

Aus dem Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Köln

Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. J. Dötsch

Untersuchung des Growth Hormone (GH) und
Insulin-like Growth Factor (IGF)-Systems in der Lungenentwicklung nach IUGR

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

vorgelegt von Jawed Nawabi
aus Frankfurt am Main

promoviert am 15.03.2019

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. h. c. Th. Krieg

1. Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. med. J. Dötsch

2. Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. med. W. Krone

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgender Person erhalten:

Dr. med. Dr. nat. med. Miguel A. Aléjandre Alcazar

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 24/2011) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 13.08.2018

Unterschrift:

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Jun. Prof. Dr. Dr. nat. med. Alejandro Alcázar von mir selbst ausgeführt worden.

Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Experimente sind von mir mit Unterstützung von Jun. Prof. Dr. Dr. nat. med. Alejandro Alcazar und der medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Vohlen durchgeführt worden.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Dr. Dr. Alejandro Alcázar danken, welcher mir die Möglichkeit gegeben hat eine solch vielseitige und spannende wissenschaftliche Arbeit durchzuführen. Vielen Dank für die zahlreichen Gespräche auf intellektueller und auch persönlicher Ebene, die zur Förderung meines wissenschaftlichen Horizontes und der wissenschaftlichen Herangehensweise geführt haben. Dazu gehören auch die unzähligen kritischen Begutachtungen meiner Anträge, Kongressteilnahmen, Präsentationen und dieser Arbeit - teilweise on last minute - und vor allem stets erreichbar für mich zu sein. Das habe ich nicht als Selbstverständlichkeit angesehen. Vielen Dank!

Das möchte ich auch Frau Dr. Dinger zuzurufen, die mich während des Auslandsaufenthaltes von Herrn Dr. Dr. Alejandro-Alcázar unterstützt und mir Kraft und Mut zur Vollendung meiner Dissertation gegeben hat. Mein außerordentlicher Dank geht an Frau Vohlen und ihre uneingeschränkt geduldige Bereitschaft mich seit Beginn der Arbeit in der Versuchsdurchführung angeleitet, unterstützt und korrigiert zu haben. Ich hätte diese Arbeit in diesem Umfang ohne Deine mühevollen Geduld und liebevolles Verständnis niemals erfolgreich abschließen können. Zuletzt möchte ich mich für die Ehrlichkeit, Kollegialität und wissenschaftlichen Anregungen des gesamten Teams für „Experimentelle Pneumologie“, „Perinatale Programmierung“ und bei Prof. Dr. Dötsch bedanken. Danke an die medizinische Fakultät Köln für die Auswahl zum Köln Fortune Stipendiaten und Vertrauen in meine Leistungen und Engagement.

Ich danke meiner Freundin für Ihren ewigen moralischen Beistand und menschlichen Halt. Mein ganz besonderer Dank aber gilt meinen Eltern. Ich danke euch dafür, dass ihr meine Absicht Medizin zu studieren immer gefördert habt und alles dafür getan habt, dass ich eine gute Ausbildung bekomme. Danke, dass ihr mir gezeigt habt, dass man es mit harter Arbeit, Hingabe und Glauben an sich selbst zu etwas bringt. Ich bin der glücklichste Sohn der Welt. Ohne euch wäre ich nie dort, wo ich heute stehe.

**Für
meine Mutter**

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	9
1.1 Intrauterine Wachstumsrestriktion (IUGR).....	9
1.2 IUGR und fetale Programmierung	11
1.3 IUGR und Folgen für das endokrine System.....	12
1.4 IUGR und der Einfluss auf die Entstehung von Lungenerkrankungen	13
1.5 Lungenentwicklung	14
1.6 Die GH/IGF-Achse	17
1.7 Intrinsisches GH/IGF-System der Lunge und IUGR	20
2. Zentrale Hypothese und Arbeitsprogramm	22
2.1. Hypothese	22
3. Material und Methoden	24
3.1 Material	24
3.1.1 Verwendete Geräte.....	24
3.1.2 Arbeits- und Verbrauchsmaterialien	25
3.1.3 Chemikalien, Medien und Reagenzien.....	26
3.1.4 Puffer und Stammlösungen	28
3.1.5 Oligonukleotide	30
3.1.6 Verwendete Antikörper für das Western Blot Verfahren	31
3.2 In vivo	32
3.2.1 Das Tiermodell - Induktion der intrauterinen Wachstumsrestriktion	32
3.2.2 Lungenaufbereitung	33
3.3 DNA Untersuchungen mittels real-time PCR	34
3.3.1 mRNA Isolation und real-time PCR	34
3.3.2 Umschreibung von mRNA in doppelsträngige cDNA.....	34
3.3.3 Durchführung der TaqMan real-time PCR.....	35
3.3.4 Durchführung der SYBR green I real-time PCR.....	35
3.4 Proteinnachweis mittels Western Blot	36
3.4.1 Proteindetektion	36
3.4.2 SDS Page.....	37
3.4.3 Blotting	37
3.4.4 Proteindetektion	37
3.4.5 Stripping	38
3.5 ELISA	38
3.6 Zellkulturversuche	40

