. Es wurden keine tangential angeschnittenen Wände verwendet. Weiterhin wurde die Anzahl der pro Gesichtsfeld vorhandenen sakkulären Lufträume bestimmt.

2.4. Molekularbiologische Untersuchungen

2.4.1. Isolation und Aufarbeitung der RNA

Die Isolation der RNA erfolgte mittels des TRIzol® – Reagents (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), das auf der *single-step* RNA Isolationsmethode nach Chomczynski und Sacchi basiert [181]. Die bei –80°C konservierten fetalen Lungen wurden in flüssigem Stickstoff homogenisiert. Um die komplette Dissoziation des Nukleoproteinkomplexes zu erreichen, wurde anschließend 1ml TRIzol® zugefügt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das im TRIzol® enthaltene Guanidium-Thiocyanat lysiert die Zellen, denaturiert die Proteine und stabilisiert die RNA. Der Suspension werden 200 µl Chloroform zugegeben, kräftig durchmischt und für 2-3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während des folgenden Zentrifugationsschrittes bei 12000 rpm für 15 Minuten bei 4°C kam es zur Phasenseparation. Dabei bildete sich eine proteinhaltige Phase, eine Interphase, die DNA enthält, und eine wässrige Phase mit RNA (Abbildung 2.5). Die wässrige Phase wurde anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zusatz von 500 µl Isopropylalkohol präzipitiert die RNA während der folgenden 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur. Die RNA wurde anschließend erneut bei 12000 rpm für 15 Minuten und 4°C abzentrifugiert. Im folgenden Waschschrift wurde der Überstand verworfen und das auf dem Boden befindliche Pellet in 1000 µl 75% Ethanol gelöst.

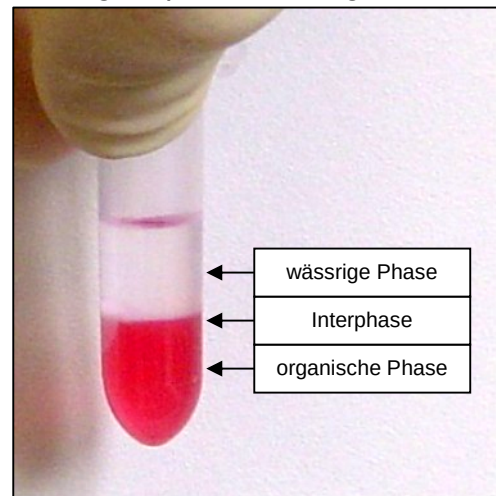


Abbildung 2.5 RNA-Isolation, Trizol, nach der Phasenseparation befindet sich die RNA in der wässrigen Phase

Die Lösung wird bei 7500 rpm für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet 10 Minuten luftgetrocknet. Das leicht angetrocknete Pellet wurde in 50 µl hochreinem Wasser (LiChroSolv®, Merck, Darmstadt, Deutschland) gelöst und für 10 Minuten bei 55 °C inkubiert.

Eventuell bestehende Kontaminationen mit DNA wurden mittels DNase – Verdau (DNA-free™, Ambion, Cambridgeshire, UK) nach Angaben des Herstellers minimiert. Anschließend erfolgte die spektralphotometrische Bestimmung der RNA Konzentration und RNA-Reinheit.

2.4.2. Bestimmung und Anpassung von Nukleinsäurekonzentrationen

Gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetz weisen Nukleinsäuregemische bei der Wellenlänge $\lambda=260$ nm eine der Nukleinsäurekonzentration proportionale Extinktion (A) auf. Das spektralphotometrisch ermittelte Extinktionsmaximum bei der Wellenlänge $\lambda=260$ nm entspricht bei der verwendeten Quarz-Küvette der Nukleinsäurekonzentration in $\mu\text{g/mL}$. Die Extinktion (A) bei $\lambda=280$ nm ist ein Maß für die Verunreinigung in der Lösung. Der Quotient der Extinktion $A(260\text{nm})/A(280\text{nm})$ ist ein Maß der Reinheit des Nukleinsäuregemisches und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Dies war bei allen Proben der vorliegenden Studie der Fall. Um Schwankungen in der Effizienz der reversen Transkription aufgrund von unterschiedlichen Nukleinsäurekonzentrationen im RNA-Isolat zu minimieren, wurden die RNA-Proben vor der reversen Transkription auf eine Konzentration von 10 ng/ μl verdünnt. Um die Proben vor dem Verdau durch ubiquitäre RNAsen zu schützen, wurden 2 μl (40 U/ μl) des RNase-Inhibitors RNaseOUT (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) sowie 2 μl DTT (100 mM) (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) zugefügt. Die Proben wurden anschließend in flüssigem Stickstoff kryokonserviert und bei -80°C gelagert.

2.4.3. cDNA – Synthese

Um aus *messenger RNA* (mRNA) eine für die PCR verwendbare DNA herzustellen, ist es nötig eine reverse Transkription durchzuführen. In einer einmaligen semikonservativen Replikation, die durch eine retrovirale reverse Transkriptase katalysiert wird, entsteht ein RNA-DNA Hybrid. Die so erzeugte DNA wird als *complementary DNA* (cDNA) bezeichnet und dient als Matrize für die PCR. In dieser Arbeit wurde hierzu die SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) verwendet [182].

Der Reaktionsansatz bestand aus 5 μl (200ng/ μl) eines random Hexamer Gemisches (Roche, Basel, Schweiz) (als Primer dienende Oligonukleotide zufälliger Sequenz), 5 μl (10mM) dNTPs (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und 50 μl (10ng/ μl) RNA. Da spontane Primerdimere und Schlingen im RNA-Strang die Effizienz der reversen Transkription einschränken, erfolgte zur Beseitigung dieser Störfaktoren zunächst ein Denaturierungsschritt für 4 Minuten bei 65°C . Anschließend wurde der

Reaktionsansatz für 1 Minute in Eiswasser gebracht, um ungewollte Rehybridisierungen zu minimieren.

Dem Reaktionsansatz wurden 40µl Enzymansatz, bestehend aus 20µl 5x *first strand buffer*, 10 µl (0,1 M) DTT, 5 µl (40 U/µl) RNaseOUT und 5µl (200 U/µl) Superscript II (alle Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde nun in einem Thermocycler bei 25°C für 10 Minuten und bei 42°C für 50 Minuten inkubiert. Hierbei lagern sich die Primer an die RNA an und werden anschließend durch die reverse Transkriptase zur cDNA polymerisiert.

Da weitere ungewollte, durch die reverse Transkriptase katalysierte Replikationen der RNA eine Verfälschung der quantitativen Aussage der zugrunde liegende RNA Menge zur Folge gehabt hätten, wurde die reverse Transkriptase durch Erhitzen auf 70°C für 15 Minuten deaktiviert. Die entstandene cDNA wurde anschließend bei -20°C konserviert.

2.4.4. Real-time PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein semikonservatives in-vitro DNA Amplifikationsverfahren, bei dem eine Zielsequenz aus einem heterogenen Nukleinsäuregemisch spezifisch vervielfältigt werden kann.

Die PCR besteht aus drei repetitiven Schritten:

1. Denaturierung
2. Primeranlagerung
3. Kettenverlängerung

Die PCR erlaubt eine hochspezifische, qualitative Aussage über die Präsenz einer Zielsequenz. Bei quantitativen Fragestellungen weisen die auf der klassischen PCR basierenden Verfahren, wie die limitierende Verdünnungsmethode von Sykes [183] oder die kompetitive PCR [184], jedoch wesentliche Nachteile auf.

Im Gegensatz zu den auf Endpunktmessungen basierenden Methoden entwickelte Holland 1991 ein neues Verfahren, bei der die Aufzeichnung der PCR in Echtzeit erfolgt und daher als real-time PCR bezeichnet wird [185]. Die Aufzeichnung des Amplifikationsverlaufs der real-time PCR ist Grundlage für die Quantifizierung der gesuchten Sequenz [185]. Bei dieser PCR Methode wird den beiden konventionellen Primern ein drittes modifiziertes Oligonukleotid zugefügt, welches als Sonde bezeichnet wird und sich an einen Sequenzabschnitt des Amplikons anlagert. Die Sonde unterscheidet sich durch drei Eigenschaften von den Primern. Zum einen ist

sie am 5' Ende phosphoryliert und kann so nicht als Ausgangspunkt einer Kettenverlängerung dienen. Zum anderen trägt die Sonde zwei Farbstoffe, am 5' Ende den Reporter (Fluoreszein-Derivat) und am 3' Ende den so genannten Quencher (Rhodamin-Derivat). Bestrahlt man den Reporterfarbstoff mit Licht einer spezifischen Wellenlänge, so sendet dieser eine Antwortfluoreszenz aus. Diese Fluoreszenz wird jedoch aufgrund des von Förster beschriebenen Fluoreszenz-Energietransfers (FET) vom Quencher absorbiert, falls dieser sich in definiert enger räumlicher Beziehung zum Reporter befindet (Abbildung 2.6, a)) [186].

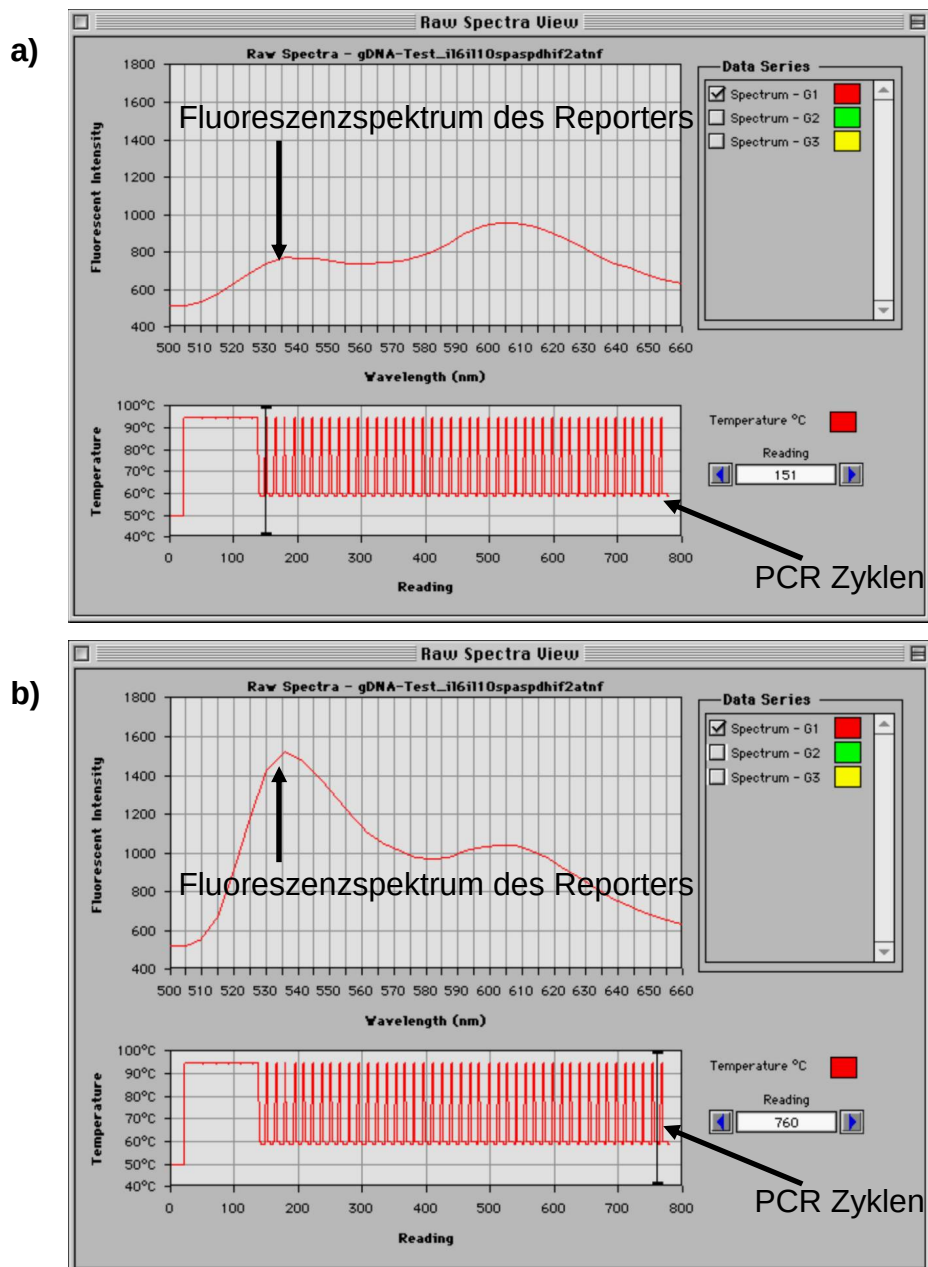


Abbildung 2.6 Im oberen Teil der beiden Bildschirmausschnitte ist die Fluoreszenzintensität auf der Ordinate gegen die Wellenlänge der Fluoreszenz auf der Abszisse dargestellt. Darunter sind die 45 Zyklen der PCR dargestellt. a) Die Fluoreszenzintensität im Spektrum des Reporterfarbstoffs (Pfeil) ist vor dem ersten PCR Zyklus gering; b) nach 44 PCR-Zyklen hat die Fluoreszenzintensität des Reporters (Pfeil) zugenommen.

Gelangt die DNA-Polymerase im Replikationszyklus während der Phase der Kettenverlängerung an die Stelle, an der die Sonde hybridisiert ist, wird diese exonucleolytisch gespalten. Die durch die molekulare Struktur der Sonde determinierte räumliche Beziehung von Quencher und Reporter ist nach der exonucleolytischen Spaltung der Sonde aufgehoben. Daher findet keine Fluoreszenzunterdrückung des Reporters durch den Quencher mehr statt und der Zuwachs des Amplikons kann als proportionale Fluoreszenzzunahme des Reporters in Echtzeit detektiert werden (Abbildung 2.6, b)).

Wesentlich ist hier die Eigenschaft der verwendeten DNA-Polymerase, ausschließlich hybridisierte Sonden zu spalten und so falsch positive Signale, durch Lyse von freien Sonden in der Lösung, vermieden werden.

Für die Durchführung der real – time PCR dieser Studie wurde der ABI PRISM 7700 (Perkin Elmer/Applied Biosystems Division 7700 Sequence Detector) verwendet.

2.4.5. Quantifizierungsstrategien der real – time PCR

Prinzipiell stehen bei der real-time PCR absolute und relative Strategien zur Quantifizierung zur Verfügung. Bei der absoluten Quantifizierung wird unter Verwendung einer Verdünnungsreihe, bei der die Startkopienzahl der einzelnen Proben bekannt ist, eine Standardkurve erstellt. Durch die Anwendung der Amplifikationskurven der zu quantifizierenden Proben auf die Standardkurve kann so die absolute Quantität direkt abgelesen werden.

Alternative Möglichkeiten sind relative Quantifizierungsstrategien, zu der die in dieser Arbeit verwendete $\Delta\Delta C_t$ -Methode gehört [PE Applied Biosystems User Bulletin #2; ABI PRISM 7700 Sequence Detection System, 1997, P/N 4303859 Rev. A].

2.4.5.1. Relative Quantifizierung durch die $\Delta\Delta C_t$ -Methode

Bei der PCR handelt es sich um einen zyklischen Prozess, in dem sich in jedem Zyklus C die Produktmenge der Zielsequenz X verdoppelt. Während der exponentiellen Phase der PCR folgt der Produktzuwachs des Amplikons der Gleichung:

$$\text{Gl. 1.1 } X_{(C)} = X_{(0)} * (1+E_{(X)})^C$$

$X_{(C)}$ Kopienanzahl des Amplikons der Zielsequenz X nach dem Zyklus C

$X_{(0)}$ Initiale Kopienzahl der Zielsequenz X

$E_{(X)}$ ist die PCR Effizienz mit $(0 \leq E \leq 1)$

E ist ein Gütefaktor für die Effizienz der PCR. Während der exponentiellen Phase der Reaktion nähert E sich 1 oder wird bei einer Amplikonlänge <150 Basenpaaren gleich 1.

Der so genannte Schwellenwertzyklus, *threshold cycle* (C_t), ist der fraktionierte Teil eines PCR Zyklus, an dem die Amplikonmenge der Zielsequenz X den Schwellenwert $X_{(T)}$ erreicht. Auf die Gl. 1.1 angewendet ergibt sich so folgender Ausdruck:

$$\text{Gl. 1.2 } X_{(T)} = X_{(0)} * (1+E_{(X)})^{C_t, X} = K_{(X)}$$

$X_{(T)}$ Schwellenwert – Kopienzahl der Zielsequenz

C_t, X ist der Schwellenwertzyklus der Zielsequenz X

$K_{(X)}$ ist eine Konstante

Um Fehlerquellen vor der PCR, wie z.B. unterschiedliche Biopsatgröße oder fehlerhaftes Pipetieren, zu minimieren, wird die zu bestimmende Zielsequenz X in Relation zu einer endogenen Referenz R, dem Housekeeping-Gen, gesetzt, das in allen Proben konstant exprimiert sein sollte.

Es folgt:

$$\text{Gl. 1.3 } \frac{X_T}{R_T} = \frac{X_{(0)} * (1 + E_{(X)})^{Ct,X}}{R_{(0)} * (1 + E_{(X)})^{Ct,R}} = \frac{K_X}{K_R} = K$$

Unter der Annahme, dass Effizienz E während der Zyklus Ct in der exponentiellen Phase gleich ist gilt $E_{(X)} = E_{(R)} = E$. Daraus folgt:

$$\text{Gl. 1.4 } \frac{X_T}{R_T} = \frac{X_0}{R_0} * (1 + E)^{CT,X - CT,R} = K \quad \text{und} \quad \text{Gl. 1.5 } \frac{X_T}{R_T} = \frac{X_0}{R_0} * (1 + E)^{-\Delta CT} = K$$

Für die auf die endogene Kontrolle normalisierte Menge der Zielsequenz $X_{(N)}$ gilt nach Umstellen der Formel:

$$\text{Gl.1.6 } X_N = K * (1 + E)^{-\Delta CT}$$

Neben dem tatsächlichen Unterschied in der Kopienzahl haben verschiedene weitere Faktoren Einfluss auf den Quotienten. So beeinflussen Faktoren, wie Effizienz der Sondenhydrolyse, Reinheit der Sonde oder Auswahl des Thresholds, den Quotienten. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen Versuchsansätzen der TaqMan®-Assays zu erhalten, wird auf jedem Assay eine als Kalibrator bezeichnete Probe gepoolter cDNA mitgeführt. Durch die Verwendung dieser immer gleichen Probe und daraus folgend immer gleichen Kopienzahl im Versuchsansatz wird ein Verankerungspunkt für den Vergleich der Assays geschaffen. Analog zur Normalisierung des Zielgens auf das Housekeeping-Gen wird nun diese auf den Kalibrator K normalisiert:

$$\text{Gl. 1.7 } \frac{X_{N,P}}{X_{N,K}} = \frac{K * (1 + E)^{-\Delta CT,P}}{K * (1 + E)^{-\Delta CT,K}} = (1 + E)^{-\Delta \Delta CT}, \text{ für } E = 1 \text{ gilt } 2^{-\Delta \Delta CT}$$

Zusammengefasst beschreibt der Ausdruck $2^{-\Delta\Delta CT}$ die Expression eines Zielgens relativ zu einem konstant exprimierten Referenzgen und einer Kalibrator-Probe. Auf diese Weise relativiert der Ausdruck $2^{-\Delta\Delta CT}$ zwei wesentliche Arten von Fehlern:

1. Die Fehler in der Probenaufbereitung bis zur PCR werden durch die Normalisierung auf das Housekeeping-Gen relativiert. So beeinflusst beispielsweise eine unterschiedliche Biopsatgröße die absolute Menge der mRNA und folgend auch cDNA im PCR-Ansatz, was jedoch keinen Einfluss auf das Verhältnis der mRNA Mengen der einzelnen Gene zueinander hat.
2. Fehler, die während der PCR z.B. durch schwankende Cyclertemperaturen, Laserintensität oder Farbstoffqualität im Reaktionsansatz auftreten, werden durch die Normalisierung auf den Kalibrator relativiert, da diese Störfaktoren alle Proben in gleicher Weise betreffen und so das Expressionsverhältnis zwischen den Proben gleich bleibt.

2.4.6. Real-time PCR praktische Durchführung

2.4.6.1. Vorbereitung

Die einzelnen Reaktionsgefäße enthielten 1 µl der zu bestimmenden Probe (gDNA, cDNA oder RNA). Hinzu kamen 24 µl des PCR Mastermix, bestehend aus:

- 12,5 µl 2xQPCR universeller Mastermix (Eurogentec, Seraing, Belgien)
- 0,75 µl Sonde (5 µM) (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Je 0,75 µl Forward- und Reverseprimer (beides 10 µM) (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland).

Die letzte Probe einer 96 Reaktionsgefäße enthaltenden PCR-Platte war eine Leerprobe, die *no template control* (NTC), um potentielle Kontaminationen des Mastermixes auszuschließen. Jede Probe wurde als Dreifachmessung bestimmt.

2.4.6.2. PCR

Der initiale Schritt der Reaktion war ein Uracil-N-glycosylase - Verdau für 2 Minuten bei 50°C. Alle im TaqMan® durchgeführten PCR-Reaktionen enthielten das in der natürlichen DNA nicht vorkommende dUTP anstelle von dTTP als DNA Baustein. Durch den initialen Uracil-N-Glycosylase (UNG) Verdau wurden alle durch vorherige

PCR entstandenen DNA Kontaminationen gespalten [187], da diese potentiell als Template für die neue Reaktion in Betracht kommen.

Es folgte die Aktivierung der Hot GoldStar Polymerase bei 95°C für 10 Minuten.

Die folgenden Schritte wurden 45-mal wiederholt

- Denaturierung für 15 Sekunden bei 95°C
- Primer- und Sonden-Anlagerung sowie Kettenverlängerung für 1 Minute bei 60°C

2.4.7. Auswertung am Taqman®

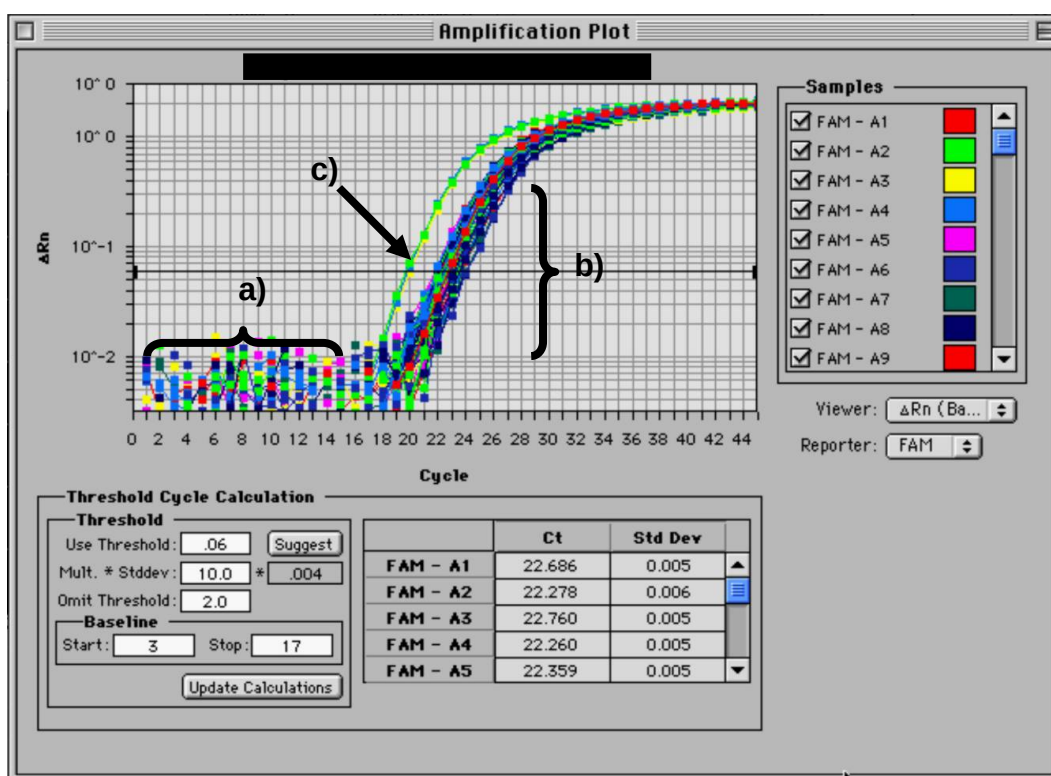


Abbildung 2.7 Die Abbildung zeigt einen Bildschirmausschnitt der Aufzeichnung der Amplifikationskurven durch den Taqman®. Die Fluoreszenzzunahme des Reportersignals ΔR_n auf der Ordinate ist gegen die PCR-Zyklen auf der Abszisse in halblogarithmischer Darstellung aufgetragen. Abschnitt a) zeigt das initiale Hintergrundrauschen. Der Abschnitt b) zeigt die exponentielle Phase der PCR. Die Gerade c) ist der Schwellenwert (Threshold) zur Ermittlung des fraktionierten Thresholdcycles (Ct), der die Grundlage für die relative Quantifizierung ist.

Abbildung 2.7 zeigt in halblogarithmischer Darstellung die produktproportionale Zunahme der Reporterfarbstoff-Fluoreszenzintensität (ΔR_n) aller Proben auf der Ordinate gegen die PCR-Zyklen auf der Abszisse. Aus dem initialen Rauschen der Signale (Abbildung 2.7 Abschnitt a)) erscheinen im Übergang zur exponentiellen Phase der PCR die Signale der Einzelproben (Abschnitt b)). Zur Auswertung werden zwei Schritte durchgeführt:

1. Anpassen der Baseline:

Durch die manuelle Angabe des Bereichs der initialen Zyklen mit Hintergrundrauschen, als so genannte Baseline (Abbildung 2.7 Abschnitt a)), und dem im Mastermix vorhandenen passiven Referenzfarbstoff ROX glättete das Taqman®-Analyseprogramm (Sequence Detection System (SDS) Software Version 1.9.1) das Signalrauschen und korrigierte gerätbedingte Fehlmessungen durch Normalisierung auf den passiven Referenzfarbstoff ROX.

2. Wahl des Thresholds

Die Quantifizierung nach der $\Delta\Delta C_t$ - Methode setzt C_t – Werte während der exponentiellen Phase der PCR voraus (siehe oben). Die exponentielle Phase der PCR Einzelsignale kommt in halblogarithmischer Auftragung als Gerade zur Darstellung (Abbildung 2.7 Abschnitt b)). Der Threshold musste also so gewählt werden, dass alle Signalkurven in dieser Darstellung im linearen Bereich der Kurve geschnitten wurden. Dies geschah durch optische Beurteilung und anschließende manuelle Festlegung des Threshold (Abbildung 2.7, Gerade c))

Nachfolgend wurde der Schnittpunkt der Signaleinzelkurve mit dem Threshold als Bruchteil des PCR-Zyklus, als C_t – Wert, ausgegeben.

Die Dreifachmessungen jeder Probe wurden arithmetisch gemittelt und gingen so in die $\Delta\Delta C_t$ – Auswertung ein.

2.4.8. Evaluation der real-time PCR Methode

2.4.8.1. Isolation genomischer DNA

Genomische DNA wurde aus gepoolten Blutproben der Muttertiere unter Verwendung des *QIAamp DNA Blood Mini Kits* (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.4.8.2. Spezifität der Primer und Sonde

Um die Spezifität der Primer und Sonden für die gesuchten Sequenzen der mRNA jedes Gens zu testen, wurden real-time PCR Assays angefertigt, bei denen als Template

- RNA
- genomische DNA und
- als positiv Kontrolle cDNA

verwendet wurden. Bei ausreichender Spezifität von Primern und Sonde für die gesuchte mRNA Sequenz wurden keine Amplifikationen in der real-time PCR der Proben mit gDNA und RNA aufgezeichnet.

2.4.8.3. PCR – Effizienzen

Für die korrekte Quantifizierung setzt die $\Delta\Delta C_t$ – Methode gleich bleibende PCR Effizienzen voraus. Daher wurden in der vorliegenden Studie 7-stufige 1:2 Verdünnungsreihen der Kalibratorprobe angefertigt und eine Standardkurve der PCR-Effizienz für jedes Gen aufgezeichnet. Als quantifizierbar wurde das Primer – Sonden – Set eines Gens erachtet, wenn eine PCR – Effizienz von mindestens 95% erreicht wurde. Die in Doppelbestimmung aufgezeichneten Messpunkte der Standardreihe mussten einen Korrelationskoeffizient von mindestens $r^2 = 0,99$ zur Ausgleichsgeraden aufweisen.

2.4.8.4. Housekeeping-Gen Evaluation

Die $\Delta\Delta C_t$ -Methode setzt eine konstante Expression des verwendeten Housekeeping-Gens voraus. Die Expressionen gängiger Housekeeping-Gene können jedoch variieren und bedürfen daher einer Evaluation.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine etablierte Methode zur Evaluation der Housekeeping-Gen Expression verwendet, welche die in der real-time PCR gemessene Expression des potentiellen Housekeeping-Gens in Relation zu der in der reversen Transkription gewonnenen Gesamt-cDNA Menge setzt [188, 189].

Hierzu wurde die Gesamt-cDNA Menge mittels Plasmid-Standardreihe absolut quantifiziert. Bei konstanter Expression des Housekeeping-Gens verhält sich die in der real-time PCR gemessene Housekeeping-Gen Expression proportional zur Gesamt-cDNA Menge. Ein konstanter Quotient lässt somit Rückschlüsse auf die Güte des Housekeeping-Gens zu.

Die absolute Quantifizierung der in der reversen Transkription hergestellten cDNA basiert auf der Fluoreszenz des Oligreen®-Farbstoffs, die in ihrer Intensität von der Nukleinsäurebindung abhängig ist. Da diese Anlagerung und Fluoreszenz nicht spezifisch für cDNA ist, mussten potentielle Verunreinigungen, wie RNA, genomische DNA oder RNA-DNA-Hybride, aus der cDNA-Lösung entfernt werden [188, 189]. Hierzu wurden 50 μ l cDNA aus der reversen Transkription aufgereinigt. Der nötige DNase Verdau wurde bereits in Kapitel 2.4.1 beschrieben. Zur Vorbereitung des RNase Verdau erfolgte zunächst eine Inkubation bei 95°C für 5 Minuten, um die Sekundärstrukturen freier RNA sowie RNA-DNA-Hybride zu denaturieren. Um ungewollte Rehybridisierungen zu minimieren, wurde der Ansatz im Anschluss schnell auf 4°C gekühlt.

Der RNase Verdau erfolgte bei 37°C für 2 Stunden durch Zugabe von 1 μ l RNase A (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) der Konzentration 5,6 ng/ μ l. Anschließend wurde durch Zugabe von 4 μ l des RNaseinhibitors RNase OUT (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) sowie 1 μ l DTT (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und Inkubation für 30 Minuten bei 37°C die RNase A deaktiviert.

Die abschließende Entfernung von RNA- und gDNA-Spaltprodukten sowie etwaigen Verunreinigungen durch Proteine, Salze oder Lösungsmittel erfolgte durch die Anwendung des *PCR Purification Kits* (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Der abschließende Wasch-Schritt wurde zweimalig durchgeführt.

Die gereinigte cDNA wurde in 50 µl hochreinem Wasser LiChroSolv (Merck, Darmstadt, Deutschland) eluiert. Neu gebildete cDNA-Sekundärstrukturen sollten durch Denaturieren bei 95°C für 5 Minuten und Abkühlung auf 4°C minimiert werden. 32 µl gereinigter cDNA jeder Probe wurden mit 128 µl LiChroSolv (Merck, Darmstadt, Deutschland) verdünnt und anschließend zur 3-fach Bestimmung in Ansätze zu je 50 µl aufgeteilt. Diesen wurde anschließend 50 µl Farbstoffmix folgender Zusammensetzung zugegeben:

- 0,25 µl OliGreen® (Molecular Probes, USA) (verdünnt nach Herstellerangaben; Absolutkonzentration wird vom Hersteller nicht angegeben)
- 1,00 µl RhoX6 (0,1 g/L) (Molecular Probes, USA) als passive Referenz
- 48,75 µl LiChroSolv (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Die Aufzeichnung der Standardkurve erfolgte in Doppelbestimmung einer 7-stufigen 1:2 Verdünnungsreihe bestehend aus:

- 50 µl 8kb-Standard M13mp19 Plasmid (Gibco BRL, Belgien) der jeweiligen Verdünnungsstufe
- 50 µl Farbstoffmix

Dies entspricht Plasmidkonzentration in den Einzelstufen der Verdünnungsreihe zwischen 0,03 und 2 ng/µl als 100 µl Ansatz.

Zur Aufzeichnung und Auswertung der Fluoreszenzen wurde der ABI PRISM 7700 SDS verwendet.

2.5. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. W. Pabst (Institut für medizinische Informatik des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen, Arbeitsgruppe Statistik, Leiter: Dr. R.-H. Bödeker).

Eine Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ wurde als signifikant erachtet. Die genaue Irrtumswahrscheinlichkeit „p“ wird im Ergebnisteil angegeben.

Für die statistische Auswertung und Erstellung der Grafiken wurde die Software SPSS für WINDOWS Version 12.0 sowie Microsoft Excel 2003 verwendet.

2.5.1. Tierexperimenteller Teil

Die Daten der auxologischen Untersuchungen werden als Median sowie Minimum und Maximum (Bereich) angegeben. Die histomorphometrischen Daten werden als arithmetisches Mittel $\pm$ Standardabweichung angegeben.

Die statistische Auswertung der auxologischen und histologischen Daten erfolgte unter Verwendung des Mann-Whitney U Tests. Die Korrelation zwischen einzelnen Studienvariablen wurde mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten nach Spearman überprüft. Die Datenanalysen haben explorativen Charakter.

2.5.2. Molekularbiologischer Teil

Da eine Normalverteilung nicht vorausgesetzt werden konnte, sind die molekularbiologischen Daten der mRNA Quantifizierungen mittels real-time PCR als Median sowie Minimum und Maximum (Bereich) dargestellt. Die statistische Auswertung dieser Daten erfolgte unter Verwendung des Mann-Whitney U Tests. Die Korrelation zwischen einzelnen Studienvariablen wurde mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten nach Spearman überprüft. Die Datenanalysen haben explorativen Charakter.

3. Ergebnisse

3.1. Tierexperimentelle Untersuchungen

3.1.1. Auxologie

Die Muttertiere der Hypoxie- und Normoxiegruppe zeigten während des gesamten Beobachtungszeitraums ein unauffälliges Sozial-, Fress- und Trinkverhalten. Die Würfe zweier Muttertiere wurden aufgrund eines intrauterinen Fruchttodes bzw. fetaler kongenitaler Malformationen von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

Vom makroskopischen Aspekt waren die Feten der Hypoxiegruppe unreifer. Die Extremitäten der Feten der Hypoxiegruppe waren fragiler und wurden näher am Körper gehalten als in der Normoxiegruppe. Die Feten der Hypoxiegruppe hatten im Vergleich zu denen der Normoxiegruppe weniger differenzierte Akren (Pfoten, Krallen, Schnauze). Zudem war die Haut der Feten in der Hypoxiegruppe transparenter als in der Normoxiegruppe. Abbildung 3.1 zeigt den makroskopischen Aspekt zweier neonataler Feten aus Hypoxie- und Normoxiegruppe im direkten Vergleich unmittelbar nach der Entbindung.

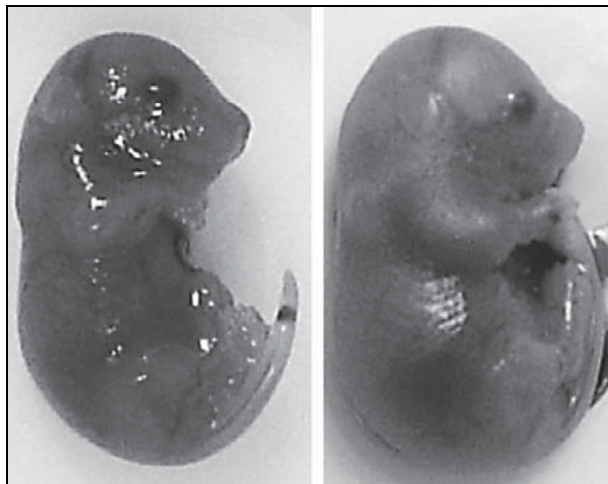


Abbildung 3.1 Makroskopie zweier neonataler Feten unmittelbar nach Entbindung am Embryonaltag ET 17,5. Die linke Bildhälfte zeigt einen Fet aus der Hypoxiegruppe, der Fet der rechten Bildhälfte stammt aus der Normoxiegruppe.

Sowohl die Wurfgröße pro Muttertier (Hypoxiegruppe: 6 Feten; 5-8; Normoxiegruppe: 6 Feten; 5-8) als auch die Verteilung der Feten in Utero unterschied sich in beiden Gruppen nicht signifikant. Die Wurfgröße und die intrauterine Verteilung der Feten wiesen keine signifikante Korrelation zu Geburtsgewicht, Körperlänge oder Kopfgröße auf.

Die Feten der Hypoxiegruppe hatten signifikant geringere Geburtsgewichte (0,690g; 0,396 - 0,862 vs. 0,973g; 0,811 - 1,116, $p < 0,0001$), geringere Körperlängen (17,5mm; 16,06 - 18,97 vs. 20,22mm; 16,98 - 21,97, $p < 0,0001$) und geringere Kopfgrößen (9,35mm; 8,73 - 9,93 vs. 10,14mm; 9,45 - 10,83, $p < 0,0001$) als die Feten der Kontrollgruppe (Abbildung 3.2 a)-c)). Tabelle 8.1 des Anhangs gibt die auxologischen Daten der Feten beider Gruppen wieder.

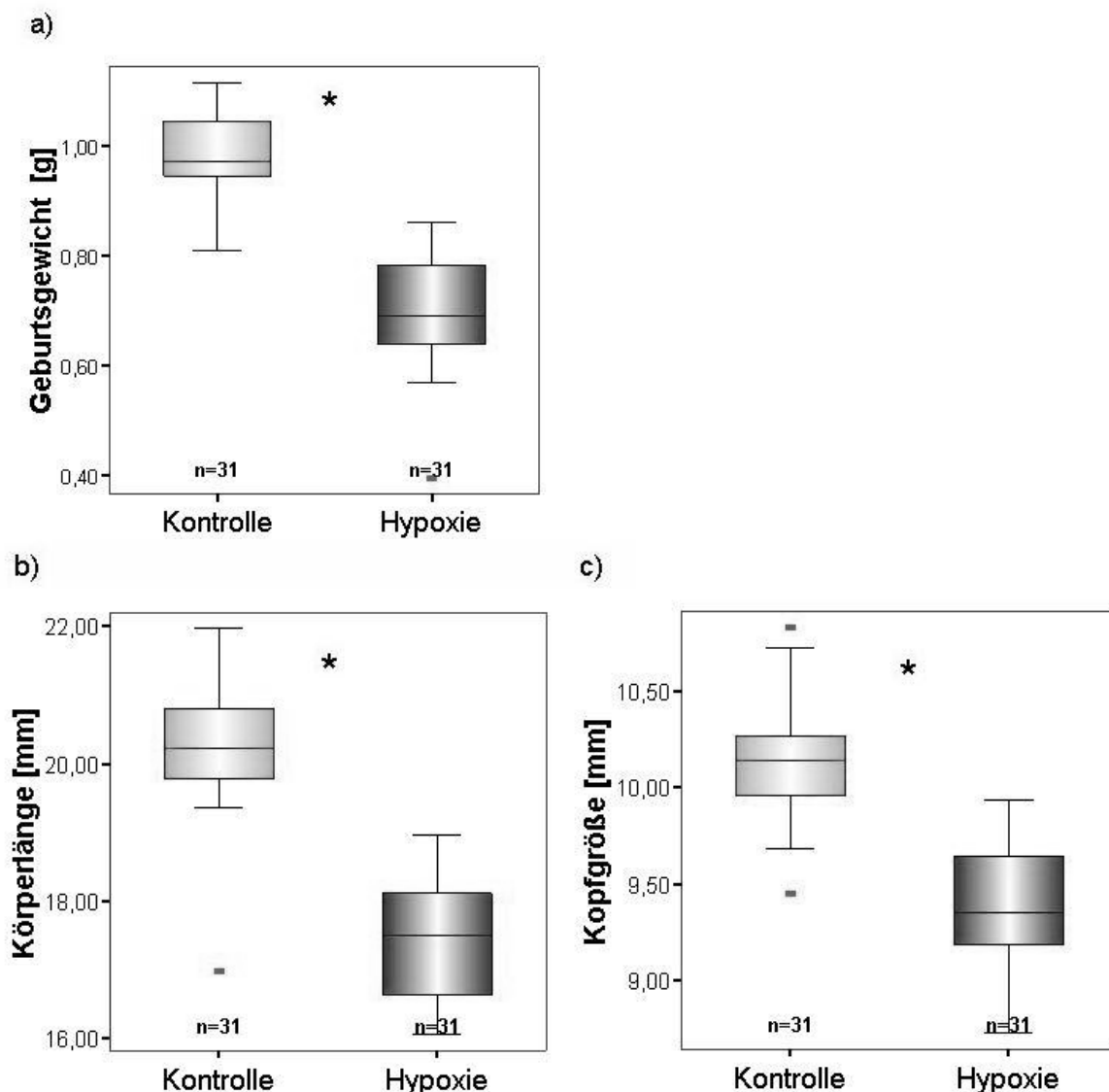


Abbildung 3.2 Dargestellt sind die fetalen auxologischen Daten im Gruppenvergleich als Box- und-Whisker-Diagramme. a) Geburtsgewicht [g], b) Körperlänge [mm] gemessen vom Scheitel bis zum Steiß, c) Kopfgröße [mm] gemessen von der Schnauzenspitze bis zum Hinterhaupt, ■ Ausreißer, * $p < 0,0001$

Das Verhältnis der fetalen Kopfgrößen zu Körperlängen war bei den Feten der Hypoxiegruppe signifikant größer ($p < 0,0001$) als bei den Feten der Normoxiegruppe (Tabelle 3.1, Abbildung 3.3).

Tabelle 3.1 Verhältnis der fetalen Kopfgröße/Körperlänge

	Median	Minimum	Maximum
Kontrollgruppe	0,50	0,46	0,58
Hypoxiegruppe	0,54	0,49	0,59

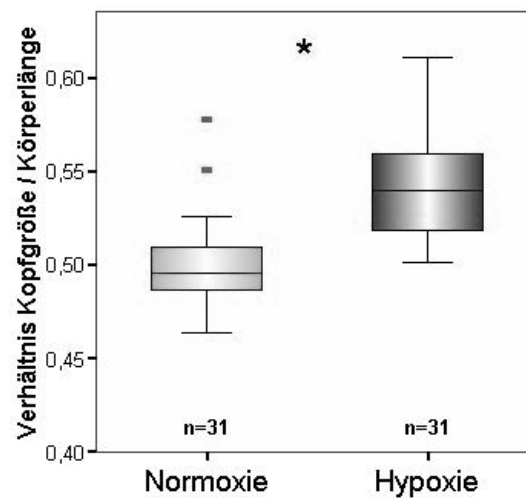


Abbildung 3.3 Dargestellt ist das Verhältnis der fetalen Kopfgrößen zur Körperlänge im Vergleich zwischen Kontroll- und Hypoxiegruppe als Box-und-Whisker-Diagramm, ■ Ausreißer, * $p < 0,0001$

3.1.2. Histologische Lungenentwicklung

Die lichtmikroskopischen Fotografien in Abbildung 3.4 zeigen exemplarisch die Histologie fetaler Lungen aus der Normoxiegruppe am Embryonaltag ET 17,5. Anhand der histologischen Erscheinung ist der Entwicklung der Lungen im Übergang vom kanalikulären zum sakkulären Stadium einzuordnen (vgl. Kapitel 1.2).

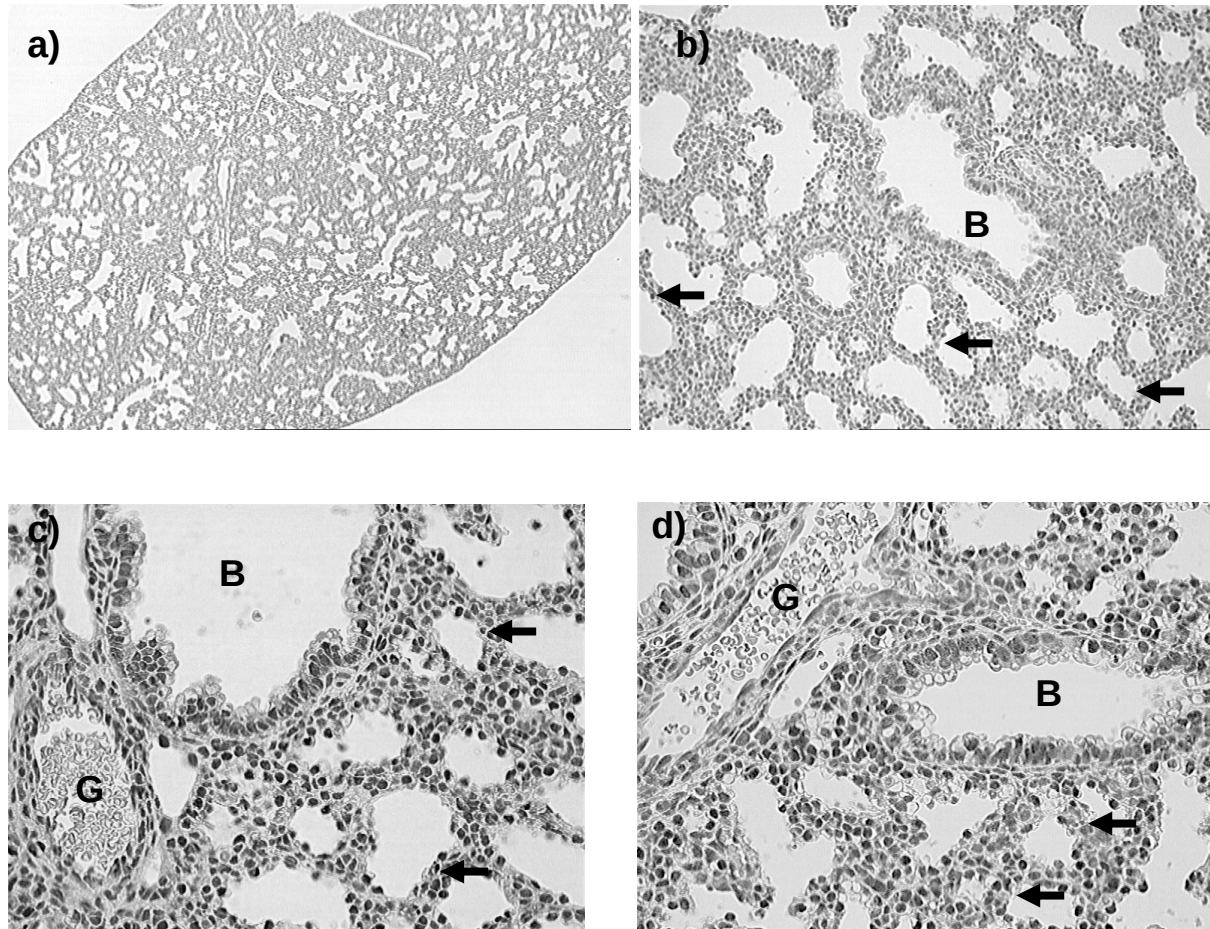


Abbildung 3.4 Die Abbildungen zeigen lichtmikroskopische Fotografien fetaler Lungen der Normoxiegruppe am Embryonaltag ET 17,5. Es sind Anschnitte des Bronchialsystems (B) mit begleitenden Gefäßen (G) zu erkennen. Die Wände der sakkulären Lufträume bestehen aus mehrschichtigen kubiodalen Zellen und sind als prospektive Alveolarsepten zu verstehen (Pfeile). Das Stadium der Lungenentwicklung befindet sich im Übergang vom kanalikulären zum sakkulären Stadium. Vergrößerungen a) 10 fach, b) 20 fach, c) und d) 40 fach

Die Beurteilung der histologischen Lungenentwicklung in Hypoxie- und Normoxiegruppe anhand der Anzahl sakkulärer Lufträume pro Gesichtsfeld ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen. Die Lungen der Hypoxiegruppe wiesen 60 ± 7 , die der Normoxiegruppe 61 ± 6 sakkuläre Lufträume pro Gesichtsfeld auf (siehe Abbildung 3.5 a)).

Ebenso konnte bei der histomorphometrischen Untersuchung der Wandstärke der sakkulären Lufträume kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden ($12.1 \mu\text{m} \pm 1.3$ vs. $11.5 \mu\text{m} \pm 1.8$ in Hypoxiegruppe vs. Kontrollgruppe; Abbildung 3.5 b)).

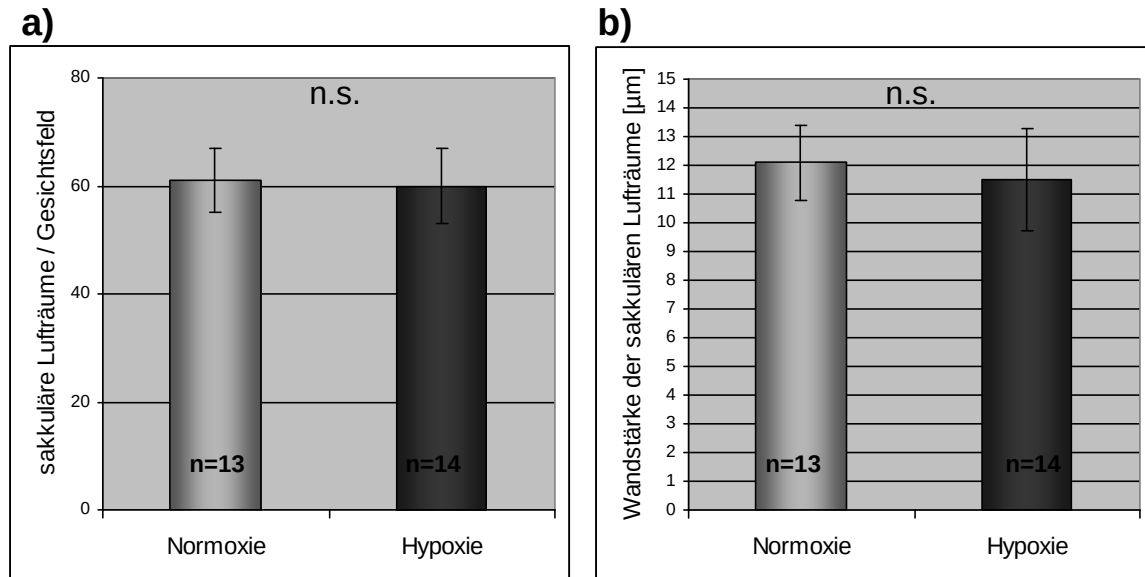


Abbildung 3.5 Die Abbildung zeigt eine graphische Darstellung der histomorphometrischen Untersuchungsergebnisse im Vergleich zwischen Kontroll- und Hypoxiegruppe. Aus den dorsalen und ventralen Lungenabschnitten jedes Feten wurden 5 zufällig ausgewählte Gesichtsfelder beurteilt. Abbildung a) zeigt die Anzahl der sakkulären Lufträume pro Gesichtsfeld (MW $\pm$ SEM). Abbildung b) zeigt die Wandstärke der sakkulären Lufträume in [μm] (MW $\pm$ SEM). n.s. = nicht signifikant

3.2. Molekularbiologische Untersuchungen

3.2.1. Evaluation der Housekeeping-Gene

Der Quotient der in der real-time PCR gemessenen Housekeeping-Gen mRNA Expression zur Gesamt-cDNA wurde zur Evaluation der potentiellen Housekeeping-Gene geprüft. Eine geringe Spannweite dieses Quotienten spricht für die Güte des potentiellen Housekeeping-Gens. Der Quotient wurde im intra- und inter-Gruppenvergleich betrachtet.