3.6.1 Nährstoffmangel-Versorgung <i>in vitro</i> und Stimulationsversuche mit GH/IGF1	41
3.6.1.3 Zellzählung	41
3.6.2 Primäre neonatale pulmonale Fibroblasten.....	44
3.3.3 ELISA zur Bestimmung von IGF1 im Zellkulturüberstand.....	45
3.4 Daten Analyse	46
4. Ergebnisse	47
4.1 Vorarbeiten	47
4.2 <i>in vivo</i> Versuche	48
4.2.1 Expressionanalyse des GH-Systems	48
4.2.2 Analyse des IGF1-Systems	51
4.2.3 Analyse von Proliferation, Apoptose und der Extrazellulären Matrix	54
4.3 Zellkulturversuche	59
4.3.1 Nährstoffmangel-Versorgung <i>in vitro</i> als Modell der Proteinmangeldiät	59
4.3.2 Zellkulturversuche zur Stimulation mit GH und IGF1	65
4.3.3 Primäre neonatale pulmonale Fibroblasten.....	68
5. Diskussion.....	73
5.1 Einleitung.....	73
5.2 Veränderungen des GH/IGF-Systems in der Lunge nach einer Mangelernährung	73
5.2.1 GH-Signalkaskade	73
5.2.2 IGF1-Signalkasakade und Effekte auf Proliferation, Apoptose und die ECM	75
5.3 Veränderung des GH/IGF-Systems in Fibroblasten nach einer Mangelernährung.....	82
5.3.1 Veränderungen des GH/IGF-Systems in Fibroblasten	83
5.3.3 Postnatale Veränderungen des GH/IGF-Systems in pnpF	85
5.4. Ausblick und translationaler Forschungsansatz	87
6. Zusammenfassung	88
7. Literaturverzeichnis.....	90
8. Vorabveröffentlichung von Ergebnissen.....	105
8. Anhang.....	105
8.1 Abbildungsverzeichnis	105
8.2 Tabellenverzeichnis	106
9. Lebenslauf.....	106

Abkürzungsverzeichnis

BPD	Bronchopulmonale Dysplasie
bzw.	beziehungsweise
IUGR	<i>Intrauterine growth restriction</i> (Englisch für „Intrauterine Wachstumsrestriktion“)
ECM	<i>Extracellular matrix</i> (Englisch für Extrazelluläre Matrix)
FEV ₁	Forciertes expiratorisches Volumen in 1 Sekunde
GH	Growth Hormone
GHRE	Growth Hormone Response Elements
GHRH	Growth-Hormone-Releasing Hormon
HPA	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
HVL	Hypophysenvorderlappen
IGF1	Insulin-like Growth Factor 1
IGFBP	IGF-binding Protein
JAK	Janus-Kinase
MEF	<i>mouse embryonic fibroblast</i> (Englisch für “murine embryonale Fibroblasten”)
pnpF	primäre neonatale pulmonale Fibroblasten
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
SGA	<i>Small for gestational age</i> (Englisch für „klein bezogen auf das Gestationsalter“)
SRF	Somatropin-releasing Faktor
STAT	Signal transducer of transcription
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Intrauterine Wachstumsrestriktion (IUGR)

Small for gestational age, SGA (Englisch für „Klein bezogen auf das Gestationsalter“), ist eine international gebräuchliche medizinische Bezeichnung und beschreibt untergewichtige oder zu kleine Neugeborene, bei denen das Geburtsgewicht oder die Körperlänge bezogen auf das Schwangerschaftsalter im unteren Bereich der statistischen Normalverteilung liegt. Ein Maß für die Streuung dieser statistischen Verteilung bieten bevölkerungsbezogene Wachstumskurven, sogenannte Perzentilenkurven. Auf diesen liegen definitionsgemäß Neugeborene mit SGA unterhalb der 10. Perzentile. Das bedeutet, dass mindestens 90% der Kinder dieses Alters und Geschlechtes größer sind und 10 % gleich oder sogar kleiner. Kommt es *in utero* jedoch zu einer Verzögerung des Wachstums, so spricht man von einer intrauterinen Wachstumsrestriktion, IUGR, (Englisch „intrauterine growth restriction“). Diese bezieht sich nicht auf das statistische Verteilungsmuster des Geburtsgewichts oder der Körperlänge, sondern stellt vielmehr eine pathologische Form der SGA dar, also ein klinisches Erscheinungsbild. Demnach sind unter SGA-Neugeborenen sowohl gesunde Neugeborene, als auch einige mit einer IUGR zu finden. Ein pathologisches und somit suboptimales fetales Wachstum im Rahmen einer IUGR stellt eine der Hauptursachen für perinatale Mortalität und Morbidität dar (1,2,3). So liegt es nahe, dass die IUGR als ein wichtiger Marker für eine vorgeburtliche Mangelversorgung sowie gesundheitliche Risiken eingesetzt wird und dass das Geburtsgewicht einen bestimmenden Faktor für die Krankheitsdisposition im späteren Leben darstellt (4).