Der Quotient des Housekeeping-Gens β -Actin zeigte sowohl bei der Betrachtung der Differenz der Mediane als auch bei der Beurteilung der Spannweite des Quotienten im intra- und inter-Gruppenvergleich die geringsten Schwankungen.

Bei der Betrachtung des Quotienten des Housekeeping-Gens 18S zeigte sich ein signifikanter ($p < 0,05$) Unterschied zwischen Hypoxie- und Normoxiegruppe. Daher ist 18S unter den vorliegenden Versuchsbedingungen als Housekeeping-Gen zur Quantifizierung durch die $\Delta\Delta C_t$ -Methode ungeeignet. Als Konsequenz aus der Housekeeping-Gen-Evaluation wurde bei allen weiteren Datenanalysen β -Actin als Housekeeping-Gen verwendet.

Tabelle 3.2 gibt die Quotienten (mRNA Expression der Housekeeping-Gene zur Gesamt-cDNA) der Housekeeping-Gen Evaluation wieder. Abbildung 3.6 a-c) sind graphische Darstellungen der Quotienten der Housekeeping-Gen Evaluation.

Tabelle 3.2 Housekeeping-Gen Evaluation, Quotient der mRNA Expression der Housekeeping-Gene zur Gesamt-cDNA

	mRNA Expression Housekeeping-Gen / Gesamt-cDNA					
	Kontrolle			Hypoxie		
	Median	Minimum	Maximum	Median	Minimum	Maximum
18S*	0,0310	0,0188	0,0392	0,0246	0,0139	0,0335
β -Actin	0,0163	0,0138	0,0248	0,0166	0,0115	0,0248
PBGD	0,0285	0,0196	0,0490	0,0234	0,0161	0,0330

* $p < 0,05$

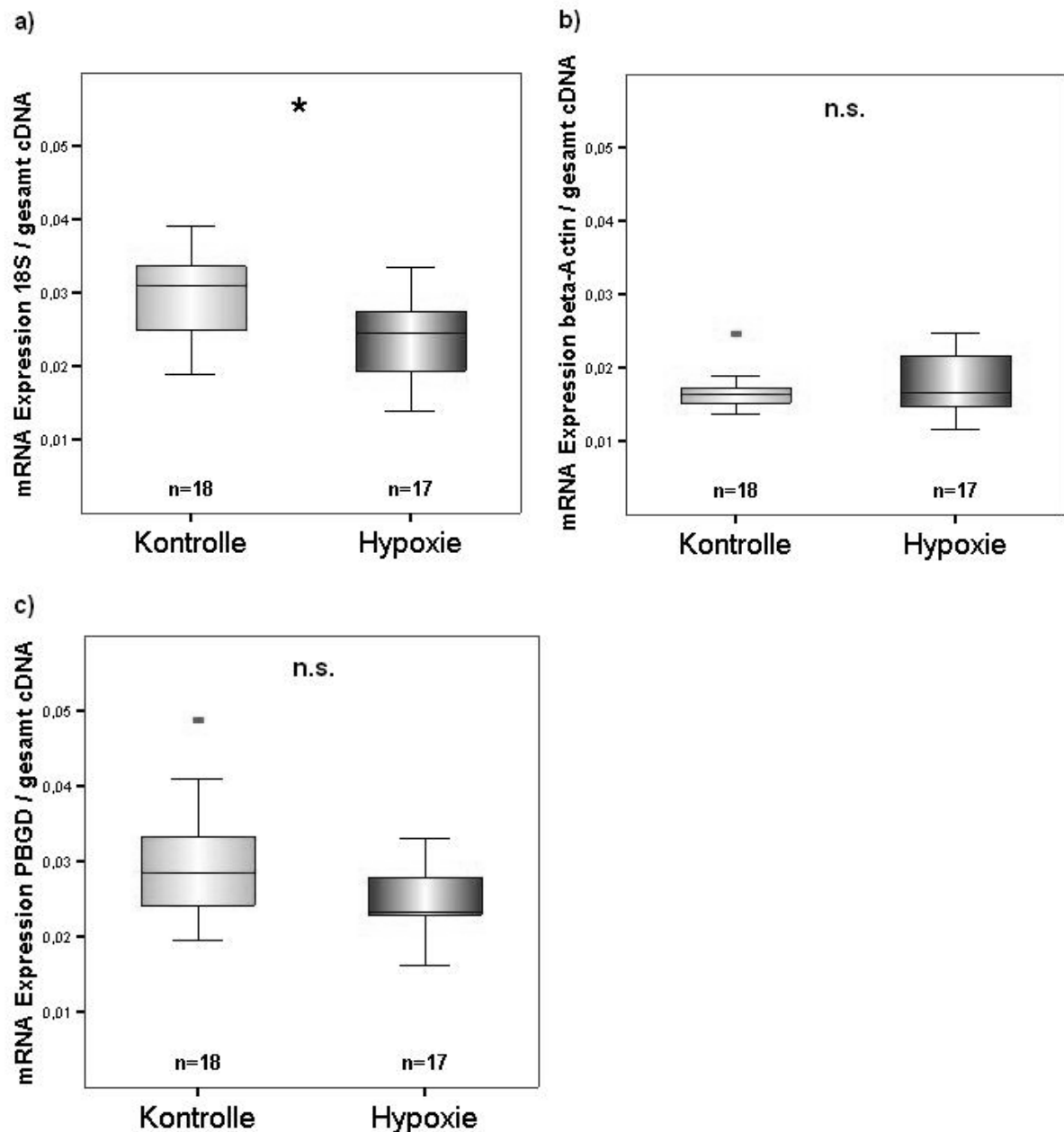


Abbildung 3.6 Die Abbildung zeigt Box-und-Whisker-Diagramme des Quotienten der Housekeeping-Gen mRNA Expression zur Gesamt-cDNA im Gruppenvergleich für die Housekeeping-Gene a) 18S b) β -Actin und c) PBGD. Das Housekeeping-Gen 18S zeigte eine signifikante ($p < 0,05$) Differenz des Quotienten zwischen Kontroll- und Hypoxiegruppe. Der Quotient des Housekeeping-Gens β -Actin zeigte im intra- und inter-Gruppenvergleich die geringste Spannweite sowie die geringste Differenz der Mediane. ■ Ausreißer, * $p < 0,05$, n.s. nicht signifikant

3.2.2. Expression pulmonaler mRNA

Der Einfluss der hypoxie-induzierten intrauterinen Wachstumsrestriktion auf die pulmonale mRNA Expression ausgewählter Gene der Lungenentwicklung und Funktion wurde mittels real-time PCR ermittelt. Anschließend wurden die mRNA Expressionen relativ quantifiziert ($\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode). Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse dieser Untersuchung dargestellt.

3.2.2.1. Pulmonale IGF-1 und IGF-1R mRNA Expression

Die pulmonale mRNA Expression des Wachstumsfaktors IGF-1 wies keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontroll- und Hypoxiegruppe auf. Die mRNA Expression des Rezeptors IGF1-R wies ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen auf (Abbildung 3.7).

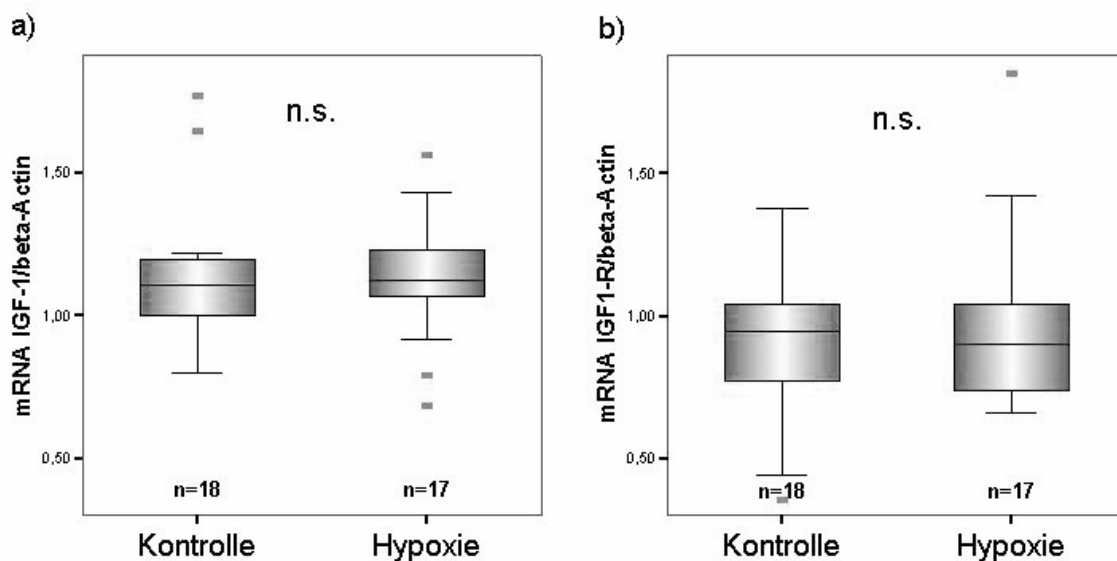


Abbildung 3.7 relative mRNA Expression a) Insulin like growth factor 1 b) Insulin like growth factor 1 receptor, relativ quantifiziert mittels $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode β -Actin und Kalibratorprobe, n.s. nicht signifikant, ■ Ausreißer

3.2.2.2. Pulmonale VEGF, VEGF-R1 und VEGF-R2 mRNA Expression

Die mRNA Expression des Wachstumsfaktors VEGF war im fetalen Lungengewebe der Hypoxiegruppe signifikant ($p < 0.05$) geringer exprimiert als in der Kontrollgruppe (Abbildung 3.8 a)). Die mRNA Expressionen der VEGF – Rezeptoren 1 und 2 waren demgegenüber nicht differentiell exprimiert. Die Abbildung 3.8 b) und c) geben eine graphische Darstellung der mRNA Expressionen beider Rezeptoren in den jeweiligen Gruppen wieder.

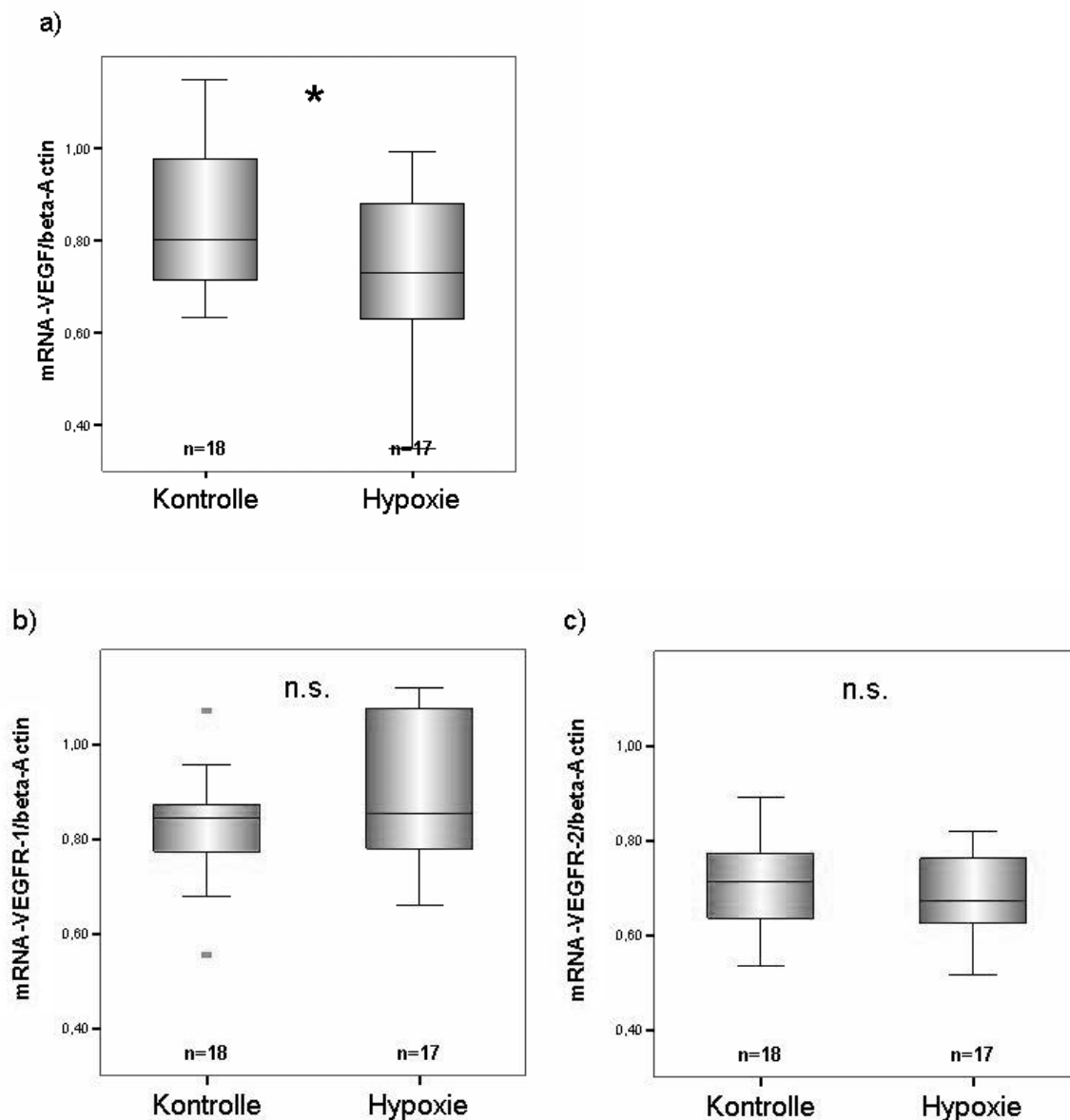


Abbildung 3.8 relative mRNA Expression a) VEGF b) VEGFR-1 c) VEGFR-2, relativ quantifiziert mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode β -Actin und Kalibratorprobe, * $p < 0.05$, n.s. nicht signifikant, ■ Ausreißer

3.2.2.3. Pulmonale HIF-1 α und HIF-2 α mRNA Expression

Während die mRNA Expression des ubiquitären HIF-1 α keinen signifikanten Unterschied in den Gruppen zeigte, war die mRNA Expression des lungenspezifischen HIF-2 α im pulmonalen Gewebe der Hypoxiegruppe signifikant niedriger exprimiert als in der Kontrollgruppe ($p=0,004$).

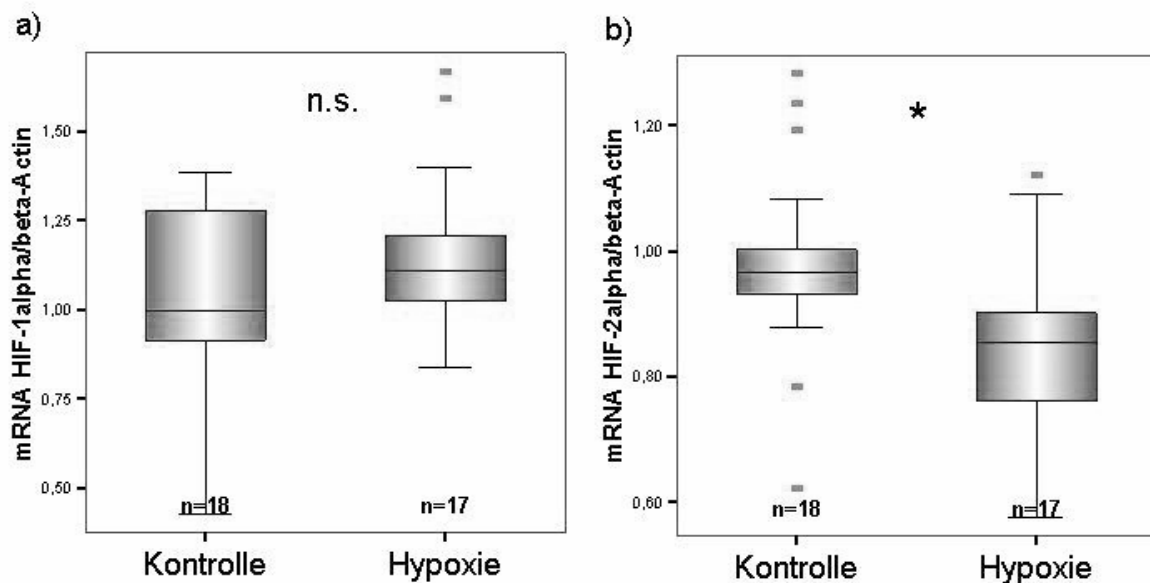


Abbildung 3.9 relative mRNA Expression a) HIF1- α , b) HIF2- α , relativ quantifiziert mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode β -Actin und Kalibratorprobe, * $p=0,004$, n.s. nicht signifikant, ■ Ausreißer

3.2.2.4. Surfactant assoziierte Proteine

Die mRNA Expression des Surfactant assoziierten Proteins A (SP-A) war in der Hypoxiegruppe signifikant geringer ($p=0.001$) als in der Kontrollgruppe, wohingegen das zweite hydrophile Surfactant assoziierte Protein D (SP-D) keine differentielle Expression zeigte (Abbildung 3.10).

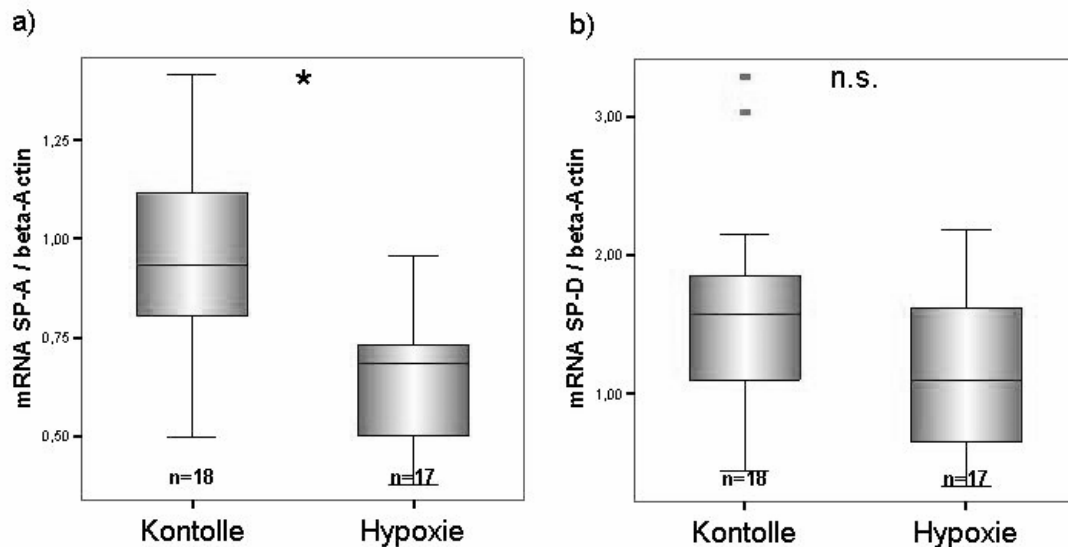


Abbildung 3.10 relative mRNA Expression der hydrophilen a) SP-A und b) SP-D, relativ quantifiziert mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode β -Actin und Kalibratorprobe, * $p=0.001$, n.s. nicht signifikant, ■ Ausreißer

Die mRNA Expression der beiden hydrophoben Surfactant assoziierten Proteine war im Lungengewebe der Hypoxiegruppe signifikant geringer als in der Kontrollgruppe, SP-B ($p<0.05$) und SP-C ($p<0.01$) (Abbildung 3.11).

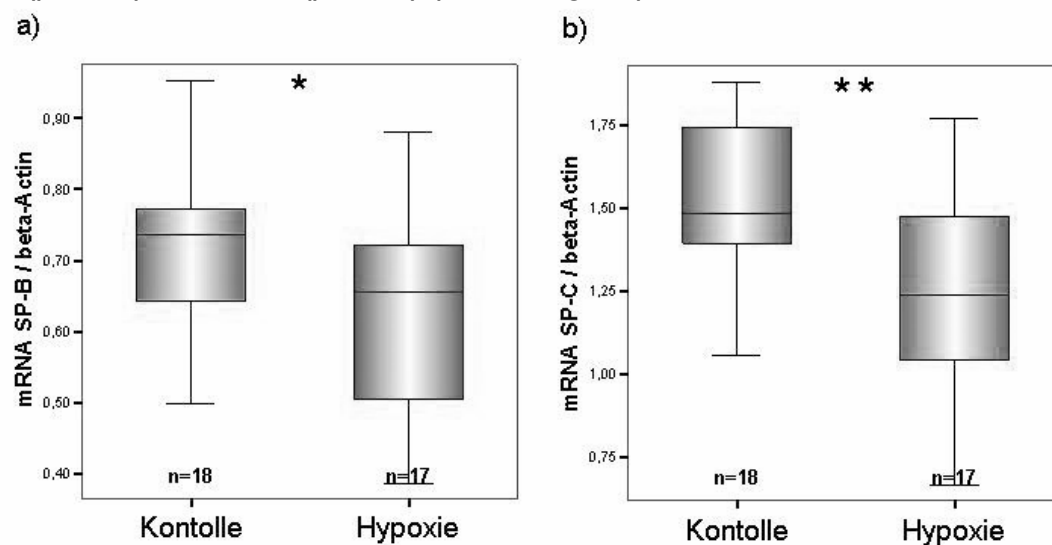


Abbildung 3.11 relative mRNA Expression der hydrophoben a) SP-B und b) SP-C, relativ quantifiziert mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode β -Actin und Kalibratorprobe, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, n.s. nicht signifikant, ■ Ausreißer

3.2.2.5. Pulmonale IL-6, TNF- α und IL-10 mRNA Expression

Die mRNA Expressionen der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α zeigten keine differentielle Expression in beiden Gruppen. Die mRNA Expression des anti-inflammatorische IL-10 war im Lungengewebe der Feten der Hypoxiegruppe stärker exprimiert als in der Kontrollgruppe ($p < 0.05$). Die absolute Expression der Inflammediatoren erreichte die Nachweisgrenze. In drei Proben der Kontrollgruppe war keine IL-10 mRNA detektierbar. Abbildung 3.12 zeigt die mRNA Expression der Inflammediatoren im Gruppenvergleich.

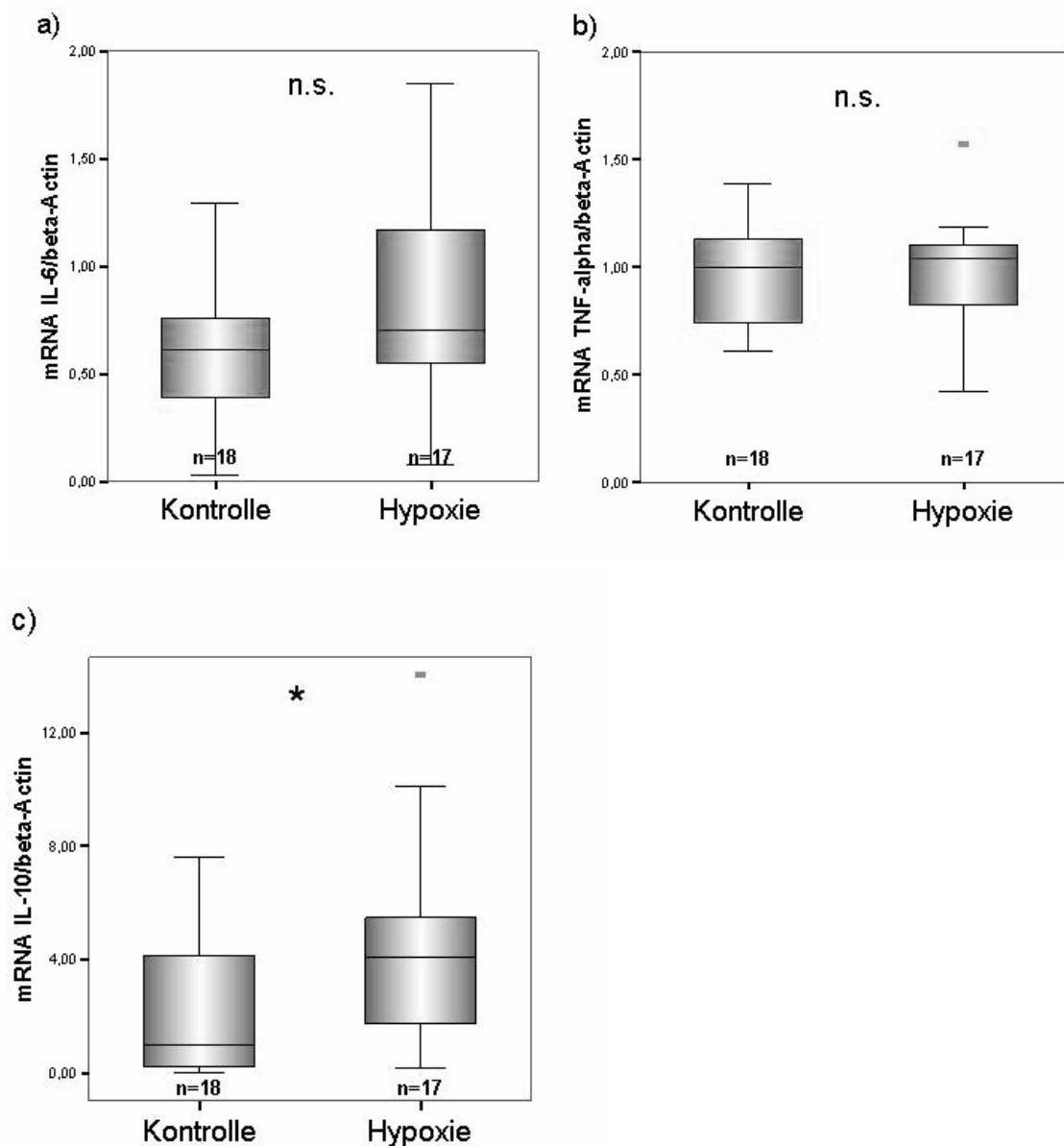


Abbildung 3.12 relative mRNA Expression der pro-inflammatorischen Zytokine a) Interleukin 6 b) Tumornekrosefaktor alpha sowie des anti-inflammatorischen c) Interleukins 10, relativ quantifiziert mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode β -Actin und Kalibratorprobe, * $p < 0.05$, n.s. nicht signifikant, ■ Ausreißer

3.2.2.6. Korrelationsanalyse pulmonaler mRNA Expressionen

Es wurde eine Korrelationsanalyse der pulmonalen mRNA Expressionen durchgeführt. Die mRNA Expressionen der untersuchten Gene zeigten keine signifikante Korrelation zur Wurfgröße oder zu einzelnen Muttertieren.

Die Rangkorrelation nach Spearman zeigte eine positive Korrelation der mRNA Expression der lungenspezifischen HIF Untereinheit, HIF-2 α zur VEGF mRNA Expression ($r_s = 0,547$, $p = 0,001$) (Abbildung 3.13 b)). Die mRNA Expression von HIF-1 α korrelierte nicht signifikant mit der VEGF mRNA Expression (Abbildung 3.13 a)).

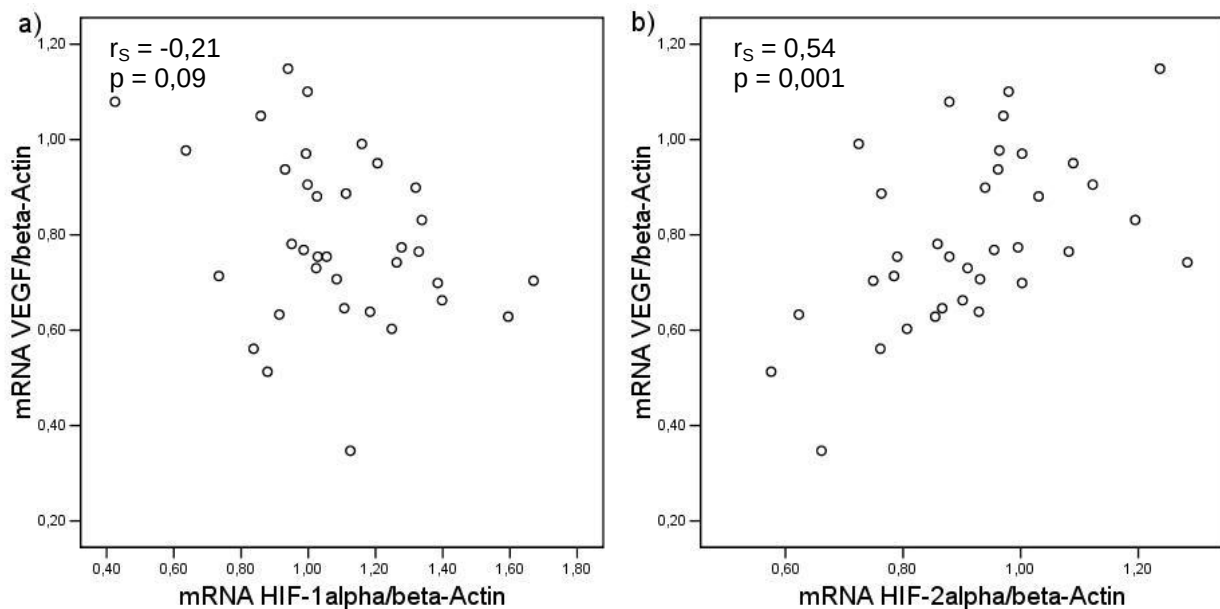


Abbildung 3.13 Korrelationsanalyse der mRNA Expression relativ quantifiziert mittels $\Delta\Delta Ct$ -Methode β -Actin und Kalibratorprobe von VEGF und a) HIF-1 α (nicht signifikant) und b) HIF-2 α , $r_s = 0,54$, $p = 0,001$

Die Expression der VEGF mRNA zeigte eine positive Korrelation zur mRNA Expression des Surfactant assoziierten Proteins A ($r_s = 0,761$, $p < 0,001$), zur mRNA Expression des Surfactant assoziierten Proteins B ($r_s = 0,744$, $p < 0,001$), zur mRNA Expression des Surfactant assoziierten Proteins C ($r_s = 0,772$, $p < 0,001$) und zur mRNA Expression des Surfactant assoziierten Proteins D ($r_s = 0,739$, $p < 0,001$). Abbildung 3.14 zeigt die VEGF mRNA Expression auf der Abszisse aufgetragen gegen SP-A – D mRNA Expressionen auf der Ordinate.

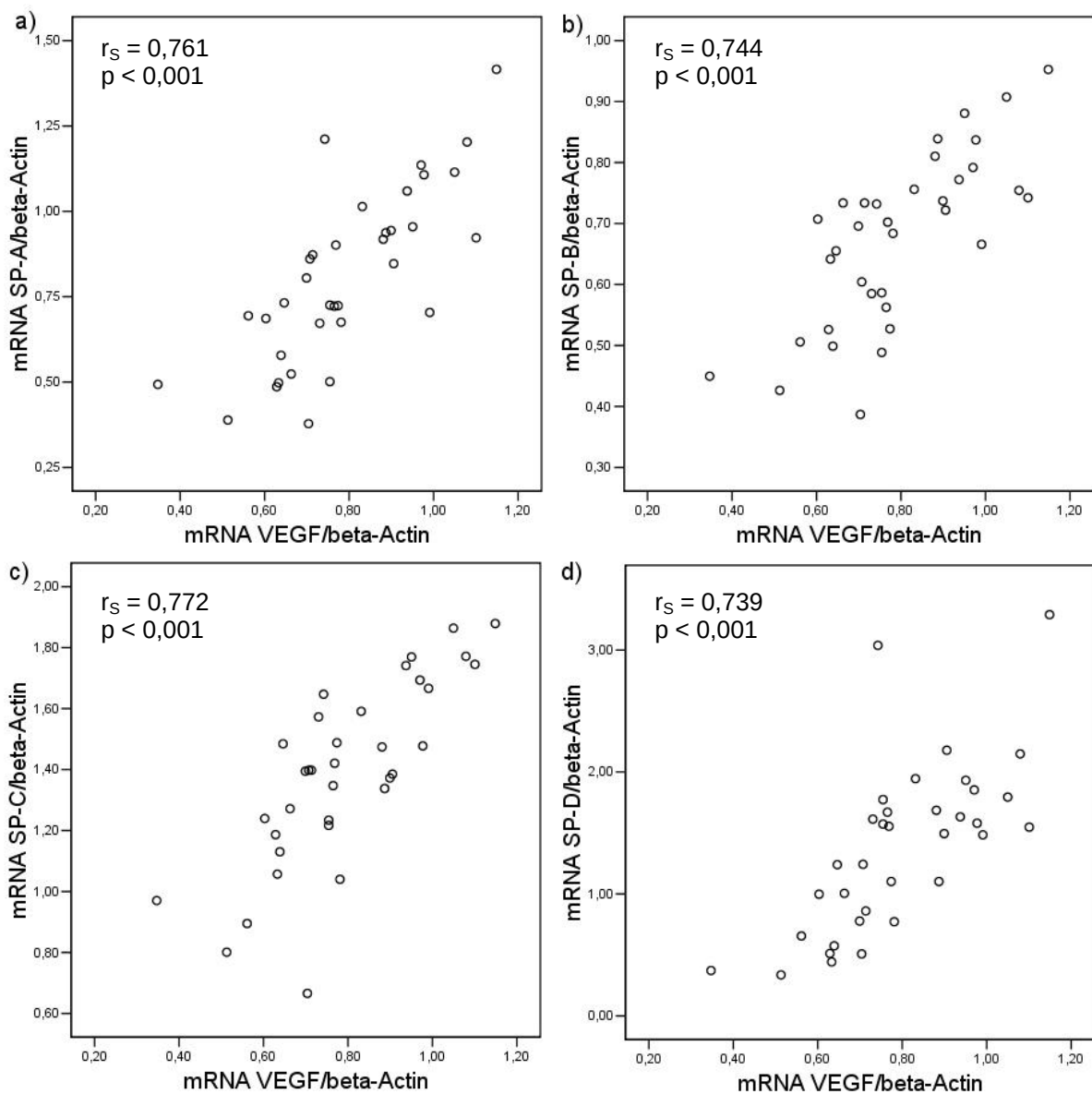


Abbildung 3.14 Streudiagramme der mRNA Expressionen relativ quantifiziert mittels $\Delta\Delta Ct$ -Methode β -Actin und Kalibratorprobe. a) VEGF gegen SP-A, b) VEGF gegen SP-B, c) VEGF gegen SP-C, d) VEGF gegen SP-D. Der Korrelationskoeffizient nach Spearman r_s und die Irrtumswahrscheinlichkeit „p“ sind in den Diagrammen angegeben.

4. Diskussion

4.1. Methodische Aspekte

4.1.1. Tierexperimenteller Teil

Die Versuchstiere wurden vom Tierzüchter Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Die Auswahl der Muttertiere erfolgte durch den Züchter unter Berücksichtigung der Zuchtparameter des Tierstalls. Individuelle Aufzeichnungen bezüglich spezifischer Parameter einzelner Tiere, wie genaues Gewicht zum Zeitpunkt der Verpaarung oder Agilität der Tiere, wurden vom Züchter nicht bereitgestellt. Auf eine Erfassung dieser Parameter zum Zeitpunkt der Lieferung wurde verzichtet, da diese aufgrund der bereits fortgeschrittenen Gestation und der unterschiedlichen Anzahl der intrauterinen Feten nur eingeschränkten Informationsgehalt gehabt hätten. Den hieraus potentiell resultierenden Einflussfaktoren auf das fetale Wachstum wurde durch eine ausreichende Stichprobenzahl von $n=5$ Muttertieren pro Gruppe begegnet.

Nach Angaben des Tierzüchters erleiden die Tiere während des Transports einen durchschnittlichen Gewichtsverlust von 10% des Körpergewichts. Der hierdurch auftretende zusätzliche gestationsschädigende Einfluss relativiert sich durch die Gleichbehandlung aller Tiere.

Studien belegen den Einfluss von maternaler Malnutrition auf das fetale Gewicht [46]. Denkbar ist, dass auch die Hypoxie Einfluss auf das Fressverhalten der Mäuse nimmt. Schwartz et al. zeigten, dass intermittierende Hypoxie, die zur IUGR führt, mit einer um ca. 10% verminderten Futteraufnahme bei Sprague-Dawley Ratten einhergeht. Die alleinige Reduktion der maternalen Futtermenge um diesen Betrag verursacht jedoch keine IUGR bei den Feten [190]. Demzufolge ist die verminderte Futteraufnahme der Ratten in Hypoxie für die Induktion der IUGR als ein untergeordneter Einflussfaktor zu werten.

Sollte es bei der Maus um eine vergleichbare Reduktion der Futteraufnahme wie bei den ca. sieben mal schwereren Ratten kommen, entspricht dies im vorliegenden Versuch einer theoretischen Reduktion der Futtermenge um 0,5 g pro Tag (Berechnungsgrundlage: Durchschnittliche Futteraufnahme der Tiere nach Tierzüchterangaben). Des Weiteren relativiert sich der Informationsgehalt der Futteraufnahme durch die unterschiedlichen Wurfgrößen und den somit individuell variierenden Bedarf der Muttertiere. Sowohl aus messtechnischen Gründen als auch

aufgrund des zusätzlichen Stresses für die Tiere durch das häufige Wiegen, wurde von der Überwachung der Futteraufnahme abgesehen.

Neben den oben diskutierten extrinsischen Faktoren, die im Versuch Einfluss auf die Gestation nehmen können, sind weitere gestationsbedingte Faktoren, wie die Wurfgröße oder die Fetenanzahl pro Uterushorn, als potentielle Faktoren anzusehen, die das fetale Wachstum beeinflussen können. Die beiden oben genannten Faktoren zeigten im vorliegenden Versuch keine statistisch signifikante Korrelation zur fetalen Körpergröße oder dem Geburtsgewicht.

4.1.2. Histologische Aufarbeitung

Die Lungen der Feten wurden direkt nach der Präparation nativ in das Fixationsmedium gebracht. Eine für die Histomorphometrie ausreichend standardisierte druckkontrollierte Perfusion der Lungen war aufgrund der geringen Organabmessungen und der fragilen Trachea nicht möglich. Da die Feten zum Zeitpunkt der Entnahme keine makroskopisch erkennbaren Atembewegungen zeigten, kann davon ausgegangen werden, dass die Lungen mit fetaler Lungenflüssigkeit gefüllt waren. Durch das native Fixieren der fetalen Lungen wurde so ein ausreichendes Maß an Vergleichbarkeit geschaffen.

4.1.3. Real-time PCR

Für die Auswertung real-time PCR basierter Quantifizierungen stehen absolute und relative Quantifizierungsstrategien zur Verfügung. Die Strategie der absoluten Quantifizierung eignet sich für den Einsatz bei Fragestellungen, bei denen die Kenntnis der absoluten Kopienanzahl nötig ist, wie z.B. die Bestimmung der Viruslast bei HIV-Patienten [191-193]. Unterschiedliche Extraktionskoeffizienten in der RNA-Isolation sowie schwankende RT-Effizienz oder Pipettierungenauigkeiten belasten schon vor der eigentlichen PCR die quantitative Aussage wesentlich. Auch während der PCR lassen sich geräteabhängige Fehler nur schwer eliminieren (z.B. schwankende Laserintensität oder Störungen in der Optik).

Eine Alternative sind relative Quantifizierungsstrategien, zu denen die in dieser Arbeit verwendete $\Delta\Delta Ct$ -Methode gehört. Unter Verlust der absoluten quantitativen Aussage ist es möglich, den störenden Einfluss der oben genannten Faktoren auf das Quantifizierungsergebnis zu minimieren. Dies geschieht durch Normierung der in der real-time PCR gemessenen Expression der zu quantifizierenden mRNA

Sequenz, auf die mRNA Expression eines Housekeeping-Gens und einer als Kalibrator bezeichneten Verankerungsprobe.

Die wesentliche Eigenschaft, die ein Housekeeping-Gen besitzen muss, ist eine konstante Expression. Studien belegen, dass gebräuchliche Housekeeping-Gene, wie β -Actin, GAPDH, Tubuline oder β -2 Mikroglobulin, jedoch unter bestimmten Versuchsbedingungen nicht konstant exprimiert werden [194, 195]. Da die Housekeeping-Gen Expression bei der relativen Quantifizierung durch die $\Delta\Delta C_t$ -Methode eine Konstante ist, wird bei variabler Expression des Housekeeping-Gens die quantitative Aussage in einem relevanten Maß beeinflusst. Daher bedarf die Housekeeping-Gen Expression einer genauen Evaluation.

Die hier verwendete Oligreen-Methode ist zur Evaluation der Housekeeping-Gen Expression geeignet [188, 189]. Die Beurteilung der drei in dieser Studie untersuchten Housekeeping-Gene, PBGD, β -Actin und 18S ergab für β -Actin die geringste Expressionsschwankung. Die statistisch signifikante Differenz der 18S mRNA Expression zwischen der Hypoxie- und Normoxiegruppe belegt in Übereinstimmung mit anderen Studien [194, 195], dass auch als etabliert geltende Housekeeping-Gene wie 18S inhomogen exprimiert werden bzw. durch Versuchsbedingungen beeinflusst werden können. Dies unterstreicht die Notwendigkeit der oftmals nicht durchgeführten Housekeeping-Gen-Evaluation bei relativen Quantifizierungsstrategien.

Ein weiterer Störfaktor relativer Quantifizierungen ist die PCR-Effizienz. Während der exponentiellen Phase der PCR verdoppelt sich die Produktmenge in jedem Zyklus. Bei der relativen Quantifizierung mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode wird diese Produktmengenverdopplung durch eine feststehende Exponentialfunktion ausgedrückt. Sollte es bei der Durchführung der real-time PCR zu Schwankungen in der PCR-Effizienz kommen, wird die Quantifizierung durch die fehlende Anpassung der Exponentialfunktion an die tatsächliche PCR-Effizienz beeinträchtigt. Um dieser Fehlerquelle zu begegnen, wurde die PCR-Effizienz der einzelnen Gene anhand von Verdünnungsreihen mittels gepoolter cDNA aus Proben beider Gruppen bestimmt. Es wurden nur die Gene quantifiziert, für die wiederholt eine konstante PCR-Effizienz nahe 100% belegt werden konnte.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die real-time PCR eine hoch sensitive, vielfach erprobte Methode der mRNA Expressionsanalyse ist [196, 197]. Die Anwendung der $\Delta\Delta C_t$ -Methode kann wesentliche Schwächen anderer

Quantifizierungsstrategien ausgleichen, erfährt jedoch im Besonderen durch die inhomogene Housekeeping-Gen Expression und schwankende PCR-Effizienzen ihre Einschränkungen.

4.2. Diskussion der Ergebnisse

4.2.1. Hypoxie-induzierte IUGR – Tierexperimentelle Aspekte des Maus-Modells

Auch heute weisen intrauterin wachstumsretardierte Frühgeborene eine wesentlich erhöhte neonatale Morbidität und Mortalität auf [2-6, 11, 18]. Aufgrund einer erhöhten Notwendigkeit intensivmedizinischer Versorgung, die aus der Morbidität intrauterin wachstumsretardierter Frühgeborener resultiert, ist dieses Patientenkollektiv auch von sozioökonomischer Bedeutung [4].

Pathogenetisch wird bei einer Plazentainsuffizienz, aus der eine IUGR resultiert, eine fetale Minderversorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff diskutiert [2, 3, 40, 41]. Die Bedeutung einer reduzierten fetalen Sauerstoffversorgung für die Entwicklung einer IUGR wird klinisch bei chronisch anämischen Schwangeren erkennbar. Eine Vielzahl von Studien belegt, dass maternale Anämie mit konsekutiver fetaler Hypoxie [19, 198, 199] sowie maternale zyanotische Herzfehler eine IUGR zur Folge haben kann [198]. Ein reduziertes Sauerstoffangebot während der Gestation bedingt durch den Aufenthalt in großen Höhen (über 2000 Meter) führt ebenfalls zu einer Reduktion des Geburtsgewichts [17, 200, 201].

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde in dieser Studie die maternale Hypoxie während der Gestation zur Induktion einer experimentellen IUGR ausgewählt. Wesentliche Vorteile eines Modells, welches eine maternale Hypoxie zur Induktion der experimentellen IUGR verwendet, sind der hohe Standardisierungsgrad in der Versuchsdurchführung, die einfache praktische Durchführung und die Vermeidung von Komplikationen, wie sie durch chirurgische Eingriffe bei invasiven Modellen (z.B. Plazentaembolisation, Ligation der uterinen Gefäße) vorkommen.

Da es technisch nicht möglich war, eine Blutgasanalyse bei den nur knapp 2 cm großen Feten durchzuführen, konnte nicht direkt nachgewiesen werden, ob die maternale Hypoxie im vorliegenden Modell auch tatsächlich zur fetalen Hypoxie führte. Die molekularbiologischen Untersuchungen geben allerdings einen indirekten Hinweis auf eine unwesentliche oder fehlende Hypoxie im fetalen Lungengewebe, da

sich in der Gruppe der IUGR-Feten im Vergleich zur Kontrollgruppe keine höhere mRNA Expression der hypoxie-sensitiven Gene zeigte (siehe Kapitel 4.2.6).

Die asymmetrisch proportionierte Wachstumsrestriktion (IUGR Typ I) ist mit 75% der häufigste Typ der IUGR [1, 14]. Betrachtet man den intrauterinen Wachstumsverlauf, so ist für diesen Typ der IUGR das Einsetzen der Abweichung vom physiologischen Wachstumsverlauf - im Sinne einer Wachstumsrestriktion - im letzten Gestationsdrittel typisch [1]. Daher wurde für die Modell-Etablierung dieser Studie der Beginn der Hypoxie zur IUGR Induktion am Embryonaltag ET 14 gewählt (physiologische Gestationsdauer der Mäuse 19-21 Tage).

Klinische Studien zeigen ein signifikant erhöhtes Risiko für eine Frühgeburt bei Schwangerschaften, die durch intrauterine Wachstumsrestriktion belastet sind [7-9]. Daher wurde in dieser Studie die Gestation der Tiere am Embryonaltag ET 17,5 beendet, um sowohl eine Frühgeburt zu erzeugen als auch den Geburtszeitpunkt zu standardisieren.

Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass die maternale Hypoxie zu einer deutlichen IUGR führte. Die Feten der Hypoxiegruppe wiesen in allen betrachteten auxologischen Merkmalen (Geburtsgewicht, Körperlänge und Kopfgröße) eine signifikante Wachstumsrestriktion gegenüber den Feten der Kontrollgruppe auf. Ferner zeigten die Feten der Hypoxiegruppe einen signifikant größeren Quotienten Kopfgröße zu Körperlänge. Aufgrund dieses Quotienten ist die IUGR in diesem Modell als asymmetrisch zu klassifizieren und entspricht somit dem epidemiologisch häufigsten IUGR Typ. Die Umverteilung des fetalen Wachstums zu Gunsten des Kopfes ist als Anpassungsmechanismus an die erschwerten Wachstumsbedingungen zum Vorteil essentieller Körperregionen zu interpretieren. Eine symmetrische Wachstumsrestriktion würde demgegenüber für eine Dekompensation der fetalen Anpassungsmechanismen sprechen.

Bestehende Tiermodelle zur experimentellen Induktion einer IUGR erzeugen eine Plazentainsuffizienz entweder direkt durch arterielle Embolisation und Ligation der uterinen Gefäße oder verursachen das Minderangebot an Nährstoffen indirekt durch Malnutrition der Mutter [42-46].

Die Embolisations- und Ligationsmodelle zeichnen sich durch ihren invasiven Charakter aus. Hierdurch entfernen sich diese Modelle von den klinisch häufigen Pathogenesen einer IUGR bei Plazentainsuffizienz wie Nikotinabusus, Hypertonus oder Zwillingschwangerschaft [1, 2, 16, 19]. Zusätzlich treten bei Plazentaembolisation und arterieller Ligation in Kleintier-Modellen aufgrund der filigranen Anatomie Probleme bei der praktischen Durchführung und Standardisierung auf. Die teilweise wiederholten Eingriffe verursachen neben der gewünschten Minderperfusion der Plazenta zusätzliche Komplikationen, wie Infektionen, perioperativen Stress und Schmerzen.

Die Pathogenese der auf diese Weise experimentell induzierten IUGR ist daher als heterogen zu bezeichnen und erschwert so die Zuordnung von pathogenetischen Faktoren mit den aus ihnen resultierenden fetalen Folgen. Insbesondere bei Studien zur Lungenentwicklung sind Modell bedingte Komplikationen, wie perioperativer Stress und Infektion, die mit erhöhten fetalen Kortisol- und pro-inflammatorischen Zytokinspiegeln einhergehen, als potentielle Einflussfaktoren der Lungenreife anzusehen [180, 202, 203].

Für Malnutritionsmodelle konnte gezeigt werden, dass eine ausreichende Flüssigkeits- und/oder Nahrungsrestriktion eine IUGR zur Folge hat [46]. Unterernährung spielt in der Pathogenese der IUGR in den Industrieländern jedoch praktisch keine Rolle. Es bestehen Hinweise, dass die IUGR in Folge von maternaler Malnutrition andere pathophysiologische Anpassungsmechanismen, insbesondere im vaskulären System, auslöst, als dies bei einer auf chronischer Hypoxie basierenden IUGR der Fall ist [204, 205].

4.2.2. Charakterisierung des pulmonalen Entwicklungsstadiums und Übertragungsmöglichkeit auf den Menschen

Der Fortschritt der pulmonalen Entwicklung zum Zeitpunkt der Geburt ist ein entscheidender Faktor der neonatalen Morbidität und Mortalität. Im vorliegenden Versuch befanden sich die fetalen Lungen der IUGR und Kontrollgruppe zum Entnahmezeitpunkt im Übergang vom sakkulären zum kanalikulären Stadium der Lungenentwicklung. Dieser Entwicklungsstand wird bei der humanen Lungenentwicklung in der 24.-26. Schwangerschaftswoche erreicht [48]. Eine Geburt in der 24.-26. Schwangerschaftswoche geht bei der überwiegenden Zahl der Neugeborenen mit schweren respiratorischen Störungen, wie dem RDS, einher, die jedoch einer Behandlung zugänglich sind [4, 6, 23, 206].