Die Ursachen einer IUGR können genetisch oder umweltbedingt sein. Sie können auf der Seite des Kindes liegen oder von der Mutter beziehungsweise der Plazenta ausgehen sowie in Kombination dieser auftreten (5). Zu den häufigsten Ursachen gehören dabei Folgende:

- (1) Fetale Ursachen:** Chromosomenaberrationen, Fehlbildungen, vertikale Infektionen (z.B. Röteln, Toxoplasmose, Herpes genitalis).
- (2) Utero-plazentäre Ursachen:** Mehrlingsschwangerschaft, Uterusfehlbildungen, Plazentainsuffizienz, Präeklampsie, Infarkte.
- (3) Maternale Ursachen:** Gestationsdiabetes, Alter, Nulliparität, maternale Erkrankungen (Nierenerkrankungen, Hypoxie, Anämie, kardiovaskuläre Erkrankungen, Lungenerkrankungen, Hypertonie), Medikamente (Warfarin, Steroide, Antikonvulsiva), Drogenabusus (Alkohol, Nikotin, Marijuana).
- (4) Genetische Ursachen:** Eine Reihe von Genen, die in ihrer Expression im Rahmen einer IUGR verändert sind, wurden in den letzten Jahren zunehmend identifiziert. Dazu werden plazentare, maternale und fetale Gene gezählt, unter die auch die genetische Deletion des Wachstumsfaktors IGF1 (Insulin-Like Growth Factor 1) und die Mutation seines Rezeptors, dem Insulin-Like Growth Factor 1 Rezeptor (IGF1-R) mit konsekutiv erniedrigter Rezeptorfunktion, fällt.

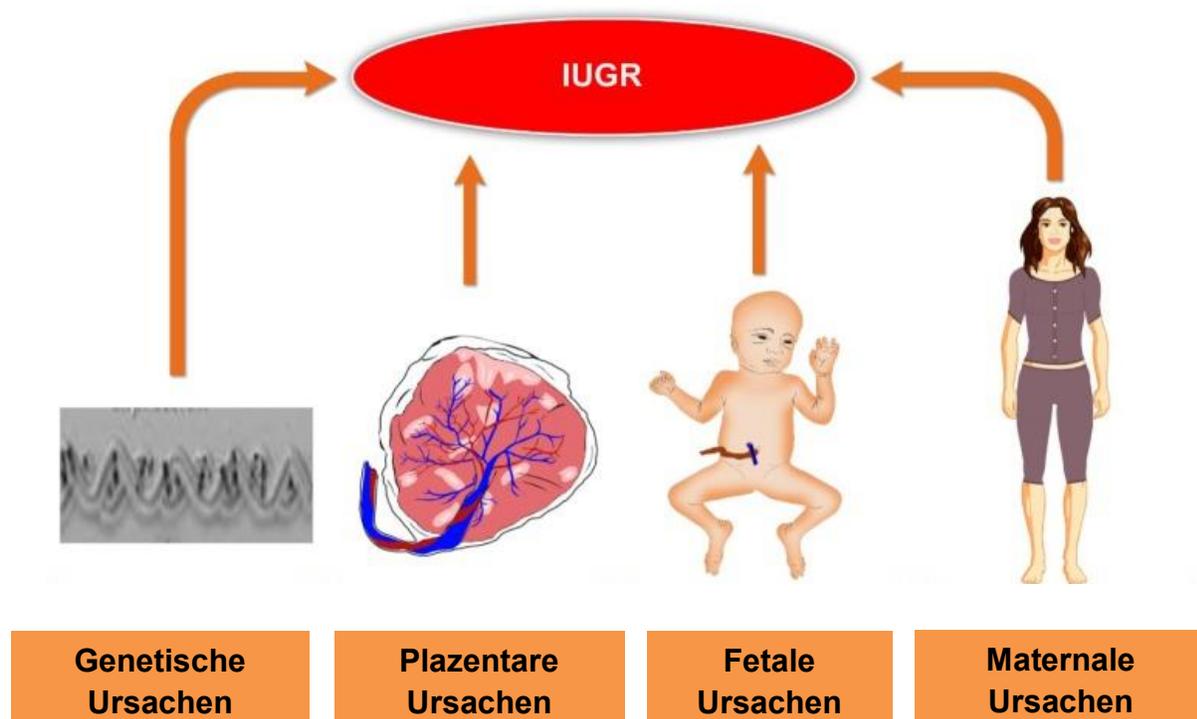


Abbildung 1: Intrauterine Wachstumsrestriktion (IUGR) kann das Ergebnis mütterlicher, fetaler, plazentarer oder genetischer Ursache sein oder durch eine Kombination dieser entstehen. (Modifiziert nach Sharma D et al., 2016)