Da die Feten der vorliegenden Studie unmittelbar nach der Entnahme thorakotomiert wurden, konnten keine funktionell respiratorischen Daten der Feten aufgezeichnet werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass neonatale Mäuse des hier verwendeten Stammes mit Schnittenbindung am Embryonaltag ET 17,5 in 60% der Fälle unmittelbar und weitere 40% der Fälle innerhalb von Stunden an respiratorischer Insuffizienz mit Zeichen eines RDS versterben [96]. Die Lungenentwicklung ist jedoch zu diesem Zeitpunkt so weit fortgeschritten, dass die Feten einer Therapie mit Senkung der Mortalität zugänglich sind [96]. Der so charakterisierte pulmonale Entwicklungsstand der Mausfeten weist Parallelen zur Situation menschlicher Frühgeborener in der 24. bis 26. Schwangerschaftswoche auf.

4.2.3. Vergleichende histomorphometrische Untersuchungen der fetalen Lungen

Die Feten der Hypoxiegruppe und Kontrollgruppe dieser Studie wiesen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Wandstärke der sakkulären Lufträume und Anzahl der sakkulären Lufträume pro Gesichtsfeld auf.

Im Langzeitverlauf zeigen Patienten mit IUGR eine Einschränkung der Lungenfunktion [35-39]. Aus Tierversuchen ist bekannt, dass die pulmonalen Langzeitfolgen nach IUGR ein histologisches Korrelat besitzen [44, 45, 207, 208]. Maritz et al. zeigten, dass intrauterin wachstumsretardierte Lämmer an den Beobachtungszeitpunkten im Alter von 8 Wochen bzw. 2 Jahren, im Vergleich zur nicht retardierten Kontrollgruppe, breitere Alveolarsepten, weniger Alveolen und einen geringeren Prozentsatz luftgefüllter Räume in den Lungen aufwiesen [44, 207]. Bei der Betrachtung der fetalen Lungen wenige Tage vor dem physiologischen Geburtstermin unterschieden sich die IUGR und die Kontrollgruppe bei Maritz et al., analog den Ergebnissen der vorliegenden Studie, auf lichtmikroskopischer Ebene jedoch nicht. Anhand von elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten Maritz et al. allerdings zeigen, dass auch zu diesem Zeitpunkt bereits Unterschiede in der pulmonalen Ultrastruktur bestanden, die sich progredient bis zu den beiden weiteren Betrachtungszeitpunkten im Alter von 8 Wochen bzw. 2 Jahren entwickelten. Die Lungen der wachstumsretardierten Lämmer zeigten in der elektronenmikroskopischen Untersuchung eine Verbreiterung der Basalmembran und der Blut-Gas-Schranke [44, 207].

Vergleichbare Ergebnisse erbrachten die Untersuchungen von Larson und Kollegen an durch maternale Hypoxie intrauterin wachstumsretardierten Ratten [209]. Die fetalen Lungen zeigten auch in dieser Studie zum Zeitpunkt der Geburt keinen Unterschied hinsichtlich der Anzahl der sakkulären Lufträume sowie deren Wandstärke in IUGR und Kontrollgruppe.

Die im Langzeitverlauf beschriebenen histologischen Änderungen der Lungenstruktur bei intrauterin Wachstumsretardierten sind zum Zeitpunkt der Geburt in den zitierten Studien, wie auch der vorliegenden Arbeit, auf lichtmikroskopischer Ebene nicht zu erkennen. Daher ist zu folgern, dass die pulmonalen histologischen Veränderungen bei intrauteriner Wachstumsrestriktion entweder sekundär infolge postnataler Einflüsse entstehen oder sich, wie von Maritz et al. beschrieben, progredient auf

Basis der zum Geburtszeitpunkt vorhandenen ultrastrukturellen Veränderungen entwickeln.

4.2.4. Messung der pulmonalen mRNA Expression zur Charakterisierung pulmonaler Anpassungsmechanismen

Bei den molekularbiologischen Untersuchungen des fetalen pulmonalen Gewebes wurden Genexpressionen auf Ebene der mRNA Expression betrachtet. Die mRNA Expression ist nicht mit der Menge oder Aktivität des jeweilig assoziierten Proteins gleichzusetzen, da sowohl auf Ebene der Proteinbiosynthese und des Proteinabbaus als auch durch Aktivierung und Inhibition des definitiven Proteins multiple Möglichkeiten zur Regulation der biologischen Wirkung bekannt sind. Die mRNA Expression ist allerdings ein wesentlicher Mechanismus der Adaptation an geänderte zelluläre und systemische Bedingungen [210].

4.2.5. Einfluss der hypoxie-induzierten Wachstumsrestriktion auf die pulmonale IGF-1 und IGF-1Rezeptor mRNA Expression

Eine Vielzahl von Studien belegt den Einfluss des IGF-Systems auf das intrauterine und postnatale Wachstum. Während das embryonale Wachstum hauptsächlich durch IGF-2 beeinflusst wird, kommt gegen Ende der Gestation IGF-1 die größere Bedeutung zu [55, 211]. IGF-1 ist in löslicher und matrixassoziiierter Form vorhanden [55]. Der quantitativ bedeutende Teil des IGF-1 ist matrixassoziiert und wirkt auto- und parakrin auf die Zellproliferation und Differenzierung der Organe [55, 212, 213]. Die fetalen Serumkonzentrationen der löslichen IGF-1 Form korrelieren positiv mit dem Gestationsalter und dem Geburtsgewicht [41, 63, 66, 214] und sind sowohl in klinischen als auch in tierexperimentellen Studien bei intrauteriner Wachstumsrestriktion reduziert [42, 63, 215].

Aufgrund des Einflusses der intrauterinen Wachstumsrestriktion auf die lösliche IGF-1 Form und der wesentlichen Bedeutung der gewebeassoziierten Form für die Organentwicklung [42, 63, 215], wurde in dieser Studie die pulmonale IGF-1 mRNA Expression bei wachstumsretardierten Feten untersucht.

Die vorliegende Studie konnte keine signifikanten Unterschiede betreffend der mRNA Expression von IGF-1 und seinem Hauptrezeptor IGF-1R im Lungengewebe der IUGR- und Kontrollgruppe nachweisen. Price et al. untersuchten ebenfalls die lungenspezifische mRNA Expression von IGF-1, IGF-1R und zusätzlich die von

IGFBP-1 an intrauterin wachstumsretardierten Ratten [216]. Price fand analog zu den hier beschriebenen Ergebnissen keine Änderungen der lungenspezifischen IGF-1 und IGF-1R mRNA Expression. Allerdings konnte Price einen Anstieg der IGFBP-1 mRNA Expression in den Lungen der wachstumsretardierten Ratten nachweisen [216]. In klinischen Studien wurde die IGFBP-1 Proteinkonzentration im Nabelschnurblut wachstumsretardierter Neugeborener untersucht und ebenfalls höhere Konzentrationen als bei der nicht retardierten Kontrollgruppe festgestellt [42, 63]. IGFBP-1 reguliert durch Bindung des freien IGF-1 dessen Bioverfügbarkeit [217], interagiert direkt mit den IGF-Rezeptoren [55] und kann so die IGF-1 und IGF-1R Wirkungen inhibieren [54].

Da die IUGR in der vorliegenden Studie keinen direkten Einfluss auf die pulmonale IGF-1 und IGF1-R mRNA Expression hatte, kann die IGF-1 vermittelte Gewebeproliferation und Differenzierung dennoch indirekt durch erhöhte Expression des inhibitorischen IGFBP-1 affiziert sein. Weitere Studien zur Expression der lungengebundenen IGF-Bindungsproteine sind somit nötig.

Alternativ kann spekuliert werden, dass der Bedeutungswechsel vom für die embryonale Entwicklung essentiellen IGF-2 zum IGF-1 bei der Mausentwicklung später anzusetzen ist als beim Menschen und deshalb kein wesentlicher Einfluss am Embryonaltag ET 17,5 festzustellen war. Unterstützung findet diese These darin, dass bei der Maus der Anstieg der organgebundenen IGF-1 mRNA erst am Embryonaltag ET 19 erfolgt [218], während dies beim Menschen schon an einem relativ früheren Zeitpunkt der Gestation der Fall ist [66]. Widersprüchlich ist jedoch, dass IGF-1 Protein in der Lunge des Mausembryos bereits ab dem Embryonaltag ET 12,5 gefunden [219] und an ET 13,5 im relevanten Maß mit IGF-1R interagiert [57].

4.2.6. Einfluss der hypoxie-induzierten Wachstumsrestriktion auf die pulmonale HIF und VEGF mRNA Expressionen

Die Differenzierung des pulmonalen vaskulären Systems ist von fundamentaler Bedeutung für die funktionelle Reife der Lunge [47, 50, 80, 81]. Dem Differenzierungs- und Proliferationsfaktor VEGF kommt bei der pulmonalen Gefäßentwicklung eine wesentliche Bedeutung zu [50, 81, 122, 220, 221]. Ein VEGF Defizit mündet in einer infausten vaskulären Malformationen und respiratorischen Funktionsverlusten [96, 100, 121].

Die VEGF Expression steht in wesentlichem Maße unter der Kontrolle des heterodimeren HIF [113, 121, 122, 222]. Während die HIF Beta-Untereinheit konstitutionell exprimiert ist, ist die differentielle Expression der verschiedenen Alpha-Untereinheiten von wesentlicher Bedeutung für die Regulation der HIF Funktion auf Ebene der mRNA Expression [118].

In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob die zur IUGR führende maternale Hypoxie im fetalen pulmonalen Gewebe einen Einfluss auf die mRNA Expression der HIF-1 α und HIF-2 α Untereinheiten hat.

Die mRNA Expression der HIF-1 α Untereinheit wies in den Versuchsgruppen der vorliegenden Studie keinen signifikanten Unterschied auf. Die mRNA Expression der HIF-2 α Untereinheit war in der Gruppe der Feten mit hypoxie-induzierter IUGR signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe.

In-vitro und in-vivo Studien konnten zeigen, dass Hypoxie eine Induktion der HIF-1 α mRNA und Protein Expression zur Folge hat [120, 223-226]. Für HIF-2 α konnte eine mRNA Expressionsinduktion durch Hypoxie nur in in-vitro Studien gezeigt werden [227, 228], während es in-vivo ausschließlich zu einer gesteigerten Proteinmenge kam [123, 229].

Da im pulmonalen Gewebe der Feten mit hypoxie-induzierter IUGR die mRNA Expression der hypoxie-sensitiven Faktoren HIF-1 α nicht höher und die HIF-2 α mRNA Expression signifikant niedriger war als in der Gruppe der nicht retardierten Feten, stellt sich die Frage, ob tatsächlich eine fetale Hypoxie vorlag oder andere Mechanismen (z.B. seitens der Mutter) zur intrauterinen Wachstumsrestriktion führten. Einen möglichen Erklärungsansatz bietet folgende Beobachtung. Bei ständigem Aufenthalt Schwangerer in einer Höhe von über 2000m kommt es zu einer „hypoxie-induzierten IUGR“ [1, 17]. Dabei kompensieren die Schwangeren die

Hypoxie durch verschiedene Anpassungsmechanismen so, dass der arterielle Sauerstoffgehalt sich dem von Schwangeren in niedrigen Höhen angleicht [230, 231]. Allerdings findet sich bei diesen Schwangeren eine reduzierte uteroplazentare Perfusion [232]. Die uteroplazentare Perfusion steht wiederum in direktem Zusammenhang mit dem Geburtsgewicht [233]. Moore et al. folgern, dass dieser reduzierte uteroplazentare Blutfluss größeren Einfluss in der Pathogenese der hypoxie-induzierten IUGR hat als der arterielle Sauerstoffgehalt [17]. Beim Pathomechanismus werden vor allem ein erhöhter Katecholaminspiegel [234] und der gesteigerte uteroplazentare Endothelinspiegel diskutiert [235, 236]. Tierexperimentelle Untersuchungen von Thaete et al. unterstützen diese Theorie, da diese Art der hypoxie-induzierten IUGR durch die Substitution eines Endothelin-Antagonisten suffizient verhindert werden konnte [235, 237]. Einschränkend muss bei diesem Vergleich auf die hypobare Hypoxie der großen Höhen im Unterschied zu der normobaren Hypoxie im vorliegenden Versuch hingewiesen werden. Die fehlenden erhöhten Expressionen der hypoxie-sensitiven Faktoren HIF-1 α und HIF-2 α in der Gruppe mit maternaler Hypoxie lassen jedoch einen analogen Mechanismus im vorliegenden Versuch denkbar erscheinen.

Transgenetische Mäuse zeigen bei einem HIF-1 α *knock-out* letale disseminierte vaskuläre Malformationen [121], während bei einem Verlust des HIF-2 α Genprodukts durch *knock-out* die pulmonalen Folgen im Vordergrund stehen [96]. Auch quantitativ überwiegt während der pränatalen pulmonalen Entwicklung der Maus die HIF-2 α Expression [122, 124]. Die pulmonalen Folgen eines Gendefekts werden im Wesentlichen durch den Ausfall der HIF-2 α vermittelten VEGF Expressionsinduktion bestimmt [96, 122]. Die Ergebnisse dieser Studie unterstützen die beschriebenen Wechselwirkungen der beiden Faktoren, da eine enge Korrelation ($r=0,54$; $p=0,001$) der VEGF und HIF-2 α mRNA Expressionen vorlag.

In der vorliegenden Studie zeigte sich im Lungengewebe der Feten mit intrauteriner Wachstumsrestriktion eine signifikant niedrigere VEGF mRNA Expression als in der Kontrollgruppe. Studien belegen, dass aus einer reduzierten VEGF Expression eine Hemmung der pulmonal-vaskulären Reifung resultiert [82, 83, 87, 96, 226, 238]. Durch fehlende VEGF vermittelte Induktion des Surfactant – Systems kommt es weiterhin zu einer Verlangsamung oder einem Stillstand der funktionellen Lungenentwicklung [87, 96].

Compernolle et al. konnten in einem HIF-2 α *knock-out* Modell zeigen, dass die HIF2- α vermittelte VEGF Expression in den Lungen neugeborener Mäuse reduziert ist, wodurch es wiederum zu einer Expressionsreduktion der Surfactant assoziierten Proteine kam und ein letales RDS die Folge war [96]. Durch prä- und postnatale VEGF Substitution ließ sich die Letalität des RDS signifikant reduzieren und die histologische Lungenreife akzelerieren. Die Studie von Compernolle et al. belegt so die essentielle Bedeutung der HIF-2 α vermittelten VEGF Expression für die neonatale pulmonale Funktion. Daher kann die niedrigere VEGF mRNA Expression in den Lungen der intrauterin wachstumsretardierten Mäuse der vorliegenden Studie als Risikofaktor für die Entwicklung einer respiratorischen Funktionsstörung gewertet werden.

VEGF wird als ein bedeutender autokriner Stimulationsfaktor der Surfactant Protein Expression in den AEC Typ II beschrieben [87, 96]. In der Literatur wird kontrovers diskutiert, bei welchen Surfactant Proteinen eine Expressionsinduktion durch VEGF ausgelöst wird [87, 96, 239].

Bei der Betrachtung der Korrelationsanalyse der mRNA Expression von VEGF und den Surfactant assoziierten Proteinen findet sich in der vorliegenden Studie eine signifikante Korrelation der mRNA Expressionen aller vier Surfactant assoziierten Proteine mit der VEGF mRNA Expression (alle $p < 0,0001$). Somit kann aufgrund der vorliegenden Studie eine induzierende Wirkung von VEGF auf die Expression aller vier Surfactant assoziierten Proteine nicht ausgeschlossen werden.

Die VEGF Wirkung wird wesentlich durch die VEGF Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 vermittelt. VEGFR-1 liegt in löslicher und matrixassoziiierter Form vor [85]. VEGFR-1 ist im Vergleich zu VEGFR-2 nur sehr gering angioproliferativ und vermittelt im Wesentlichen eine Inhibition der VEGF Wirkung [85, 102, 240]. Der VEGFR-2 ist demgegenüber stark angio- und mitogenetisch und ist der wichtigste Träger dieser durch VEGF vermittelten Wirkungen [85]. Die mRNA Expression beider VEGF assoziierter Rezeptoren wies in dieser Studie keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontroll- und Hypoxiegruppe auf.

Boutsikou et al. beschreiben eine erhöhte Konzentration von löslichem VEGFR-1 im Nabelschnurblut intrauterin Wachstumsretardierter im Vergleich zu nicht Wachstumsretardierten und interpretieren dies als reduziertes angioproliferatives

Potential der IUGR Feten [241]. Diese Veränderung konnte auf Ebene der pulmonalen VEGFR-1 mRNA Expression der wachstumsretardierten Feten dieser Studie nicht beobachtet werden. Da jedoch die mRNA sowohl des angioproliferativen VEGFR-2 als auch des inhibitorischen VEGFR-1 in beiden Gruppen nicht unterschiedlich exprimiert war und es zu einer geringeren mRNA Expression ihres Hauptagonisten VEGF kam, ist dies in der Summe als eine Einschränkung der VEGF vermittelten Wirkungen auf Ebene der mRNA Expression zu werten.

Neben den akuten respiratorischen Folgen einer reduzierten VEGF Expression, wie von Compornolle et al. beschrieben [96], wurde eine niedrige VEGF Expression auch in Zusammenhang mit chronischen Lungenerkrankungen diskutiert. In der Pathogenese der BPD, die, wie einleitend beschrieben, eine typische Erkrankung der IUGR-Frühgeborenen ist, wird ein Stillstand der vaskulären und epithelialen Lungenentwicklung als wesentlicher Faktor erachtet [25, 76, 108, 242]. So fanden Bhatt et al. eine Reduktion von VEGF mRNA im Lungengewebe von an BPD gestorbenen Frühgeborenen [238]. Maniscalco et al. entwickelten ein Tiermodell für die BPD bei frühgeborenen Affen und belegten gleichfalls eine signifikante Reduktion der pulmonalen VEGF mRNA Expression [243].

Stehen die reduzierten pulmonalen VEGF Expressionen Frühgeborener in einem ursächlichen Zusammenhang mit der Entstehung von respiratorischen Erkrankungen, wie RDS und BPD [96, 238, 243, 244], so weisen die Ergebnisse dieser Studie auf eine zusätzliche Gefährdung von intrauterin wachstumsretardierten Frühgeborenen hin, da diese eine niedrigere pulmonale VEGF mRNA Expression als nicht retardierte Frühgeborene aufwiesen.

Diese Schlussfolgerung findet Unterstützung in den Ergebnissen epidemiologischer Untersuchungen, da die Inzidenz der beschriebenen respiratorischen Komplikationen bei wachstumsretardierten Frühgeborenen (Geburt vor der 30. Schwangerschaftswoche) gegenüber nicht wachstumsretardierten Frühgeborenen signifikant erhöht ist [5, 208].

4.2.7. Einfluss der hypoxie-induzierten Wachstumsrestriktion auf die Expression Surfactant assoziierter Proteine

Wie einleitend dargestellt ist die Produktion des Lungensurfactants ein zentraler Aspekt der biochemischen und funktionellen Lungenreife [127, 142, 143, 150]. Entscheidend für die Oberflächenspannung reduzierende Eigenschaft des Surfactants sind die Surfactantphospholipide (PL) [48, 127, 128]. Den Surfactant assoziierten Proteinen (SP) kommen essentielle Aufgaben in der Organisation der Surfactantphospholipide, der Verbesserung der biophysikalischen Surfactant Eigenschaften sowie immunologische Funktionen zu [48, 127, 128, 131-134, 137, 146, 150, 151, 245-247].

Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass die mRNA Expression der hydrophoben Surfactant assoziierten Proteine SP-B und SP-C in der Gruppe der Feten mit hypoxie-induzierter IUGR signifikant geringer war als in der Kontrollgruppe.

Die hydrophoben Surfactant assoziierten Proteine SP-B und SP-C sind wesentlich an der Erhaltung der biophysikalischen Surfactant Funktion beteiligt [150-152]. Eine Reduktion der SP-B Expression führt bei transgenetischen Mäusen zu einer Surfactantdysfunktion und respiratorischen Störungen mit Zeichen des *respiratory distress syndrome* (RDS) [248]. Der vollständige Verlust der SP-B Expression durch *knock-out* endet im Tierversuch in einem letalen RDS [249]. Ein isoliertes hereditäres SP-C Defizit verursacht keine akuten neonatalen respiratorischen Komplikationen, sondern ist mit chronischen interstitiellen Veränderungen, wie der interstitiellen Pneumonitis assoziiert [250-252]. Auf Proteinebene ist die kombinierte Reduktion von SP-B und SP-C bei Frühgeborenen (unter der 30. SSW), die eine BPD entwickeln, nachgewiesen [131, 137].

Eine niedrigere Expression der hydrophoben Surfactant assoziierten Proteine SP-B und SP-C in der Gruppe der wachstumsretardierten Mäuse der vorliegenden Studie kann somit als ein weiterer Hinweis für eine erhöhte pulmonale Vulnerabilität der wachstumsretardierten Feten gegenüber der nicht wachstumsretardierten Kontrollgruppe gewertet werden.

Entgegen den Ergebnissen dieser Studie beschreiben Gagnon et al. in einem Plazentaembolisation-Modell einen SP-A und SP-B mRNA Expressionsanstieg in den Lungen wachstumsretardierter Schafe [129, 141]. Gagnon berichtet, dass es

während der 21 Tage dauernden Plazentaembolisation zu einem Anstieg der mittleren fetalen Plasma Kortisolkonzentration in der Embolisationsgruppe um den Faktor 8,8 kam, wohingegen die nicht wachstumsretardierten Feten nur einen milden Anstieg um den Faktor 0,6 zeigten. Der Einfluss von Glucokorticoiden auf die Expression der Surfactant assoziierten Proteine kann als belegt gelten [253-255]. In der Studie von Gagnon et al. korrelierten die mRNA Expressionen von SP-A und SP-B eng mit der Plasma Kortisolkonzentration. Daher kann die erhöhte SP-A und SP-B mRNA Expression in den fetalen Schaflungen durch den erhöhten Kortisolspiegel erklärt werden. Ein erhöhter Kortisolspiegel ist jedoch nicht zwingend mit der IUGR assoziiert [256], was bei der Interpretation der von Gagnon beschriebenen Surfactant Protein mRNA Expressionen zu bedenken ist.

In der Gruppe der wachstumsretardierten Feten zeigte sich im pulmonalen Gewebe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine geringere mRNA Expression des hydrophilen Surfactant assoziierten Proteins SP-A. Die mRNA Expression des zweiten hydrophilen Surfactantproteins SP-D unterschied sich in den Gruppen nicht signifikant.

Den hydrophilen Surfactant assoziierten Proteinen SP-A und SP-D werden primär Aufgaben der angeborenen Immunität, *innate immunity*, zugeordnet [142, 143]. SP-A werden jedoch auch Funktionen in der Surfactanthomöostase zugeschrieben [96, 122, 124]. Die SP-A Expressionsreduktion bietet einen Erklärungsansatz für die reduzierte immunologische Kompetenz IUGR-Frühgeborener, auf die bei der Diskussion der Expression der Inflammationsmediatoren weiter eingegangen werden soll (siehe Kapitel 4.2.8).

Die Entwicklung des Surfactant - Systems ist, neben der Bedeutung für die respiratorische Funktion, in einer weiteren Hinsicht interessant. Der amniotische Gehalt der Surfactantphospholipide ist lange aufgrund seines proportional zur Lungenentwicklung fortschreitenden Zuwachses als geeigneter Indikator der Lungenreife anerkannt [221, 257]. Auch die SP-A und SP-B Proteinkonzentrationen in der Amnionflüssigkeit wurden aufgrund ihrer engen Korrelation zum pulmonalen Entwicklungsstand als Indikator der Lungenreife beschrieben [172, 174, 203, 258].

Da der physiologische Verlauf der mRNA Expressionen im Lungengewebe der hier betrachteten Faktoren HIF-2 α [258, 259] VEGF [260-262] SP-A, SP-B und SP-C

[254, 255, 263] einen vergleichbaren, vom Gestationsfortschritt abhängigen, Zuwachs aufweist, können diese, analog amniotischen Indikatoren der Lungenentwicklung, als Marker des pulmonalen Entwicklungsfortschritts interpretiert werden. Unter diesem Gesichtspunkt ist die reduzierte Expression der genannten Faktoren in der Gruppe der wachstumsretardierten Feten als Hinweis auf ein, im Vergleich zur Gruppe der nicht retardierten Feten, früheres Stadium der Lungenentwicklung zu werten.

4.2.8. Pulmonale mRNA Expression pro- und anti-inflammatorischer Mediatoren in der hypoxie-induzierten IUGR

Es kann als belegt gelten, dass die pränatale fetale Inflammation eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von neonatalen Erkrankungen wie der BPD spielt [24-26, 158]. In diesem Zusammenhang wird diskutiert, ob es durch eine pränatale Inflammation zu einem intrauterinen „*Priming*“ der Lunge kommt. Diese Sensibilisierung soll dazu führen, dass schon aus geringen neonatalen Inflamationsreizen eine inadäquat hohe inflammatorische Reaktion der Lunge resultiert und so eine BPD bedingt wird [158].

Die mRNA Konzentrationen der drei untersuchten Inflamationsmediatoren befanden sich an der Nachweisgrenze der real-time PCR. Die Quantifizierung der mRNA Expression der beiden pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontroll- und IUGR-Gruppe. Da die genannten Faktoren als sensible Indikatoren pränataler Inflammation anerkannt sind [157, 168], ist eine intrauterine Inflammation im fetalen Lungengewebe der IUGR-Gruppe unwahrscheinlich.

Die in der Literatur beschriebene mRNA Expressionsinduktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α durch Hypoxie [264, 265] konnte in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden. Dies kann als weiterer Hinweis für eine geringe oder fehlende fetale Hypoxie im pulmonalen Gewebe gewertet werden.