Zu den akuten Komplikationen einer IUGR gehören neben Sauerstoff- und Nährstoffmangel, vor allem kardiopulmonale Dekompensation mit perinataler Asphyxie, Mekoniumaspiration oder persistierende pulmonale Hypertension (PPHN) (6). Langfristig besteht bei Neugeborenen mit IUGR ein erhöhtes Risiko für ein gestörtes Wachstum und einer alterierten neuronalen Entwicklung (7,8). Diese Kinder entwickeln im Verlauf Erkrankungen des höheren Alters. Dazu gehören vor allem Hypertension, kardiovaskuläre Erkrankungen, Typ 2 Diabetes, Nieren- und Lebererkrankungen, Hypercholesterinämie, metabolisches Syndrom, Adipositas und Lungenerkrankungen (6,7,8). Darüber hinaus weisen Neugeborene nach IUGR ein schnelles postnatales Aufholwachstum auf, ein sogenanntes *catch-up growth*. Dabei scheint das Risiko, Krankheiten im Erwachsenenalter zu entwickeln erhöht zu sein, wenn dem Prozess der Erkrankung eine IUGR mit schnellem postnatalen Aufholwachstum vorausgegangen ist (6,7,8,9).

1.2 IUGR und fetale Programmierung

Ein möglicher Pathomechanismus, der zu den beschriebenen Veränderungen nach IUGR führt, ist das Modell der fetalen Programmierung. Der Begriff fetale Programmierung bezeichnet einen Prozess, bei dem durch die Einwirkung von Umweltfaktoren während intrauteriner Entwicklungsphasen die zukünftige Funktionsweise und Struktur von Organen und Organsystemen dauerhaft verändert wird. Diese sollen den Fetus im Verlauf auf eine nährstoffarme Postnatalphase vorbereiten, um so die Überlebenschancen zu maximieren, prädisponiert jedoch den Körper im späteren Leben, chronische Erkrankungen zu entwickeln, z.B. Adipositas, Diabetes mellitus und Hypertension (9,25).

Barker et al. haben sich während der späten achtziger Jahre maßgeblich mit dieser Thematik auseinandergesetzt. Sie haben epidemiologische Untersuchungen durchgeführt, die einen geografischen Zusammenhang zwischen Fällen ischämischer Herzkrankheit in den Jahren 1968-1978 und den Kindersterblichkeitsraten zwischen 1921-1925 herstellten. Basierend auf diesen Beobachtungen formulierten Barker et al die Hypothese, dass ein erhöhtes Risiko für chronische Herz-Kreislauf-Erkrankungen im Alter durch eine intrauterine Mangelernährung im Rahmen einer IUGR zu erklären sei (13).

Hales et al. haben in weiteren Folgestudien der von Barker et al. untersuchten Kohorte demonstriert, dass eine ähnliche inverse Korrelation zwischen dem Geburtsgewicht, Glukosetoleranz und Insulinresistenz besteht (14). In diesem Zusammenhang zeigten Individuen mit SGA im Vergleich zu AGA, *appropriate for for gestational age* (Englisch für eutrophe Neugeborene), ein fünffach erhöhtes Risiko auf, im weiteren Leben eine eingeschränkte Glukosetoleranz oder Diabetes mellitus Typ 2 zu entwickeln (15). Basierend auf diesen Beobachtungen formulierten Hales und Barker die sogenannte *Thrifty-Phenotype* Hypothese: Es handelt sich hierbei um ein Erklärungsmodell, wie fetale Mangelernährung oder andere Umweleinflüsse in der frühen Entwicklungsphase eine Reihe von physiologischen und metabolischen Adaptionsvorgängen formt (16).

1.3 IUGR und Folgen für das endokrine System

Die Untersuchungen von Barker und Hales et al. konnten bereits früh zeigen, dass einige dieser Adaptionsvorgänge mit hämodynamischen und endokrinen Veränderungen beim Fetus einhergehen (17). In den Folgejahren konnte der Einfluss einer IUGR auf viele weitere endokrinologische Systeme ausgebreitet werden. So zeigen Feten mit einer IUGR eine Aktivierung des RAAS (Renin-Angiotensin-Aldosteron-System) mit signifikant erhöhten Angiotensin(AT)-II-Serumspiegeln bei unveränderter AT-II-Rezeptordichte (18). Daneben ist auch die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA), (Englisch für „hypothalamus pituitary adrenal“), die einen Hauptteil des neuroendokrinen Systems bildet, aktiviert: Cortisolkonzentrationen sind im Nabelschnurblut bei IUGR-Feten signifikant erhöht (19). Als weiterer ebenfalls betroffener Regelkreis bei Neugeborenen nach IUGR zählt die für das Wachstum essentielle Growth Hormone/ Insulin-like Growth Factor (GH/IGF)-Achse (20), die frühpostnatal nach IUGR in ihrer Aktivität vermindert ist, im Verlauf gestört bleibt und mit dem postnatalen Aufholwachstum assoziiert wird (21,22).

1.4 IUGR und der Einfluss auf die Entstehung von Lungenerkrankungen

Lungenerkrankungen sind vermehrt mit intrauteriner Wachstumsrestriktion (IUGR) assoziiert. Klinische Studien zeigen deutlich, dass das forcierte expiratorische Volumen (FEV_1) in Kindern nach IUGR eingeschränkt ist und somit eine funktionelle Störung der Atemwege vorliegt. Daneben zeigen Kinder nach IUGR mit einem schnellen postnatalen Aufholwachstum zwar bessere Ergebnisse als Kinder nach IUGR ohne ein Aufholwachstum, aber dennoch ist ihre Lungenfunktion im Vergleich zu gesund geborenen Kindern ohne IUGR schlechter (10,11,12). Dass sich diese Funktionseinschränkung jedoch nicht nur auf das Kindesalter beschränkt, zeigen mehrere klinische Studien, bei denen Lungefunktionsuntersuchungen bei Patienten verschiedenen Alters nach IUGR durchgeführt worden sind: Das FEV_1 ist der Teil der forcierten Vitalkapazität, der in der ersten Sekunde ausgeatmet wird. Dabei ist ein erniedrigtes FEV_1 bei Kindern im Alter von 5 bis 11 Jahren, Schulkindern, im jungen Erwachsenenalter sowie im höheren Alter (49 bis 51 Jahre) ermittelt worden (13,12,14). Es wird im Rahmen von Lungefunktionsuntersuchungen (z.B. Spirometrie) erhoben und dort als relative Sekundenkapazität angegeben. Fällt die Einsekundenkapazität im Verhältnis zur Vitalkapazität niedriger aus, kann dies Hinweis für eine obstruktive Lungenerkrankung liefern.

Diese humanen Daten konnten in mehreren tierexperimentellen Studien verifiziert werden: IUGR führt nicht nur zu einer eingeschränkten Lungenfunktion, sondern auch zu strukturellen pulmonalen Veränderungen. Es resultiert eine gestörte Alveolarisation, ein sogenanntes "*arrested alveolarization*". Die Lungen weisen eine erniedrigte Anzahl an Alveolen und pulmonalen Kapillargefäßen sowie einer verringerten Septendicke auf. Daneben kommt es zu einer gestörten Endothel-Zell-Interaktion und Zusammensetzung der Lipide in der Lunge (28–31). Diese Daten legen einen möglichen Zusammenhang zwischen IUGR sowie SGA und einem erhöhten Risiko an chronisch obstruktiven Atemwegserkrankungen, wie z.B. Asthma bronchiale oder bronchopulmonalen Dysplasien zu erkranken, nahe (32,33). Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen dieser strukturellen Veränderung aufgrund eines potentiell gestörten

Metabolismus der extrazellulären Matrix (ECM) sowie einer dysregulierten Zellproliferation und -apoptose sind noch weitgehend ungeklärt. (34–36).

1.5 Lungenentwicklung

Die Entwicklung der menschlichen Lunge beginnt in der Embryonalperiode und dauert über die Zeitspanne der anschließenden Fetalperiode bis zur Geburt und darüber hinaus an. Während sich die verschiedenen Entwicklungsphasen teilweise in Beginn und Ende überlappen, lässt sich die Lungenentwicklung in 5 Stadien einteilen (48): (1) embryonale Phase, (2) pseudoglanduläre Phase, (3) kanalikuläre Phase, (4) sakkuläre Phase und (5) alveoläre Phase. Dabei werden die pseudoglanduläre, die kanalikuläre und sakkuläre Phase zum Stadium der Fetalperiode gezählt und beschreiben entsprechend die Morphologie der prospektiven Atemwege und Lunge (**Abbildung 2**). Die Differenzierung der Lunge während dieser Teilabschnitte erfolgt dabei vom Zentrum der Lunge in die Peripherie (37,38). Da das Forschungsprojekt vor allem Änderungen in der Lunge nach IUGR in der späten Phase der Lungenentwicklung untersucht, folgt nur eine kurze Beschreibung der frühen Entwicklung (embryonale, pseudoglanduläre und kanalikuläre Phase) und eine ausführliche Darstellung der sakkulären und alveolären Phase (späte Lungenentwicklung).

(1) Embryonalphase (Schwangerschaftswoche 0-6)

In den ersten 5-7 Wochen *post conceptionem* findet die Organogenese der Lunge statt und das Formen des Bronchialbaumes (34–37).

(2) Pseudoglanduläre Phase (Schwangerschaftswoche 5-17)

Aus dem Bronchialbaum bilden sich in dieser Phase durch weiteres dichotomes Wachstum die Bronchien und die Bronchioli terminales, welche von neu gebildeten Lungengefäßen mit ihren definitiven Anschlüssen begleitet werden. Morphologisch ähnelt in dieser Phase die Lunge einer Drüse (34–37).