Jones et al. untersuchten die Beteiligung des anti-inflammatorischen IL-10 in der pulmonalen Inflammation in Abhängigkeit vom Gestationsalter mit dem Ergebnis, dass Frühgeborene im Gegensatz zu Reifgeborenen ein Defizit bezüglich der IL-10 Bildungsfähigkeiten aufweisen [266]. Es wird gefolgert, dass die IL-10 Produktion

vom Gestationsalter abhängig ist und dass ein Mangel an IL-10 zur chronischen pulmonalen Inflammation prädispositioniert [266], was im Folgenden durch weitere Studien Unterstützung fand [159, 267, 268]. In der vorliegenden Studie war bei drei frühgeborenen Feten der Kontrollgruppe, entsprechend der These von Jones, keine IL-10 mRNA im pulmonalen Gewebe nachweisbar. Demgegenüber war die IL-10 mRNA in der Gruppe der frühgeborenen IUGR Feten stärker exprimiert als in der Kontrollgruppe. Nach Jones würde dies für eine akzelerierte immunologische Entwicklung in den Lungen der IUGR-Feten sprechen. Dies widerspricht jedoch klinischen Beobachtungen die belegen, dass sich Frühgeborene mit Wachstumsrestriktion durch eine erhöhte Inzidenz inflammationsassoziierter Erkrankungen, wie der BPD, auszeichnen [5, 208]. Einen Erklärungsansatz bietet die Betrachtung der SP-A Expression. Bei inflammatorischen Prozessen fällt die SP-A Menge zunächst ab, steigt dann aber wieder rapide an [266]. Neben der direkten antimikrobiellen Wirkung von SP-A, ist eine inhibitorische Wirkung auf die IL-10 Expression in-vitro und in-vivo belegt [266]. Die festgestellte höhere IL-10 mRNA Expression der IUGR Gruppe kann demnach auf einer fehlenden Inhibition des geringer exprimierten SP-A beruhen.

5. Zusammenfassung

Die intrauterine Wachstumsrestriktion (IUGR) wird als ein im Vergleich zur Referenzpopulation inadäquates pränatales Wachstum verstanden. Frühgeborene mit IUGR weisen eine stark erhöhte neonatale Morbidität und Mortalität auf. Diese werden wesentlich durch akute und chronische respiratorische Erkrankungen, wie dem *respiratory distress syndrome* (RDS) und der Bronchopulmonalen Dysplasie (BPD), bestimmt. Die erhöhte pulmonale Morbidität intrauterin Wachstumsretardierter wird auf eine gestörte intrauterine Lungenentwicklung zurückgeführt.

Die Ätiologie der IUGR ist heterogen, jedoch wird bei der Mehrzahl der Fälle eine primäre oder sekundäre Plazentainsuffizienz mit konsekutiver fetaler Hypoxämie und/oder fetaler Substratmangelversorgung als entscheidender Faktor diskutiert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein Tiermodell zur experimentellen Induktion einer intrauterinen Wachstumsrestriktion für die frühgeborene Maus zu etablieren. Die intrauterine Wachstumsrestriktion wurde durch maternale Hypoxie während des letzten Drittels der Gestation induziert (F_iO_2 0,10 an Embryonaltag 14 - 17,5). An Embryonaltag 17,5 erfolgte die Entbindung der Feten durch Sectio-Caesarea (physiologische Gestationsdauer 19-21 Tage). Die Evaluation der IUGR erfolgte anhand auxiologischer Daten. Dabei konnten folgende Feststellungen getroffen werden:

Die Feten aus der Gruppe mit maternaler Hypoxie wiesen in allen betrachteten auxiologischen Merkmalen eine signifikante Wachstumsrestriktion gegenüber den Feten der Kontrollgruppe auf. Da es zu einer Umverteilung des fetalen Wachstums zu Gunsten des Kopfes kam, ist die Wachstumsrestriktion im vorliegenden Modell als asymmetrisch zu klassifizieren. Die asymmetrische Retardierung ist als Anpassungsmechanismus an die erschwerten Wachstumsbedingungen zum Vorteil essentieller Körperregionen zu deuten.

Aufgrund der Bedeutung einer beeinträchtigten intrauterinen Lungenentwicklung für die postnatale pulmonale Morbidität wurden die Lungen der wachstumsretardierten Feten und Kontrolltiere auf Ebene der histologischen pulmonalen Differenzierung verglichen. Weiterhin wurde die pulmonale mRNA Expression essentieller Gene der Lungenentwicklung und –funktion untersucht. Es wurden folgende Gene ausgewählt:

- Der Wachstumsfaktor IGF-1 sowie dessen Hauptrezeptor IGF1-R aufgrund ihrer Bedeutung für das allgemeine intrauterine Wachstum sowie ihres Einflusses auf Organogenese und Differenzierung.
- Der Wachstumsfaktor VEGF-A mit den assoziierten Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 sowie die Alpha-Untereinheiten des Transkriptionsfaktors HIF (HIF-1 α , HIF-2 α) aufgrund der essentiellen Bedeutung für die pulmonal-vaskuläre Entwicklung und die Beteiligung in der Pathogenese neonataler pulmonaler Erkrankungen wie der BPD und dem RDS.
- Die Surfactant assoziierten Proteine A-D, die von wesentlicher Bedeutung in der Aufrechterhaltung der biophysikalischen Surfactant-Funktion und lokalen Immunabwehr sind.
- Die pro- und anti-inflammatorischen Mediatoren (IL-6, IL-10, TNF- α), von denen eine Beeinflussung der Lungenentwicklung und Beteiligung in der Pathogenese chronischer Lungenerkrankungen bekannt ist.

Anhand einer vergleichenden histomorphometrischen Untersuchung der fetalen Lungen konnte kein signifikanter Unterschied der Lungendifferenzierung zwischen den IUGR und Kontrollfeten festgestellt werden. Die fetalen Lungen befanden sich zum Entnahmezeitpunkt im Übergang vom sakkulären zum kanalikulären Stadium der Lungenentwicklung, was dem Entwicklungsstand der humanen Lunge in der 24.-26. Schwangerschaftswoche entspricht.

Die mRNA Expressionsanalysen erfolgten durch real-time PCR Assays (TaqMan®-Technologie). Für die Quantifizierung der pulmonalen mRNA Expressionen wurde die $\Delta\Delta C_t$ -Methode verwendet. Diese relative Quantifizierungsmethode gleicht wesentliche Schwächen absoluter Quantifizierungsstrategien aus, ist jedoch auf die konstante Expression eines internen Referenzgens, dem Housekeeping-Gen, angewiesen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression dreier gängiger Housekeeping-Gene evaluiert. Im Ergebnis zeigte sich, dass β -Actin für das hier etablierte Modell als geeignetes Housekeeping-Gen gelten kann, wohingegen die Expression des häufig verwendeten Housekeeping-Gens 18S einen signifikanten Unterschied in den Versuchsgruppen aufwies und so als Housekeeping-Gen ungeeignet war.

Die vorliegende Studie konnte keine signifikanten Unterschiede betreffend der mRNA Expression von IGF-1 und seinem Hauptrezeptor IGF-1R im Lungengewebe der IUGR- und Kontrollgruppe nachweisen.

Die mRNA Expression der HIF Untereinheiten HIF-2 α zeigte eine signifikant niedrigere Expression in der Gruppe der IUGR Feten, wohingegen die HIF-1 α mRNA Expression nicht signifikant beeinflusst wurde. Die geringere mRNA Expression des hypoxiesensitiven HIF-2 α und die fehlende Beeinflussung der HIF-1 α mRNA Expression lassen eine Hypoxie im pulmonalen Gewebe und somit auch eine systemische fetale Hypoxie unwahrscheinlich erscheinen.

HIF-2 α hat während der pränatalen Lungenentwicklung wesentlichen Einfluss auf die Induktion der VEGF Expression. In der vorliegenden Arbeit konnte eine niedrigere pulmonale Expression der VEGF mRNA in der Gruppe der IUGR Feten bei hoher Korrelation zur HIF-2 α Expression nachgewiesen werden, während die mRNA der VEGF Rezeptoren (VEGFR-1, VEGFR-2) nicht unterschiedlich exprimiert wurde. Die geringere VEGF mRNA Expression in den Lungen der IUGR Feten kann Hinweis auf ein geringeres angiogenetisches Potential im pulmonalen Gewebe sein.

Die mRNA Expression der Surfactant assoziierten Proteine A-C war in den Lungen der wachstumsretardierten Feten niedriger als in der Kontrollgruppe, wohingegen die mRNA Expression des Surfactant assoziierten Proteins D nicht beeinflusst wurde. Die Surfactant assoziierten Proteine sind wesentlich an der Vermittlung der biophysikalischen Surfactant - Eigenschaften beteiligt. Eine niedrige SP-B und SP-C mRNA Expression ist mit der Entstehung neonataler respiratorischer Störungen assoziiert. Daher ist die geringere pulmonale mRNA Expression dieser Faktoren in der Gruppe der wachstumsretardierten Feten als prädispositionierender Faktor für respiratorische Erkrankungen zu werten. SP-A ist Teil der angeborenen pulmonalen Immunabwehr. Der niedrigeren SP-A mRNA Expression in der Gruppe der wachstumsretardierten Feten kann eine Rolle bei der beeinträchtigten lokalen Immunantwort intrauterin wachstumsretardierter Feten zukommen.

Die fehlende Beeinflussung der mRNA Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α sowie eine erhöhte Expression des anti- inflammatorischen IL-10 in der Gruppe der Wachstumsretardierten macht eine intrauterine Inflammation im vorliegenden Modell unwahrscheinlich.

Der physiologische Verlauf der mRNA Expression von HIF-2 α , VEGF und den Surfactant assoziierten Proteinen (SP-A, SP-B und SP-C) weist einen Anstieg zum Ende der Gestation auf. Die in dieser Studie festgestellte niedrigere Expression dieser Faktoren in der Gruppe der intrauterin wachstumsretardierten Feten kann als Hinweis auf eine verzögerte Lungenentwicklung gewertet werden, wie sie als

wesentlicher Faktor in der Pathogenese der BPD Frühgeborener mit IUGR diskutiert wird.

6. Summary

The intrauterine growth restriction (IUGR) is defined as inadequate intrauterine growth compared with a reference population. Preterm infants with IUGR face an increased risk for neonatal morbidity and mortality which is mainly determined by the higher prevalence of acute and chronic respiratory disorders such as respiratory distress syndrome (RDS) and bronchopulmonary dysplasia (BPD). In general, the increased pulmonary morbidity of growth restricted infants seems to be associated with a perturbed intrauterine lung development.

The aetiology of IUGR is heterogeneous, but the majority of cases is attributed to an utero-placental insufficiency leading to restriction of fetal oxygen and nutrient supply.

The aim of the present study was to establish an animal model for the experimental induction of IUGR in preterm mice. IUGR was induced by maternal hypoxia during the last third of gestation ($F_{I}O_2$ 0.10 from day 14 to 17.5 of gestation). Fetuses were delivered preterm at day 17.5 of gestation by caesarean section (term is 19-21 days). To evaluate the impact of maternal hypoxia on fetal growth variables of somatic growth were assessed.

All variables of somatic growth were found to be significantly decreased in fetuses of the hypoxic group versus controls. Head growth of the hypoxic fetuses was less affected than body growth, thus the induced growth restriction was classified as asymmetric IUGR. The redistribution of fetal growth to the advantage of essential regions like the fetal head may indicate compensatory mechanisms due to an impaired intrauterine environment.

With regard to intrauterine lung development and neonatal respiratory function we investigated lungs of IUGR and control fetuses using histomorphometric analysis of pulmonary tissue differentiation.

In addition we investigated mRNA expression of genes revealed to be essential for lung maturation and differentiation:

- the growth factor IGF-1 with its major receptor IGF-1R with regard to the impact on fetal growth and organogenesis,
- the vascular growth factor VEGF-A, associated receptors (VEGFR-1 and VEGFR-2) and the alpha-subunits of the hypoxia induced transcription factor HIF (HIF-1 α , HIF-2 α) because of their essential function in pulmonary vascular

development and involvement in pathogenesis of neonatal respiratory diseases, e.g. RDS and BPD,

- the surfactant associated proteins A-D were selected because of their major contribution in biophysical surfactant activity and pulmonary immunology,
- the pro- and anti-inflammatory cytokines (IL-6, IL-10, TNF- α) with respect to their involvement in the pathogenesis of chronic lung disease and lung maturation.

Comparative histomorphometry revealed no significant differences in lung differentiation in intrauterine growth restricted and control animals. Fetal lung maturation was assign to the terminal saccular to canalicular stage. Thus, the stage of lung development in the mouse model was similar to that in very preterm infants at 24 to 26 weeks of gestational age.

Pulmonary mRNA expression was determined using the real-time PCR technique (TaqMan®). Relative quantification was performed by using the $\Delta\Delta C_t$ method.

As the validity of the $\Delta\Delta C_t$ method depends on the constant expression of the housekeeping gene, the gene expressions of three common housekeeping genes were evaluated. It could be demonstrated that, in the experimental conditions of the present model of intrauterine growth restriction β -actin revealed to be adequate as housekeeping gene. The evaluation of the of the 18S housekeeping gene expression showed significant difference between both groups and therefore it was unsuitable for the use as housekeeping gene.

Pulmonary mRNA expression of IGF-1 and IGF-1R in IUGR fetuses was similar to that of control animals.

Messenger RNA expression of HIF-2 α was found to be significantly lower in lung tissue of IUGR fetuses compared to controls whereas HIF-1 α mRNA expression was not significantly altered. The lower mRNA expression of the hypoxia-sensitive transcription factor HIF-2 α and the missing alteration of HIF-1 α mRNA expression may be a sign of an irrelevant or absent pulmonary and consequently systemic fetal hypoxia.

HIF-2 α has been shown to be important for the intrauterine lung maturation by inducing pulmonary VEGF expression. In the present study, intrauterine growth restricted fetuses showed a lower mRNA expression of VEGF whereas mRNA expression of the VEGF associated receptors (VEGFR-1, VEGFR-2) was not

affected. The lower VEGF mRNA expression in the group of growth restricted mice may indicate a reduced angiogenetic potential in fetal lungs.

Lower mRNA expressions of surfactant associated proteins SP-A, -B and -C were also observed in the pulmonary tissue of growth restricted fetuses; however, SP-D mRNA expression was not affected. Surfactant associated proteins are known to play an essential role in mediation of biophysical surfactant activity. Reduced expressions of the hydrophobic proteins SP-B and -C are known to increase the risk for acute neonatal respiratory failure. Thus, the reduced mRNA expression of SP-B and -C in IUGR fetuses of the present study may have potential implications for postnatal pulmonary adaptation and the risk for the development of respiratory disorders in preterm neonates with IUGR.

SP-A is described to be an important factor of the innate pulmonary host defence. The reduced mRNA expression of SP-A in lungs from IUGR fetuses may play a role in the impaired pulmonary immunity of growth restricted infants.

Regarding the investigation of pro-inflammatory cytokines IL-6 und TNF- α in pulmonary tissue, no significant differences between IUGR fetuses and controls were found. Furthermore, mRNA expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10 was significantly higher in the group of fetuses with IUGR compared to control animals. These observations indicate that intrauterine inflammation does not seem to be involved in the established model of growth restriction.

During normal intrauterine development, pulmonary mRNA expression of HIF-2 α , VEGF and surfactant associated proteins (SP-A, SP-B and SP-C) raise with ongoing gestation. Thus, lower mRNA expressions of these genes in IUGR fetuses suggest a delay in lung maturation, which has been shown to be a pathogenic factor in the development of the BPD.

7. Literaturverzeichnis

1. Wollmann, H.A., *Intrauterine growth restriction: definition and etiology*. Horm Res, 1998. 49(# Suppl 2): p. 1-6.
2. Resnik, R., *Intrauterine growth restriction*. Obstet Gynecol, 2002. 99(3): p. 490-6.
3. Gagnon, R., *Placental insufficiency and its consequences*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2003. 110 Suppl 1: p. S99-107.
4. Sharma, P., et al., *Comparisons of mortality and pre-discharge respiratory outcomes in small-for-gestational-age and appropriate-for-gestational-age premature infants*. BMC Pediatr, 2004. 4(1): p. 9.
5. Reiss, I., et al., *Increased risk of bronchopulmonary dysplasia and increased mortality in very preterm infants being small for gestational age*. Arch Gynecol Obstet, 2003. 269(1): p. 40-4.
6. Regev, R.H., et al., *Excess mortality and morbidity among small-for-gestational-age premature infants: a population-based study*. J Pediatr, 2003. 143(2): p. 186-91.
7. Zeitlin, J., et al., *The relationship between intrauterine growth restriction and preterm delivery: an empirical approach using data from a European case-control study*. Bjog, 2000. 107(6): p. 750-8.
8. Lackman, F., et al., *The risks of spontaneous preterm delivery and perinatal mortality in relation to size at birth according to fetal versus neonatal growth standards*. Am J Obstet Gynecol, 2001. 184(5): p. 946-53.
9. Ott, W.J., *Intrauterine growth retardation and preterm delivery*. Am J Obstet Gynecol, 1993. 168(6 Pt 1): p. 1710-5; discussion 1715-7.
10. Gardosi, J.O., *Prematurity and fetal growth restriction*. Early Hum Dev, 2005. 81(1): p. 43-9.
11. Piper, J.M., et al., *Do growth-retarded premature infants have different rates of perinatal morbidity and mortality than appropriately grown premature infants?* Obstet Gynecol, 1996. 87(2): p. 169-74.
12. Bernstein, I.M., et al., *Morbidity and mortality among very-low-birth-weight neonates with intrauterine growth restriction. The Vermont Oxford Network*. Am J Obstet Gynecol, 2000. 182(1 Pt 1): p. 198-206.
13. Zaw, W., R. Gagnon, and O. da Silva, *The risks of adverse neonatal outcome among preterm small for gestational age infants according to neonatal versus fetal growth standards*. Pediatrics, 2003. 111(6 Pt 1): p. 1273-7.
14. Kramer, M.S., et al., *Body proportionality and head and length 'sparing' in growth-retarded neonates: a critical reappraisal*. Pediatrics, 1989. 84(4): p. 717-23.
15. Lin, C.C., S.J. Su, and L.P. River, *Comparison of associated high-risk factors and perinatal outcome between symmetric and asymmetric fetal intrauterine growth retardation*. Am J Obstet Gynecol, 1991. 164(6 Pt 1): p. 1535-41; discussion 1541-2.
16. Kramer, M.S., *Determinants of low birth weight: methodological assessment and meta-analysis*. Bull World Health Organ, 1987. 65(5): p. 663-737.
17. Moore, L.G., et al., *Maternal adaptation to high-altitude pregnancy: an experiment of nature--a review*. Placenta, 2004. 25 Suppl A: p. S60-71.

18. Garite, T.J., R. Clark, and J.A. Thorp, *Intrauterine growth restriction increases morbidity and mortality among premature neonates*. Am J Obstet Gynecol, 2004. 191(2): p. 481-7.
19. Meyberg, R., et al., *[Intrauterine growth retardation--perinatal mortality and postnatal morbidity in a perinatal center]*. Z Geburtshilfe Neonatol, 2000. 204(6): p. 218-23.
20. *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. Vol. 258. 1998, Walter de Gruyter: Berlin - New York.
21. Gortner, L., et al., *Neonatal outcome in small for gestational age infants: do they really better?* J Perinat Med, 1999. 27(6): p. 484-9.
22. Bardin, C., P. Zelkowitz, and A. Papageorgiou, *Outcome of small-for-gestational age and appropriate-for-gestational age infants born before 27 weeks of gestation*. Pediatrics, 1997. 100(2): p. E4.
23. Ley, D., et al., *Respiratory distress syndrome in infants with impaired intrauterine growth*. Acta Paediatr, 1997. 86(10): p. 1090-6.
24. Jobe, A.H. and E. Bancalari, *Bronchopulmonary dysplasia*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. 163(7): p. 1723-9.
25. Jobe, A.H. and M. Ikegami, *Mechanisms initiating lung injury in the preterm*. Early Hum Dev, 1998. 53(1): p. 81-94.
26. Bancalari, E., N. Claure, and I.R. Sosenko, *Bronchopulmonary dysplasia: changes in pathogenesis, epidemiology and definition*. Semin Neonatol, 2003. 8(1): p. 63-71.
27. Barker, D.J., *Fetal origins of coronary heart disease*. Bmj, 1995. 311(6998): p. 171-4.
28. Kwong, W.Y., et al., *Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension*. Development, 2000. 127(19): p. 4195-202.
29. Osmond, C., et al., *Early growth and death from cardiovascular disease in women*. Bmj, 1993. 307(6918): p. 1519-24.
30. Rich-Edwards, J.W., et al., *Birthweight and the risk for type 2 diabetes mellitus in adult women*. Ann Intern Med, 1999. 130(4 Pt 1): p. 278-84.
31. Forsen, T., et al., *The fetal and childhood growth of persons who develop type 2 diabetes*. Ann Intern Med, 2000. 133(3): p. 176-82.
32. Lithell, H.O., et al., *Relation of size at birth to non-insulin dependent diabetes and insulin concentrations in men aged 50-60 years*. Bmj, 1996. 312(7028): p. 406-10.
33. Frankel, S., et al., *Birthweight, body-mass index in middle age, and incident coronary heart disease*. Lancet, 1996. 348(9040): p. 1478-80.
34. Leon, D.A., et al., *Reduced fetal growth rate and increased risk of death from ischaemic heart disease: cohort study of 15 000 Swedish men and women born 1915-29*. Bmj, 1998. 317(7153): p. 241-5.
35. Barker, D.J., et al., *Relation of birth weight and childhood respiratory infection to adult lung function and death from chronic obstructive airways disease*. Bmj, 1991. 303(6804): p. 671-5.
36. Dezateux, C., et al., *Low birth weight for gestation and airway function in infancy: exploring the fetal origins hypothesis*. Thorax, 2004. 59(1): p. 60-6.
37. Hoo, A.F., et al., *Development of lung function in early life: influence of birth weight in infants of nonsmokers*. Am J Respir Crit Care Med, 2004. 170(5): p. 527-33.

38. Rona, R.J., M.C. Gulliford, and S. Chinn, *Effects of prematurity and intrauterine growth on respiratory health and lung function in childhood*. Bmj, 1993. 306(6881): p. 817-20.
39. Edwards, C.A., et al., *Relationship between birth weight and adult lung function: controlling for maternal factors*. Thorax, 2003. 58(12): p. 1061-5.
40. Cetin, I., et al., *Fetal growth restriction: a workshop report*. Placenta, 2004. 25(8-9): p. 753-7.
41. Gembruch, U. and L. Gortner, *Perinatal aspects of preterm intrauterine growth restriction*. Ultrasound Obstet Gynecol, 1998. 11(4): p. 233-9.
42. Unterman, T.G., et al., *Circulating levels of insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF-II, and IGF-binding proteins in the small for gestational age fetal rat*. Endocrinology, 1993. 132(1): p. 327-36.
43. Huizinga, C.T., et al., *Ligation of the uterine artery and early postnatal food restriction - animal models for growth retardation*. Horm Res, 2004. 62(5): p. 233-40.
44. Maritz, G.S., et al., *Fetal growth restriction has long-term effects on postnatal lung structure in sheep*. Pediatr Res, 2004. 55(2): p. 287-95.
45. Harding, R., et al., *The compromised intra-uterine environment: implications for future lung health*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2000. 27(12): p. 965-74.
46. Haugaard, C.T. and M.K. Bauer, *Rodent models of intrauterine growth restriction*. Scand. J. Lab. Anim. Sci., 2001. 28(1): p. 10-22.
47. Warburton, D., et al., *The molecular basis of lung morphogenesis*. Mech Dev, 2000. 92(1): p. 55-81.
48. Polin, R.A., W.W. Fox, and S.H. Abman, *Fetal and Neonatal Physiology*. 3 rd ed. 2003: Saunders.
49. Hou, J.W., *Developmental biology: frontiers for clinical genetics*. Acta Paediatr Taiwan, 1999. 40(6): p. 367-8.
50. Han, R.N. and D.J. Stewart, *Defective lung vascular development in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice*. Trends Cardiovasc Med, 2006. 16(1): p. 29-34.
51. Cardoso, W.V., *Lung morphogenesis revisited: old facts, current ideas*. Dev Dyn, 2000. 219(2): p. 121-30.
52. Cardoso, W.V., *Molecular regulation of lung development*. Annu Rev Physiol, 2001. 63: p. 471-94.
53. Rinderknecht, E. and R.E. Humbel, *The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin*. J Biol Chem, 1978. 253(8): p. 2769-76.
54. Jones, J.I. and D.R. Clemmons, *Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions*. Endocr Rev, 1995. 16(1): p. 3-34.
55. Dupont, J. and M. Holzenberger, *Biology of insulin-like growth factors in development*. Birth Defects Res C Embryo Today, 2003. 69(4): p. 257-71.
56. Randhawa, R. and P. Cohen, *The role of the insulin-like growth factor system in prenatal growth*. Mol Genet Metab, 2005. 86(1-2): p. 84-90.
57. Baker, J., et al., *Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth*. Cell, 1993. 75(1): p. 73-82.
58. Liu, J.P., et al., *Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r)*. Cell, 1993. 75(1): p. 59-72.
59. Woods, K.A., et al., *Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene*. N Engl J Med, 1996. 335(18): p. 1363-7.

60. Bonapace, G., et al., *A novel mutation in a patient with insulin-like growth factor 1 (IGF1) deficiency*. J Med Genet, 2003. 40(12): p. 913-7.
61. Lo, H.C., et al., *Relation of cord serum levels of growth hormone, insulin-like growth factors, insulin-like growth factor binding proteins, leptin, and interleukin-6 with birth weight, birth length, and head circumference in term and preterm neonates*. Nutrition, 2002. 18(7-8): p. 604-8.
62. Vatten, L.J., et al., *Insulin-like growth factor I and leptin in umbilical cord plasma and infant birth size at term*. Pediatrics, 2002. 109(6): p. 1131-5.
63. Giudice, L.C., et al., *Insulin-like growth factors and their binding proteins in the term and preterm human fetus and neonate with normal and extremes of intrauterine growth*. J Clin Endocrinol Metab, 1995. 80(5): p. 1548-55.
64. Verhaeghe, J., et al., *C-peptide, insulin-like growth factors I and II, and insulin-like growth factor binding protein-1 in umbilical cord serum: correlations with birth weight*. Am J Obstet Gynecol, 1993. 169(1): p. 89-97.
65. Miles, H.L., P.L. Hofman, and W.S. Cutfield, *Fetal origins of adult disease: a paediatric perspective*. Rev Endocr Metab Disord, 2005. 6(4): p. 261-8.
66. Jensen, R.B., et al., *Intrauterine growth retardation and consequences for endocrine and cardiovascular diseases in adult life: does insulin-like growth factor-I play a role?* Horm Res, 2003. 60 Suppl 3: p. 136-48.
67. Juul, A., et al., *Low serum insulin-like growth factor I is associated with increased risk of ischemic heart disease: a population-based case-control study*. Circulation, 2002. 106(8): p. 939-44.
68. Laughlin, G.A., et al., *The prospective association of serum insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein-1 levels with all cause and cardiovascular disease mortality in older adults: the Rancho Bernardo Study*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. 89(1): p. 114-20.
69. Clemmons, D.R., *Role of insulin-like growth factor binding proteins in controlling IGF actions*. Mol Cell Endocrinol, 1998. 140(1-2): p. 19-24.
70. Monzavi, R. and P. Cohen, *IGFs and IGFBPs: role in health and disease*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2002. 16(3): p. 433-47.
71. Adams, T.E., et al., *Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor*. Cell Mol Life Sci, 2000. 57(7): p. 1050-93.
72. LeRoith, D., et al., *Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor*. Endocr Rev, 1995. 16(2): p. 143-63.
73. Abuzzahab, M.J., et al., *IGF-I receptor mutations resulting in intrauterine and postnatal growth retardation*. N Engl J Med, 2003. 349(23): p. 2211-22.
74. Lallemand, A.V., et al., *In vivo localization of the insulin-like growth factors I and II (IGF I and IGF II) gene expression during human lung development*. Int J Dev Biol, 1995. 39(3): p. 529-37.
75. Han, R.N., et al., *Insulin-like growth factor-I receptor-mediated vasculogenesis/angiogenesis in human lung development*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2003. 28(2): p. 159-69.
76. Jankov, R.P. and A. Keith Tanswell, *Growth factors, postnatal lung growth and bronchopulmonary dysplasia*. Paediatr Respir Rev, 2004. 5 Suppl A: p. S265-75.
77. Chetty, A., et al., *Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and IGF-1 receptor (IGF-1R) expression in human lung in RDS and BPD*. Pediatr Pulmonol, 2004. 37(2): p. 128-36.
78. Perl, A.K. and J.A. Whitsett, *Molecular mechanisms controlling lung morphogenesis*. Clin Genet, 1999. 56(1): p. 14-27.

79. Minoo, P., *Transcriptional regulation of lung development: emergence of specificity*. Respir Res, 2000. 1(2): p. 109-15.
80. Hislop, A.A., *Airway and blood vessel interaction during lung development*. J Anat, 2002. 201(4): p. 325-34.
81. Healy, A.M., et al., *VEGF is deposited in the subepithelial matrix at the leading edge of branching airways and stimulates neovascularization in the murine embryonic lung*. Dev Dyn, 2000. 219(3): p. 341-52.
82. Le Cras, T.D., et al., *Treatment of newborn rats with a VEGF receptor inhibitor causes pulmonary hypertension and abnormal lung structure*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. 283(3): p. L555-62.
83. Maniscalco, W.M., et al., *Angiogenic factors and alveolar vasculature: development and alterations by injury in very premature baboons*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. 282(4): p. L811-23.
84. Jakkula, M., et al., *Inhibition of angiogenesis decreases alveolarization in the developing rat lung*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. 279(3): p. L600-7.
85. Ferrara, N., H.P. Gerber, and J. LeCouter, *The biology of VEGF and its receptors*. Nat Med, 2003. 9(6): p. 669-76.
86. Neufeld, G., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors*. Faseb J, 1999. 13(1): p. 9-22.
87. Brown, K.R., et al., *VEGF induces airway epithelial cell proliferation in human fetal lung in vitro*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001. 281(4): p. L1001-10.
88. Ferrara, N. and T. Davis-Smyth, *The biology of vascular endothelial growth factor*. Endocr Rev, 1997. 18(1): p. 4-25.
89. Mattei, M.G., et al., *Assignment of vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PLGF) genes to human chromosome 6p12-p21 and 14q24-q31 regions, respectively*. Genomics, 1996. 32(1): p. 168-9.
90. Ferrara, N. and W.J. Henzel, *Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1989. 161(2): p. 851-8.
91. Houck, K.A., et al., *Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms*. J Biol Chem, 1992. 267(36): p. 26031-7.
92. Karkkainen, M.J., T. Makinen, and K. Alitalo, *Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research*. Nat Cell Biol, 2002. 4(1): p. E2-5.
93. Gerber, H.P., et al., *Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation*. J Biol Chem, 1998. 273(46): p. 30336-43.
94. Gerber, H.P., et al., *VEGF is required for growth and survival in neonatal mice*. Development, 1999. 126(6): p. 1149-59.
95. Matsumoto, T. and L. Claesson-Welsh, *VEGF receptor signal transduction*. Sci STKE, 2001. 2001(112): p. RE21.
96. Compennolle, V., et al., *Loss of HIF-2alpha and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice*. Nat Med, 2002. 8(7): p. 702-10.
97. Hattori, K., et al., *Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells*. J Exp Med, 2001. 193(9): p. 1005-14.

98. Hicklin, D.J. and L.M. Ellis, *Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis*. J Clin Oncol, 2005. 23(5): p. 1011-27.
99. Clauss, M., et al., *Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration*. J Exp Med, 1990. 172(6): p. 1535-45.
100. Carmeliet, P., et al., *Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele*. Nature, 1996. 380(6573): p. 435-9.
101. Kendall, R.L., G. Wang, and K.A. Thomas, *Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. 226(2): p. 324-8.
102. Kearney, J.B., et al., *Vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 negatively regulates developmental blood vessel formation by modulating endothelial cell division*. Blood, 2002. 99(7): p. 2397-407.
103. Park, J.E., et al., *Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR*. J Biol Chem, 1994. 269(41): p. 25646-54.
104. Yang, S., et al., *Vascular endothelial growth factor-induced genes in human umbilical vein endothelial cells: relative roles of KDR and Flt-1 receptors*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. 22(11): p. 1797-803.
105. Fong, G.H., et al., *Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium*. Nature, 1995. 376(6535): p. 66-70.
106. Gille, H., et al., *Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants*. J Biol Chem, 2001. 276(5): p. 3222-30.
107. Waltenberger, J., et al., *Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor*. J Biol Chem, 1994. 269(43): p. 26988-95.
108. Stenmark, K.R. and S.H. Abman, *Lung vascular development: implications for the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia*. Annu Rev Physiol, 2005. 67: p. 623-61.
109. Semenza, G., *Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1*. Biochem Pharmacol, 2002. 64(5-6): p. 993-8.
110. Wang, G.L. and G.L. Semenza, *Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1*. J Biol Chem, 1995. 270(3): p. 1230-7.
111. Semenza, G.L., *Involvement of hypoxia-inducible factor 1 in pulmonary pathophysiology*. Chest, 2005. 128(6 Suppl): p. 592S-594S.
112. Levy, A.P., et al., *Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia*. J Biol Chem, 1995. 270(22): p. 13333-40.
113. Liu, Y., et al., *Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer*. Circ Res, 1995. 77(3): p. 638-43.
114. Dor, Y., R. Porat, and E. Keshet, *Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis*. Am J Physiol Cell Physiol, 2001. 280(6): p. C1367-74.
115. Semenza, G.L. and G.L. Wang, *A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation*. Mol Cell Biol, 1992. 12(12): p. 5447-54.

116. Gu, Y.Z., J.B. Hogenesch, and C.A. Bradfield, *The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2000. 40: p. 519-61.
117. Camenisch, G., et al., *Attenuation of HIF-1 DNA-binding activity limits hypoxia-inducible endothelin-1 expression*. Pflugers Arch, 2001. 443(2): p. 240-9.
118. Wenger, R.H., *Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression*. Faseb J, 2002. 16(10): p. 1151-62.
119. Kallio, P.J., et al., *Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway*. J Biol Chem, 1999. 274(10): p. 6519-25.
120. Yu, A.Y., et al., *Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung*. Am J Physiol, 1998. 275(4 Pt 1): p. L818-26.
121. Iyer, N.V., et al., *Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha*. Genes Dev, 1998. 12(2): p. 149-62.
122. Ema, M., et al., *A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(9): p. 4273-8.
123. Heidbreder, M., et al., *Hypoxia rapidly activates HIF-3alpha mRNA expression*. Faseb J, 2003. 17(11): p. 1541-3.
124. Jain, S., et al., *Expression of ARNT, ARNT2, HIF1 alpha, HIF2 alpha and Ah receptor mRNAs in the developing mouse*. Mech Dev, 1998. 73(1): p. 117-23.
125. Pattle, R.E., *Properties, function and origin of the alveolar lining layer*. Nature, 1955. 175(4469): p. 1125-6.
126. Clements, J.A., E.S. Brown, and R.P. Johnson, *Pulmonary surface tension and the mucus lining of the lungs: some theoretical considerations*. J Appl Physiol, 1958. 12(2): p. 262-8.
127. Goerke, J., *Pulmonary surfactant: functions and molecular composition*. Biochim Biophys Acta, 1998. 1408(2-3): p. 79-89.
128. Rieger, C., et al., *Pädiatrische Pneumologie*. 2. ed, ed. M. Zach. 2004.
129. Johansson, J. and T. Curstedt, *Molecular structures and interactions of pulmonary surfactant components*. Eur J Biochem, 1997. 244(3): p. 675-93.
130. White, R.T., et al., *Isolation and characterization of the human pulmonary surfactant apoprotein gene*. Nature, 1985. 317(6035): p. 361-3.
131. McCormack, F.X. and J.A. Whitsett, *The pulmonary collectins, SP-A and SP-D, orchestrate innate immunity in the lung*. J Clin Invest, 2002. 109(6): p. 707-12.
132. Reid, K.B., *Functional roles of the lung surfactant proteins SP-A and SP-D in innate immunity*. Immunobiology, 1998. 199(2): p. 200-7.
133. van Iwaarden, J.F., et al., *Surfactant protein A is opsonin in phagocytosis of herpes simplex virus type 1 by rat alveolar macrophages*. Am J Physiol, 1991. 261(2 Pt 1): p. L204-9.
134. Takahashi, H., et al., *Pulmonary surfactant proteins A and D: innate immune functions and biomarkers for lung diseases*. Curr Pharm Des, 2006. 12(5): p. 589-598.
135. Hickman-Davis, J.M., et al., *Killing of Klebsiella pneumoniae by human alveolar macrophages*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. 282(5): p. L944-56.

136. Crouch, E. and J.R. Wright, *Surfactant proteins a and d and pulmonary host defense*. Annu Rev Physiol, 2001. 63: p. 521-54.
137. Lawson, P.R. and K.B. Reid, *The roles of surfactant proteins A and D in innate immunity*. Immunol Rev, 2000. 173: p. 66-78.
138. Ikegami, M., et al., *The collagen-like region of surfactant protein A (SP-A) is required for correction of surfactant structural and functional defects in the SP-A null mouse*. J Biol Chem, 2001. 276(42): p. 38542-8.
139. Korfhagen, T.R., et al., *Altered surfactant function and structure in SP-A gene targeted mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(18): p. 9594-9.
140. Kishore, U., et al., *Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors*. Mol Immunol, 2006. 43(9): p. 1293-315.
141. Ikegami, M. and A.H. Jobe, *Surfactant protein metabolism in vivo*. Biochim Biophys Acta, 1998. 1408(2-3): p. 218-25.
142. Maturana, A., et al., *Amniotic fluid Clara cell protein concentration in normal pregnancy, a marker of fetal airway growth or fetal lung maturation?* J Perinatol, 2001. 21(8): p. 516-20.
143. Pryhuber, G.S., et al., *Ontogeny of surfactant proteins A and B in human amniotic fluid as indices of fetal lung maturity*. Pediatr Res, 1991. 30(6): p. 597-605.
144. Madsen, J., et al., *Localization of lung surfactant protein D on mucosal surfaces in human tissues*. J Immunol, 2000. 164(11): p. 5866-70.
145. Akiyama, J., et al., *Tissue distribution of surfactant proteins A and D in the mouse*. J Histochem Cytochem, 2002. 50(7): p. 993-6.
146. LeVine, A.M., et al., *Surfactant protein-d enhances phagocytosis and pulmonary clearance of respiratory syncytial virus*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004. 31(2): p. 193-9.
147. Botas, C., et al., *Altered surfactant homeostasis and alveolar type II cell morphology in mice lacking surfactant protein D*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(20): p. 11869-74.
148. Suzuki, Y., Y. Fujita, and K. Kogishi, *Reconstitution of tubular myelin from synthetic lipids and proteins associated with pig pulmonary surfactant*. Am Rev Respir Dis, 1989. 140(1): p. 75-81.
149. Whitsett, J.A. and T.E. Weaver, *Hydrophobic surfactant proteins in lung function and disease*. N Engl J Med, 2002. 347(26): p. 2141-8.
150. Nogee, L.M., *Surfactant protein-B deficiency*. Chest, 1997. 111(6 Suppl): p. 129S-135S.
151. Nogee, L.M., *Alterations in SP-B and SP-C expression in neonatal lung disease*. Annu Rev Physiol, 2004. 66: p. 601-23.
152. Possmayer, F., et al., *Surface activity in vitro: role of surfactant proteins*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2001. 129(1): p. 209-20.
153. Glasser, S.W., et al., *Pneumonitis and emphysema in sp-C gene targeted mice*. J Biol Chem, 2003. 278(16): p. 14291-8.
154. Thomas, A.Q., et al., *Heterozygosity for a surfactant protein C gene mutation associated with usual interstitial pneumonitis and cellular nonspecific interstitial pneumonitis in one kindred*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. 165(9): p. 1322-8.
155. Klein, L.L. and R.S. Gibbs, *Infection and preterm birth*. Obstet Gynecol Clin North Am, 2005. 32(3): p. 397-410.
156. Kuroki, Y., et al., *Surfactant proteins A and D: disease markers*. Biochim Biophys Acta, 1998. 1408(2-3): p. 334-45.

157. De Dooy, J.J., L.M. Mahieu, and H.P. Van Bever, *The role of inflammation in the development of chronic lung disease in neonates*. Eur J Pediatr, 2001. 160(8): p. 457-63.
158. Jones, C.A., et al., *Undetectable interleukin (IL)-10 and persistent IL-8 expression early in hyaline membrane disease: a possible developmental basis for the predisposition to chronic lung inflammation in preterm newborns*. Pediatr Res, 1996. 39(6): p. 966-75.
159. Blahnik, M.J., et al., *Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha and IL-10 production by lung macrophages from preterm and term neonates*. Pediatr Res, 2001. 50(6): p. 726-31.
160. Willet, K.E., et al., *Antenatal endotoxin and glucocorticoid effects on lung morphometry in preterm lambs*. Pediatr Res, 2000. 48(6): p. 782-8.
161. Ersch, J., et al., *The pulmonary paradox in premature infants: in-utero infected lungs do better than those with accelerated maturation*. J Perinat Med, 2004. 32(1): p. 84-9.
162. Fiorentino, D.F., M.W. Bond, and T.R. Mosmann, *Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones*. J Exp Med, 1989. 170(6): p. 2081-95.
163. Kim, J.M., et al., *Structure of the mouse IL-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes*. J Immunol, 1992. 148(11): p. 3618-23.
164. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor*. Annu Rev Immunol, 2001. 19: p. 683-765.
165. Steinke, J.W. and L. Borish, 3. *Cytokines and chemokines*. J Allergy Clin Immunol, 2006. 117(2 Suppl Mini-Primer): p. S441-5.
166. de Waal Malefyt, R., et al., *Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression*. J Exp Med, 1991. 174(4): p. 915-24.
167. An, H., et al., *Interleukin-6, interleukin-8, and soluble tumor necrosis factor receptor-I in the cord blood as predictors of chronic lung disease in premature infants*. Am J Obstet Gynecol, 2004. 191(5): p. 1649-54.
168. Song, M. and J.A. Kellum, *Interleukin-6*. Crit Care Med, 2005. 33(12 Suppl): p. S463-5.
169. Gomez, C.R., et al., *Aberrant Acute-Phase Response in Aged Interleukin-6 Knockout Mice*. Shock, 2006. 25(6): p. 581-585.
170. Cecilian, F., A. Giordano, and V. Spagnolo, *The systemic reaction during inflammation: the acute-phase proteins*. Protein Pept Lett, 2002. 9(3): p. 211-23.
171. Janeway, C.A., et al., *Immunobiology*. 5th ed. 2001, New York and London: Garland Publishing.
172. Yoon, B.H., et al., *A systemic fetal inflammatory response and the development of bronchopulmonary dysplasia*. Am J Obstet Gynecol, 1999. 181(4): p. 773-9.
173. Kotecha, S., et al., *Increase in interleukin (IL)-1 beta and IL-6 in bronchoalveolar lavage fluid obtained from infants with chronic lung disease of prematurity*. Pediatr Res, 1996. 40(2): p. 250-6.
174. Schultz, C., et al., *Enhanced interleukin-6 and interleukin-8 synthesis in term and preterm infants*. Pediatr Res, 2002. 51(3): p. 317-22.
175. Jobe, A.H. and M. Ikegami, *Antenatal infection/inflammation and postnatal lung maturation and injury*. Respir Res, 2001. 2(1): p. 27-32.

176. Zipp, F., et al., *Genetic control of multiple sclerosis: increased production of lymphotoxin and tumor necrosis factor-alpha by HLA-DR2+ T cells*. Ann Neurol, 1995. 38(5): p. 723-30.
177. Takahashi, J.L., et al., *Interleukin-1beta promotes oligodendrocyte death through glutamate excitotoxicity*. Ann Neurol, 2003. 53(5): p. 588-95.
178. Bonifati, C. and F. Ameglio, *Cytokines in psoriasis*. Int J Dermatol, 1999. 38(4): p. 241-51.
179. Ruuls, S.R. and J.D. Sedgwick, *Unlinking tumor necrosis factor biology from the major histocompatibility complex: lessons from human genetics and animal models*. Am J Hum Genet, 1999. 65(2): p. 294-301.
180. Vayrynen, O., V. Glumoff, and M. Hallman, *Regulation of surfactant proteins by LPS and proinflammatory cytokines in fetal and newborn lung*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. 282(4): p. L803-10.
181. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*, in Anal Biochem. 1987. p. 156-9.
182. Kotewicz, M.L., et al., *Isolation of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase lacking ribonuclease H activity*. Nucleic Acids Res, 1988. 16(1): p. 265-77.
183. Sykes, P.J., et al., *Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution*. Biotechniques, 1992. 13(3): p. 444-9.
184. Zimmermann, K. and J.W. Mannhalter, *Technical aspects of quantitative competitive PCR*. Biotechniques, 1996. 21(2): p. 268-72, 274-9.
185. Holland, P.M., et al., *Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(16): p. 7276-80.
186. Förster, T., *Intermolecular energy migration and fluorescence*. Anal. Phys., 1948. 6: p. 55-75.
187. Longo, M.C., M.S. Berninger, and J.L. Hartley, *Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions*. Gene, 1990. 93(1): p. 125-8.
188. Rawer, D., *Real-Time PCR: Optimierung und Evaluation, Etablierung von Housekeeping-Genen und die Expressionsanalyse bei Fallotscher Tetralogie*. 2005.
189. Wilda, M., et al., *Inactivation of the ARF-MDM-2-p53 pathway in sporadic Burkitt's lymphoma in children*. Leukemia, 2004. 18(3): p. 584-8.
190. Schwartz, J.E., et al., *Brief, intermittent hypoxia restricts fetal growth in Sprague-Dawley rats*. Biol Neonate, 1998. 73(5): p. 313-9.
191. Palmisano, L., et al., *Residual viraemia in subjects with chronic HIV infection and viral load < 50 copies/ml: the impact of highly active antiretroviral therapy*. Aids, 2005. 19(16): p. 1843-7.
192. Domiati-Saad, R. and R.H. Scheuermann, *Nucleic acid testing for viral burden and viral genotyping*. Clin Chim Acta, 2006. 363(1-2): p. 197-205.
193. Leutenegger, C.M., et al., *Real-time TaqMan PCR as a specific and more sensitive alternative to the branched-chain DNA assay for quantitation of simian immunodeficiency virus RNA*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2001. 17(3): p. 243-51.
194. Schmittgen, T.D. and B.A. Zakrajsek, *Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR*. J Biochem Biophys Methods, 2000. 46(1-2): p. 69-81.

195. Foss, D.L., M.J. Baarsch, and M.P. Murtaugh, *Regulation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin mRNA expression in porcine immune cells and tissues*. Anim Biotechnol, 1998. 9(1): p. 67-78.
196. Bustin, S.A., *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*. J Mol Endocrinol, 2000. 25(2): p. 169-93.
197. Mackay, I.M., *Real-time PCR in the microbiology laboratory*. Clin Microbiol Infect, 2004. 10(3): p. 190-212.
198. Spinillo, A., et al., *Maternal high-risk factors and severity of growth deficit in small for gestational age infants*. Early Hum Dev, 1994. 38(1): p. 35-43.
199. Singla, P.N., et al., *Fetal growth in maternal anaemia*. J Trop Pediatr, 1997. 43(2): p. 89-92.
200. Hartinger, S., et al., *Birth weight at high altitudes in Peru*. Int J Gynaecol Obstet, 2006.
201. Lopez Camelo, J.S., et al., *Effect of the interaction between high altitude and socioeconomic factors on birth weight in a large sample from South America*. Am J Phys Anthropol, 2006. 129(2): p. 305-10.
202. Bradbury, J., *Could treatment of neonatal RDS improve further?* Lancet, 2002. 360(9330): p. 394.
203. Yoon, B.H., et al., *Amniotic fluid cytokines (interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8) and the risk for the development of bronchopulmonary dysplasia*. Am J Obstet Gynecol, 1997. 177(4): p. 825-30.
204. Williams, S.J., et al., *Effects of maternal hypoxia or nutrient restriction during pregnancy on endothelial function in adult male rat offspring*. J Physiol, 2005. 565(Pt 1): p. 125-35.
205. Ruijtenbeek, K., et al., *Chronic moderate hypoxia and protein malnutrition both induce growth retardation, but have distinct effects on arterial endothelium-dependent reactivity in the chicken embryo*. Pediatr Res, 2003. 53(4): p. 573-9.
206. Bartels, D.B., et al., *Population based study on the outcome of small for gestational age newborns*. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2005. 90(1): p. F53-9.
207. Maritz, G.S., et al., *Effects of fetal growth restriction on lung development before and after birth: a morphometric analysis*. Pediatr Pulmonol, 2001. 32(3): p. 201-10.
208. Harding, R., et al., *Effects of intra-uterine growth restriction on the control of breathing and lung development after birth*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2000. 27(1-2): p. 114-9.
209. Larson, J.E. and W.M. Thurlbeck, *The effect of experimental maternal hypoxia on fetal lung growth*. Pediatr Res, 1988. 24(2): p. 156-9.
210. Berg, J.M., et al., *Biochemistry*. 5th ed. 2002, New York.
211. Allan, G.J., D.J. Flint, and K. Patel, *Insulin-like growth factor axis during embryonic development*. Reproduction, 2001. 122(1): p. 31-9.
212. Lee, C.I., et al., *IGF-II and IGF binding protein (IGFBP-1, IGFBP-3) gene expression in fetal rhesus monkey tissues during the second and third trimesters*. Pediatr Res, 2001. 49(3): p. 379-87.
213. Batchelor, D.C., et al., *Developmental changes in the expression patterns of IGFs, type 1 IGF receptor and IGF-binding proteins-2 and -4 in perinatal rat lung*. J Mol Endocrinol, 1995. 15(2): p. 105-15.

214. Yang, S.W. and J.S. Yu, *Relationship of insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor binding protein-3, insulin, growth hormone in cord blood and maternal factors with birth height and birthweight*. *Pediatr Int*, 2000. 42(1): p. 31-6.
215. Lassarre, C., et al., *Serum insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in the human fetus. Relationships with growth in normal subjects and in subjects with intrauterine growth retardation*. *Pediatr Res*, 1991. 29(3): p. 219-25.
216. Price, W.A., et al., *Gene expression of insulin-like growth factors (IGFs), the type 1 IGF receptor, and IGF-binding proteins in dexamethasone-induced fetal growth retardation*. *Endocrinology*, 1992. 130(3): p. 1424-32.
217. Lee, P.D., et al., *Insulin-like growth factor binding protein-1: recent findings and new directions*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1997. 216(3): p. 319-57.
218. van Kleffens, M., et al., *The IGF system during fetal-placental development of the mouse*. *Mol Cell Endocrinol*, 1998. 140(1-2): p. 129-35.
219. Schuller, A.G., et al., *IGF, type I IGF receptor and IGF-binding protein mRNA expression in the developing mouse lung*. *J Mol Endocrinol*, 1995. 14(3): p. 349-55.
220. Maeda, S., et al., *Analysis of intrapulmonary vessels and epithelial-endothelial interactions in the human developing lung*. *Lab Invest*, 2002. 82(3): p. 293-301.
221. Ng, Y.S., et al., *Differential expression of VEGF isoforms in mouse during development and in the adult*. *Dev Dyn*, 2001. 220(2): p. 112-21.
222. Gerber, H.P., et al., *Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia*. *J Biol Chem*, 1997. 272(38): p. 23659-67.
223. Wiener, C.M., G. Booth, and G.L. Semenza, *In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. 225(2): p. 485-8.
224. Catron, T., et al., *Hypoxia regulates avian cardiac Arnt and HIF-1alpha mRNA expression*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. 282(2): p. 602-7.
225. Wang, G.L., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(12): p. 5510-4.
226. Lu, M.J., et al., *Temporal and spatial expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and vascular endothelial growth factor in a rat model of myocardial ischemia with or without reperfusion*. *J Formos Med Assoc*, 2005. 104(10): p. 707-14.
227. Sato, M., et al., *Inducible expression of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia in human lung adenocarcinoma A549 cells. Role of Src family kinases-dependent pathway*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002. 26(1): p. 127-34.
228. Uchida, T., et al., *Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1alpha*. *J Biol Chem*, 2004. 279(15): p. 14871-8.
229. Wiesener, M.S., et al., *Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha*. *Blood*, 1998. 92(7): p. 2260-8.