(3) Kanalikuläre Phase (Schwangerschaftswoche 16-27)

Nachdem in der frühen Lungenentwicklung die Bildung des Bronchialsystems abgeschlossen ist, schließt sich die späte Lungenentwicklung an. In dieser Entwicklungsphase steht die Bildung der Gasaustauschfläche im Vordergrund. In der kanalikulären Phase findet dabei hauptsächlich die weitere Differenzierung des pulmonalen Parenchyms statt. So beginnt in der Lungenperipherie die Ausbildung der Blut-Luft-Schranke. Das undifferenzierte oder kuboidale Epithel beginnt sich abzuflachen und bildet sich zu Typ I und II Alveolozyten aus. Gleichzeitig kommt es zu einer erhöhten Vaskularisation. Kapillargefäße, die vorher nur ein loses Netzwerk im Mesenchym darstellten, treten in engen Kontakt mit den neu ausgebildeten Alveolozyten (34–37).

(4) Sakkuläre Phase (Schwangerschaftswoche 24-38)

Während der sakkulären Phase findet eine enorme Expansion des Bronchialsystems statt und endet in seiner Peripherie in Gruppen terminaler Sacculi. Diese stellen eine transitorische Struktur dar, die sich nach der Geburt durch weiteres Wachstum nach distal und vor allem im Rahmen der Alveolarisation/Septierung in endgültige Lungenbläschen (Alveolen) entwickeln. Durch die starke Expansion kommt es zu einer Annäherung der Bronchialstrukturen und zu einer Reduktion des interstitiellen Gewebes zwischen diesen, so dass das kapilläre Netzwerk eine Art Mantel ausbildet. Gegen Ende der Fetalperiode findet die Ausreifung der Surfactant-Produktion statt, das als emulgierende, oberflächenaktive Substanz die Oberflächenspannung der Alveolen nach der Geburt herabsetzt und durch pulmonale Fibroblasten reguliert wird (34–37).

(5) Alveoläre Phase (Schwangerschaftswoche 36-36 Monate postnatal)

In der späten intrauterinen und frühen postnatalen Phase findet die Septierung statt, die zur Ausbildung der Alveolen führt. Aus den relativ dicken Sacculi, auch als primäre Septen beschrieben, entspringen sekundäre Septen. Maßgeblich formen Fibroblasten mit kontraktilen Eigenschaften, sogenannte Myofibroblasten, diesen Prozess und sezernieren zusätzlich im Verlauf Elastin in das pulmonale Parenchym (43). Diese Elastinfaser-Gerüste teilen die ursprünglichen Sacculi in kleinere Einheiten auf und

maximieren die Oberfläche für einen funktionsfähigen Gasaustausch. Um die Dicke der Blut-Gas-Schranke zu minimieren, durchlaufen die zwischen den Alveolen im Interstitium eingebetteten Kapillargefäße ebenfalls ein *Remodeling*, die sogenannte mikrovaskuläre Reifung (*microvascular maturation*). Die aus einer zweischichtigen Endothelschicht bestehenden Kapillargefäße verschmelzen dabei zu einer einschichtigen Endothelschicht. Mit fast 90% findet der Hauptteil der Alveolenbildung nach der Geburt statt (34–37).

Die Ratte hat sich als erfolgreiches Tiermodell der Frühgeburtlichkeit etabliert, da sich die Rattenlunge postnatal in der sakkulären Phase befindet, die im Menschen einem Stadium der Lunge in der 26.-28. Schwangerschaftswoche, und somit definitionsgemäß einer Frühgeburtlichkeit entspricht. Im Anschluss findet bei Ratten, überwiegend in den ersten zwei Wochen nach Geburt, die Alveolarisation der Lunge statt (72).