230. Moore, L.G., et al., *Maternal hyperventilation helps preserve arterial oxygenation during high-altitude pregnancy*. J Appl Physiol, 1982. 52(3): p. 690-4.
231. McAuliffe, F., et al., *Blood gases in pregnancy at sea level and at high altitude*. Bjog, 2001. 108(9): p. 980-5.
232. Krampfl, E.R., et al., *Maternal uterine artery Doppler studies at high altitude and sea level*. Ultrasound Obstet Gynecol, 2001. 18(6): p. 578-82.
233. Lang, U., et al., *Uterine blood flow--a determinant of fetal growth*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2003. 110 Suppl 1: p. S55-61.
234. Mazzeo, R.S., et al., *Catecholamine response during 12 days of high-altitude exposure (4, 300 m) in women*. J Appl Physiol, 1998. 84(4): p. 1151-7.
235. Thaete, L.G., E.R. Dewey, and M.G. Neerhof, *Endothelin and the regulation of uterine and placental perfusion in hypoxia-induced fetal growth restriction*. J Soc Gynecol Investig, 2004. 11(1): p. 16-21.
236. Morganti, A., et al., *Effects of exposure to high altitude on plasma endothelin-1 levels in normal subjects*. J Hypertens, 1995. 13(8): p. 859-65.
237. Thaete, L.G., M.G. Neerhof, and M.S. Caplan, *Endothelin receptor A antagonism prevents hypoxia-induced intrauterine growth restriction in the rat*. Am J Obstet Gynecol, 1997. 176(1 Pt 1): p. 73-6.
238. Bhatt, A.J., et al., *Disrupted pulmonary vasculature and decreased vascular endothelial growth factor, Flt-1, and TIE-2 in human infants dying with bronchopulmonary dysplasia*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. 164(10 Pt 1): p. 1971-80.
239. Raoul, W., et al., *Effects of vascular endothelial growth factor on isolated fetal alveolar type II cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004. 286(6): p. L1293-301.
240. Carmeliet, P., et al., *Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions*. Nat Med, 2001. 7(5): p. 575-83.
241. Boutsikou, T., et al., *Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in intrauterine growth restricted fetuses and neonates*. Early Hum Dev, 2005.
242. Margraf, L.R., et al., *Morphometric analysis of the lung in bronchopulmonary dysplasia*. Am Rev Respir Dis, 1991. 143(2): p. 391-400.
243. Maniscalco, W.M., et al., *Hyperoxic ventilated premature baboons have increased p53, oxidant DNA damage and decreased VEGF expression*. Pediatr Res, 2005. 58(3): p. 549-56.
244. Lassus, P., et al., *Pulmonary vascular endothelial growth factor and Flt-1 in fetuses, in acute and chronic lung disease, and in persistent pulmonary hypertension of the newborn*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. 164(10 Pt 1): p. 1981-7.
245. Nesselin, L.L., et al., *Partial Sp-B Deficiency Perturbs Lung Function and Causes Airspace Abnormalities*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005.
246. Melton, K.R., et al., *SP-B deficiency causes respiratory failure in adult mice*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003. 285(3): p. L543-9.
247. Glasser, S.W., et al., *Altered stability of pulmonary surfactant in SP-C-deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(11): p. 6366-71.
248. Merrill, J.D., et al., *Dysfunction of pulmonary surfactant in chronically ventilated premature infants*. Pediatr Res, 2004. 56(6): p. 918-26.
249. Gagnon, R., et al., *Changes in surfactant-associated protein mRNA profile in growth-restricted fetal sheep*. Am J Physiol, 1999. 276(3 Pt 1): p. L459-65.

-
250. Strinic, T., et al., *Comparison of fetal plasma cortisol level between eutrophic and hypotrophic newborns*. Coll Antropol, 2005. 29(2): p. 739-41.
 251. Fattal-Valevski, A., et al., *Endocrine profile of children with intrauterine growth retardation*. J Pediatr Endocrinol Metab, 2005. 18(7): p. 671-6.
 252. Louey, S., et al., *Placental insufficiency and fetal growth restriction lead to postnatal hypotension and altered postnatal growth in sheep*. Pediatr Res, 2000. 48(6): p. 808-14.
 253. Garbrecht, M.R., et al., *Glucocorticoid metabolism in the human fetal lung: implications for lung development and the pulmonary surfactant system*. Biol Neonate, 2006. 89(2): p. 109-19.
 254. Tan, R.C., et al., *Developmental and glucocorticoid regulation of surfactant protein mRNAs in preterm lambs*. Am J Physiol, 1999. 277(6 Pt 1): p. L1142-8.
 255. Beers, M.F., et al., *Surfactant protein B in human fetal lung: developmental and glucocorticoid regulation*. Pediatr Res, 1995. 38(5): p. 668-75.
 256. Hallman, M., V. Glumoff, and M. Ramet, *Surfactant in respiratory distress syndrome and lung injury*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2001. 129(1): p. 287-94.
 257. Bhatt, A.J., et al., *Expression of vascular endothelial growth factor and Flk-1 in developing and glucocorticoid-treated mouse lung*. Pediatr Res, 2000. 47(5): p. 606-13.
 258. Speer, C.P., *New insights into the pathogenesis of pulmonary inflammation in preterm infants*. Biol Neonate, 2001. 79(3-4): p. 205-9.
 259. Speer, C.P., *Pre- and postnatal inflammatory mechanisms in chronic lung disease of preterm infants*. Paediatr Respir Rev, 2004. 5 Suppl A: p. S241-4.
 260. Klausen, T., et al., *Hypoxemia increases serum interleukin-6 in humans*. Eur J Appl Physiol Occup Physiol, 1997. 76(5): p. 480-2.
 261. Ertel, W., et al., *Hypoxemia in the absence of blood loss or significant hypotension causes inflammatory cytokine release*. Am J Physiol, 1995. 269(1 Pt 2): p. R160-6.
 262. Yan, S.F., et al., *Induction of interleukin 6 (IL-6) by hypoxia in vascular cells. Central role of the binding site for nuclear factor-IL-6*. J Biol Chem, 1995. 270(19): p. 11463-71.
 263. Liley, H.G., et al., *Regulation of messenger RNAs for the hydrophobic surfactant proteins in human lung*. J Clin Invest, 1989. 83(4): p. 1191-7.
 264. Tamm, M., et al., *Hypoxia-induced interleukin-6 and interleukin-8 production is mediated by platelet-activating factor and platelet-derived growth factor in primary human lung cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1998. 19(4): p. 653-61.
 265. Yamashita, M., *Hyperbaric oxygen treatment attenuates cytokine induction after massive hemorrhage*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000. 278(5): p. E811-6.
 266. Chabot, S., et al., *Surfactant protein A inhibits lipopolysaccharide-induced in vivo production of interleukin-10 by mononuclear phagocytes during lung inflammation*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2003. 28(3): p. 347-53.
 267. Oei, J., et al., *Decreased neutrophil apoptosis in tracheal fluids of preterm infants at risk of chronic lung disease*. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2003. 88(3): p. F245-9.
 268. Beresford, M.W. and N.J. Shaw, *Detectable IL-8 and IL-10 in bronchoalveolar lavage fluid from preterm infants ventilated for respiratory distress syndrome*. Pediatr Res, 2002. 52(6): p. 973-8.

8. Anhang

8.1. Materialien

8.1.1. Sequenzen Primer und Sonden

Die Primer und Sonden wurden von der Firma Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland synthetisiert.

Housekeeping-Gen

β -Actin (A):

Forward primer (FP): 5'- AGGTCATCACTATTGGCAACGA -3'

Reverse primer (RP): 5'- CAACGTCACACTTCATGATGGA -3'

Probe: 5'(FAM)- AGCCTTCCTTCTTGGGTATGGAATCCTGT -(TAMRA)3'

18S (S):

FP: 5'- TGCGAATGGCTCATTAATCAG -3'

RP: 5'- TAGCTCTAGAATCACCACAGTTATCCA -3'

Probe: 5'(FAM)- ATGGTTCCTTTGGTCGCTCGCTCCT -(TAMRA)3'

Porphobilinogen deaminase (PBGD):

FP: 5'- GCGGAGTCATGTCCGGTAAC -3'

RP: 5'- ACTCGAATCACCCCTCATCTTTGA -3'

Probe: 5'(FAM)- CCACAACCGCGGAAGAAAACGG -(TAMRA)3'

Zielgene

Surfactant assoziiertes Protein A (SP-A):

FP: 5'- AGTTGACTGACTGCCCATTGGT -3'

RP: 5'- ACTCTACGAGATCAAACATCAGATTCTG -3'

Probe: 5'(FAM)- TGCAAGCTGAGGACTCCCATTGTTTGC -(TAMRA)3'

Surfactant assoziiertes Protein B (SP-B):

FP: 5'- ATGGCCAAGTCGCACCTACT -3'

RP: 5'- CCAGAATTGAGGGCCTTGTG -3'

Probe: 5'(FAM)- CCCAGGTGCAGCTATCACGTCGG -(TAMRA)3'

Surfactant assoziiertes Protein C (SP-C):

FP: 5'- CCACTGGCATCGTTGTGTATG -3'

RP: 5'- GTAGGTTCTGAGCTGGCTTA -3'

Probe: 5'(FAM)- CTACCAGCGGCTCCTGACGGCC -(TAMRA)3'

Surfactant assoziiertes Protein D (SP-D):

FP: 5'- GGCCTCCATCTGCTGCCT -3'

RP: 5'- GGAGACAGAGGAATCAAAGGTGAA -3'

Probe: 5'(FAM)- AGCAGCACTGTCTGGAAGCCCGC -(TAMRA)3'

Vascular endothelial growth factor (VEGF) :

FP : 5'-GCAGGCTGCTGTAACGATGA-3'

RP : 5'-TCATTCTCTCTATGTGCTGGCTTT-3'

Probe :5'(FAM)- ACTACCATGCAGATCATGCGGATC-(TAMRA)3'

Vascular endothelial growth factor – receptor 1 (VEGF-R1) :

FP : 5'-CCGAGCCACCAACCAGAA -3'

RP : 5'-CGTGATCAGCTCCAGGTTTGA-3'

Probe :5'(FAM)-CCTCACCGTGCAAGGAACCTCAGACA -(TAMRA)3'

Vascular endothelial growth factor – receptor 2 (VEGF-R2) :

FP : 5'-TCTGCTCAAGATAAGAAGACCAAGAA-3'

RP : 5'-TCTCCAGATTTCCGGTGATCA-3'

Probe :5'(FAM)-AGCTCATCATCCTGAAGCGCATGGCA -(TAMRA)3'

Insulin like growth factor 1

FP : 5'-GCTGGTGGATGCTCTTCAGTTC-3'

RP : 5'-TGAGGTGCCCTCCGAATG-3'

Probe :5'(FAM)-CTTTTACTTCAACAAGCCCACAGGCTATGGC -(TAMRA)3'

Insulin like growth factor 1receptor

FP : 5'-TCCTGAAGGGCAATCTGCTTATT-3'

RP : 5'-GAGAATGGCGGATCTTCACGTA-3'

Probe :5'(FAM)- CTTTACTTCAACAAGCCCACAGGCTATGG -(TAMRA)3'

Interleukin 6 (IL-6)

FP : 5'-TCAATTCCAGAAACCGCTATGAA-3'

RP : 5'-CACCAGCATCAGTCCCAAGAA-3'

Probe :5'(FAM)-CCTCTCTGCAAGAGACTTCCATCCAGTTGC-(TAMRA)3'

Interleukin 10 (IL-10)

FP : 5'-GAGAAGCTGAAGACCCTCAGGAT-3'

RP : 5'-GCTCCACTGCCTTGCTCTTATT-3'

Probe :5'(FAM)-CTGAGGCGCTGTCATCGATTTCTCCC-(TAMRA)3'

Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF- α)

FP : 5'-GGCCTCCCTCTCATCAGTTCTAT-3'

RP : 5'-ACGTGGGCTACAGGCTTGTC-3'

Probe :5'(FAM)-CCAGACCCTCACACTCAGATCATCTTCTCAA-(TAMRA)3'

Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha (HIF-1 α)

FP : 5'-GGTTGGTTACTGTTGGTATCATAGACAT-3'

RP : 5'-CAGATTGAAGTGCACCCTAACAAG-3'

Probe :5'(FAM)-TGCAGTGAAGCACCTTCCACGTTGCT-(TAMRA)3'

Hypoxia-Inducible Factor 2 alpha (HIF-2 α)

FP : 5'-CCAACAGAGGCCGGACTGT-3'

RP : 5'-GGCAGTTGTTGTAGACTCTCACTTG-3'

Probe :5'(FAM)-CCACCTGGAAGGTCCTGCACTGCA-(TAMRA)3'

8.1.2. Chemikalien und Substanzen

Rompun® 2%	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
Ketavet® 100mg/ml	Pharmacia & Upjohn, Erlangen, Deutschland
TRIzol Reagent	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
RNAse OUT	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
0,1M DTT	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

LiChrosolv HPLC Wasser	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol absolut	Riedel-de-Haen, Honeywell Int. Inc., Seelze
Trichlormethan/Chloroform	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
ROTIPURAN®	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
2-Propanol	Riedel de Haen, Honeywell Int. Inc., Seelze
	JT-Baker, Phillipsburg, NJ, USA
RhoX6	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
OliGreen Fluorescent Dye	Molecular Probes, Eugene, OR, USA

8.1.3. Enzyme und Kits

Random Primer p(dN)6	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Superscript II	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
dNTP mix 10M	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
1st. Strand Buffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DNAfree™	Ambion Ltd., Cambridgeshire, UK
QIAamp DNA Blood Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
PCR Mastermix for TaQman™ Assays	Eurogentec, Seraing, Belgien
GibcoBRL® M13mp19(+)Strand DNA	Gibco BRL Life Technologies, Merelbeke, Belgien
QIAquick® PCR Purification Kit (250)	Qiagen GmbH, 40724 Hilden, Deutschland
Ribonuclease A	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland

8.1.4. Geräte

Mettler PJ800 Waage	Mettler Toledo GmbH, Gießen Deutschland
Digitale Schieblehre	Mitutoyo, Neuss, Deutschland
Eppendorf-Referenz Pipette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
ABI PRISM® Cap Installing Tool	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Zentrifuge Hettich Universal 30 RF und EREBA 12	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemie, NY, USA
Vortex VF2	Janke+Kunkel GmbH+Co KG, IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Thermal Cycler PTC-200	MJ Research Inc., Waltham, MA, USA

ABI PRISM 7700 SDS	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Bosch economic-froster	Robert Bosch GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland
Bosch economic-cooler	Robert Bosch GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland
Heraeus – Sepatech (Gefrierschrank)	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
MJ Research PTC-200 DNA Engine™	MJ Research, Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Pipetman® P2 -1000	Gilson, Inc., Middleton, USA
Pharmacia Biotech Ultrospec™ 1000 UV/Visible Spectrophotometer	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Power Macintosh 7200/1200	Apple Computer, California, USA

8.1.5. Arbeitsmaterial

Latexhandschuhe, puderfrei	Ansell GmbH, München, Deutschland
Parafilm 10 cm	Pechiney Plastic Packaging, Inc., USA
Tubes 0,2 ml	Pure Pak Molecular BioProducts, USA
Safe-Lock-Tubes 0,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Safe Lock Tube 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Microtubes 1,5 ml	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Pipettenspitzen	Nerbe Plus GmbH, Winsen, Luhe, Deutschland
Micro Amp Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
ABI PRISM® Optical Caps	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Hellma Präzisions-Küvette	Hellma GmbH & Co KG, Müllheim, Deutschland

Weiteres Verbrauchsmaterial von:

Molecular BioProducts, Inc., San Diego, USA

BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

Fresenius Kabi Deutschland, Bad Homburg, Deutschland

Tabelle 8.1 Auxologische fetale Daten

Probe_ID	Gruppe	Mutter Nr.	Wurf-größe	Feten im gleichen Uterushorn	Geburts-gewicht [g]	Kopf-größe [mm]	Körper-Länge [mm]	Verhältnis Kopf/Körper
2KON/F1	Kontrolle	1	7	3	0,959	9,79	19,75	0,50
2KON/F2	Kontrolle	1	7	3	1,031	10,67	20,19	0,53
2KON/F3	Kontrolle	1	7	3	0,875	10,10	20,35	0,50
2KON/F4	Kontrolle	1	7	4	0,996	10,37	20,79	0,50
2KON/F5	Kontrolle	1	7	4	0,973	10,27	20,78	0,49
2KON/F6	Kontrolle	1	7	4	0,981	10,09	21,11	0,48
2KON/F7	Kontrolle	1	7	4	0,962	10,01	19,95	0,50
5KON/F1	Kontrolle	2	5	5	0,879	9,73	20,39	0,48
5KON/F2	Kontrolle	2	5	5	0,969	9,68	19,86	0,49
5KON/F3	Kontrolle	2	5	5	0,947	9,90	20,41	0,49
5KON/F4	Kontrolle	2	5	5	1,030	10,11	19,79	0,51
5KON/F5	Kontrolle	2	5	5	0,811	9,75	19,68	0,50
6KON/F1	Kontrolle	3	5	5	1,033	10,61	20,37	0,52
6KON/F2	Kontrolle	3	5	5	0,954	9,83	19,99	0,49
6KON/F3	Kontrolle	3	5	5	0,961	10,23	19,85	0,52
6KON/F4	Kontrolle	3	5	5	1,090	10,17	20,10	0,51
6KON/F5	Kontrolle	3	5	5	1,042	10,26	21,08	0,49
8KON/F1	Kontrolle	4	6	3	1,064	10,38	21,16	0,49
8KON/F2	Kontrolle	4	6	3	1,069	10,18	21,97	0,46
8KON/F3	Kontrolle	4	6	3	1,050	10,18	20,22	0,50
8KON/F4	Kontrolle	4	6	3	1,106	10,72	21,12	0,51
8KON/F5	Kontrolle	4	6	3	1,089	10,20	21,64	0,47
8KON/F6	Kontrolle	4	6	3	1,116	10,14	21,14	0,48
9KON/F1	Kontrolle	5	8	3	1,003	10,83	19,65	0,55
9KON/F2	Kontrolle	5	8	3	1,072	10,18	20,24	0,50
9KON/F3	Kontrolle	5	8	3	0,943	10,13	20,81	0,49
9KON/F4	Kontrolle	5	8	5	0,907	10,38	19,74	0,53
9KON/F5	Kontrolle	5	8	5	0,946	10,14	19,43	0,52
9KON/F6	Kontrolle	5	8	5	0,946	10,06	19,35	0,52
9KON/F7	Kontrolle	5	8	5	0,832	9,82	16,98	0,58
9KON/F8	Kontrolle	5	8	5	0,929	9,45	19,65	0,48
1E14/F1	Hypoxie	6	6	2	0,640	9,23	17,50	0,53
1E14/F2	Hypoxie	6	6	2	0,670	9,30	17,76	0,52
1E14/F3	Hypoxie	6	6	4	0,660	9,41	16,52	0,57
1E14/F4	Hypoxie	6	6	4	0,690	9,20	18,02	0,51
1E14/F5	Hypoxie	6	6	4	0,570	9,01	16,17	0,56
1E14/F6	Hypoxie	6	6	4	0,580	8,91	16,37	0,54
2E14/F1	Hypoxie	7	5	2	0,625	8,94	16,75	0,53
2E14/F2	Hypoxie	7	5	2	0,668	9,09	17,44	0,52
2E14/F3	Hypoxie	7	5	3	0,678	9,17	17,81	0,51
2E14/F4	Hypoxie	7	5	3	0,633	9,27	16,48	0,56
2E14/F5	Hypoxie	7	5	3	0,592	8,95	16,59	0,54
3E14/F1	Hypoxie	8	6	2	0,800	9,37	17,80	0,53
3E14/F2	Hypoxie	8	6	2	0,764	9,74	17,80	0,55
3E14/F3	Hypoxie	8	6	4	0,735	9,35	18,67	0,50
3E14/F4	Hypoxie	8	6	4	0,677	9,35	16,65	0,56
3E14/F5	Hypoxie	8	6	4	0,759	9,81	18,55	0,53
3E14/F6	Hypoxie	8	6	4	0,825	9,70	18,97	0,51
4E14/F1	Hypoxie	9	8	5	0,608	9,36	16,55	0,57

4E14/F2	Hypoxie	9	8	5	0,656	9,78	16,91	0,58
4E14/F3	Hypoxie	9	8	5	0,734	9,46	17,05	0,55
4E14/F4	Hypoxie	9	8	5	0,762	9,02	18,30	0,49
4E14/F5	Hypoxie	9	8	5	0,639	8,73	16,06	0,54
4E14/F6	Hypoxie	9	8	3	0,396	9,75	16,63	0,59
4E14/F7	Hypoxie	9	8	3	0,749	9,32	18,12	0,51
4E14/F8	Hypoxie	9	8	3	0,766	9,70	18,86	0,51
5E14/F1	Hypoxie	10	6	3	0,862	9,51	18,10	0,53
5E14/F2	Hypoxie	10	6	3	0,845	9,39	18,51	0,51
5E14/F3	Hypoxie	10	6	3	0,811	9,93	18,23	0,54
5E14/F4	Hypoxie	10	6	3	0,813	9,60	17,67	0,54
5E14/F5	Hypoxie	10	6	3	0,805	9,69	17,18	0,56
5E14/F6	Hypoxie	10	6	3	0,809	9,25	17,14	0,54

9. Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten 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.“

10. Lebenslauf

Name: Bähler, Torsten Manuel
Geboren am: 03.07.1979
Geburtsort: Kirchen an der Sieg
Eltern: Hubert und Marianne Bähler geb. Stinner
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch

1986 - 1990	Christophorus Grundschule II Betzdorf
1990 - 1992	Freiherr von Stein Gymnasium Betzdorf
1992 - 1999	Gymnasium auf der Morgenröthe Siegen
1999	Einstellung bei der Bundeswehr
2000	Immatrikulation an der JLU – Gießen
2002	Ärztliche Vorprüfung (Note: 2,0)
2003	Beginn der Promotionsarbeit am Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Giessen
2003	Erster Abschnitt Ärztliche Prüfung (Note: 2,0)
2005	Zweiter Abschnitt Ärztliche Prüfung (Note: 1,6)
2005 - 2006	Praktisches Jahr im evangelischen Krankenhaus Gießen
2006	Dritter Abschnitt Ärztliche Prüfung (Note: 1,0)
2006	Assistenzarzt in der Abteilung Orthopädie, Unfallchirurgie und Verbrennungsmedizin am Bundeswehrzentral Krankenhaus Koblenz, Leiter OTA PD Dr. med. E. Kollig
seit Juni 2007	Assistenzarzt in der Abteilung Anästhesiologie und Intensivmedizin am Bundeswehrzentral Krankenhaus Koblenz, Leiter OTA Dr. med. A. Thomas

11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben, bedanken.

Herrn PD Dr. Irwin Reiss danke ich für die wertvolle wissenschaftliche und menschliche Betreuung und die Möglichkeit, dass ich diese Arbeit durchführen konnte.

Herrn Prof. Dr. Ludwig Gortner danke ich für die Überlassung des Themas und den unerschütterlichen Glauben an das „Maus-Modell“.

Frau PD Dr. Silvia Rudloff danke ich für ihr stets offenes Ohr, die vielen wissenschaftlichen und privaten Ratschläge und die „Türen“ die sie mir für meine Kongressbesuche geöffnet hat.

Frau Dr. Anne Hilgendorff danke ich für die praktische und theoretische Betreuung meiner Arbeit, ihren unermüdlichen Optimismus und die wertvollen Korrekturen.

Herrn Daniel Rawer danke ich für die umfangreiche Einarbeitung in die Taqman-Technologie sowie die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Experimente.

Herrn Dr. Michael Ebsen danke ich für die Anfertigung und Überlassung der histomorphometrischen Daten.

Herrn Dr. Pabst danke ich für die kompetente statistische Beratung und Auswertung.

Frau Dr. Monika Wilda und den anderen Mitarbeitern des onkologischen Labors danke ich für die Tipps und Hilfen während der Laborarbeiten.

Marcel Zoremba danke ich für die Überlassung der lichtmikroskopischen Fotografien der Lungen.

Frau Ann-Sophie Seliger danke ich für die Hilfe während des tierexperimentellen Teils dieser Arbeit.

Gabriela Hilpert, Lars Reinhold und meiner Mutter danke ich für die Korrektur dieser Arbeit.

Meinen Eltern Hubert und Marianne danke ich für die immer währende Unterstützung, Aufmunterung und den Rückhalt.

Meiner Frau Kristin danke ich für alle die Dinge, für die ich mich jeden Tag vergesse zu bedanken.