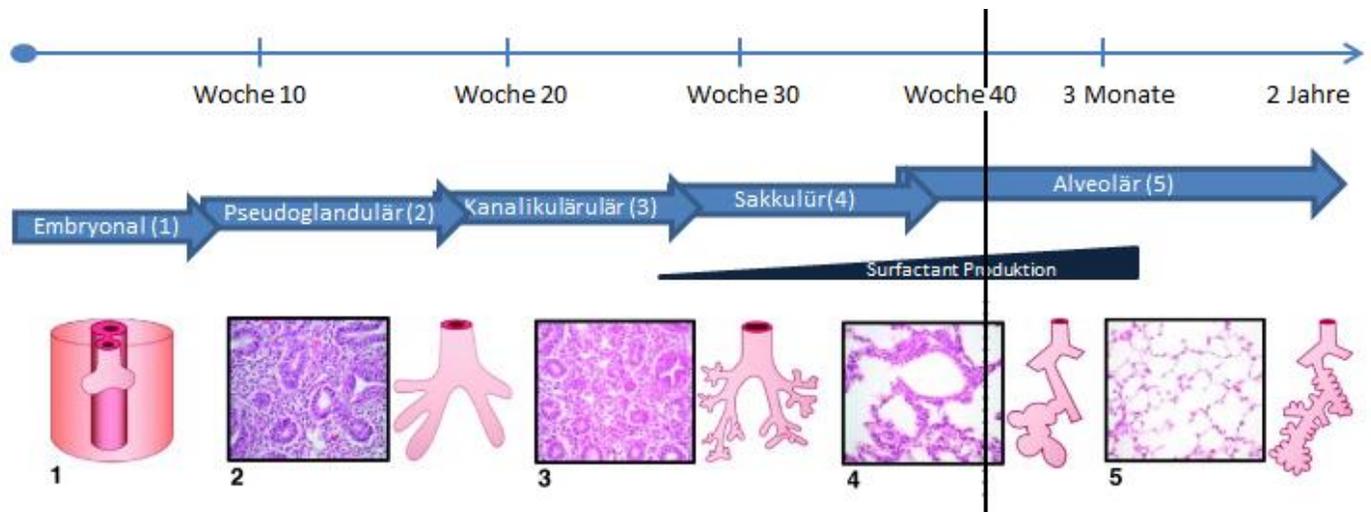


Abbildung 2: Phasen der Lungenentwicklung beim Menschen sowie der entsprechenden histologischen Aufnahmen des Lungengewebes und Illustration der Lungenanatomie. (Modifiziert nach Seaborn T et al. 2010).

1.6 Die GH/IGF-Achse

GH (Growth Hormone) ist ein Peptidhormon, das im Hypophysenvorderlappen (HVL) gebildet wird und zur Familie der somatotropen Hormone gehört. Seine Ausschüttung wird durch den Hypothalamus mit der Sekretion des Somatotropin-releasing Faktors (SRF, GHRH Growth-Hormone-Releasing Hormon, Somatoliberin) und des Somatostatins aus dem Pankreas reguliert. Über den HVL gelangt GH in den systemischen Blutkreislauf und wirkt endokrin an seinen Zielzellen zur Regulierung der Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF1) Sekretion (**Abbildung 3 A**).

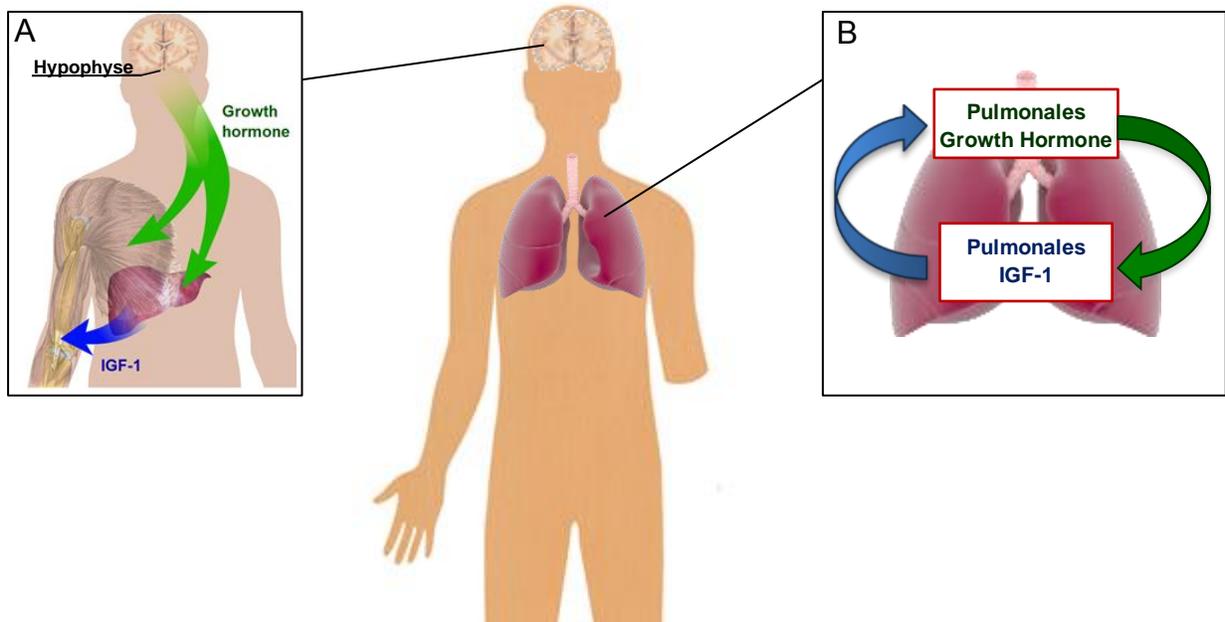
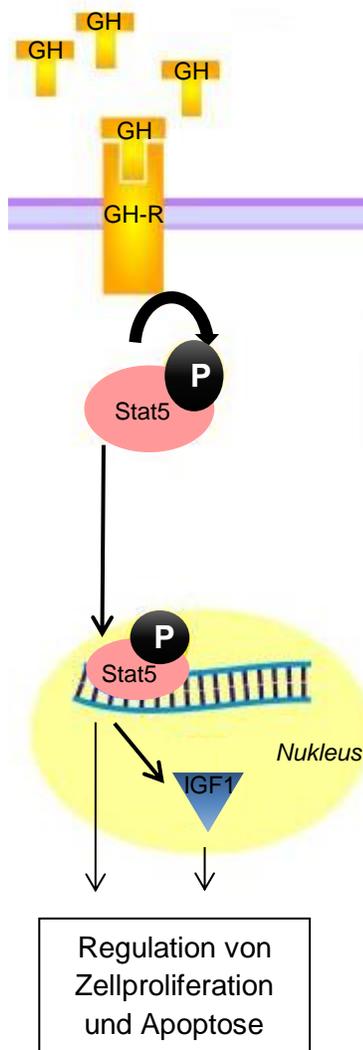


Abbildung 3: Schematische Darstellung der systemischen (A) und der pulmonal intrinsischen (B) Growth Hormone/Insulin-Like Growth Factor-Achse (GH/IGF). **A:** Die systemische GH/IGF-Achse wirkt durch die Freisetzung von GH aus der Hypophyse, insbesondere auf die IGF1 Stimulation in Leber und Muskelgewebe. **B:** Die pulmonal intrinsische GH/IGF-Achse wirkt unabhängig von der systemischen Achse nur in der Lunge (B). (Modifiziert nach M. Häggström, 2014)

An der Zielzelle wirkt GH über die Bindung an GH-Rezeptoren. Diese sind membranständige Rezeptoren mit Janus-Kinase-Aktivität (JAK). Die JAK Signalkaskade führt zu Phosphorylierungen von Transkriptionsfaktoren im Zytosol der Zielzelle. Zu den bedeutendsten Transkriptionsfaktoren zählen dabei die nicht-enzymatische Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT5 (*signal transducer of transcription*). Die aktivierten STAT-Proteine translozieren daraufhin in den Zellkern und steigern die IGF-Expression (44).

Ebenfalls im Fokus liegt ein MAP (*mitogen activating protein*)-Kinase-Weg, der multiple Gene für Wachstum, Inflammationsreaktion und Regulierung der ECM aktiviert. GH aktiviert somit direkt als auch indirekt Signalkaskaden in der Zielzelle für die Steuerung der Zellproliferation, -differenzierung und -migration sowie der Regulation von Apoptose (32,33) (**Abbildung 4**). Aus medizinischer Sicht wird dem GH vor allem Bedeutung in der Steuerung des longitudinalen Skelettwachstums während des Kinder- und Jugendalters zugeschrieben. Daneben steuert es viele wichtige metabolische Funktionen während des gesamten Alters, z.B. Fett-, Mineral- und Kohlenhydratstoffwechsel (46).



Das IGF-System besteht aus den drei Liganden Insulin, IGF1 und IGF2 und hat eine entscheidende Bedeutung für das Wachstum (47). Es gibt Hinweise aus murinen Tierversuchen, dass IGF2 hauptsächlich in der fetalen Periode wirkt (48,49). IGF1 wirkt hingegen vornehmlich im postnatalen Wachstum und wird maßgeblich durch die GH Sekretion gesteuert (50). Die partielle Strukturhomologie von IGF1 mit dem Hormon Proinsulin, macht es zu einem Insulin ähnlichen Polypeptid. Durch eine durch GH gesteuerte Aktivierung wird IGF1 in der Leber und extrahepatischen Organen, z.B. im Knochen und Muskel, synthetisiert (**Abbildung 3 A**). Dabei wird 80% des IGF1 im Serum von der Leber synthetisiert. Es wirkt vorwiegend parakrin, wird jedoch auch endokrin sezerniert und übt darüber einen negativen Feedback Mechanismus auf die GH-Sekretion aus (51).

Abbildung 4: Schematische Darstellung des intrazellulären Signalweges von Growth Hormone (GH). Bindung von GH an die extrazelluläre Einheit des GH-Rezeptors (GH-R) und Aktivierung der Janus-Kinase Signalkaskade. Phosphoryliertes STAT 5 (pSTAT5) transloziert in den Zellkern und steigert Insulin Growth Factor 1(IGF1) -Expression.

Mittels einer Gruppe von 6 Bindungsproteinen, den IGF-binding proteins (IGFBP 1-6), wird IGF1 zur Zielzelle transportiert (52). Dort bindet es an einen membranständigen Rezeptor, der dem Insulinrezeptor ähnlich ist. Es handelt sich um einen Typ-I-Rezeptor mit Tyrosinkinaseaktivität, der über eine Phosphorylierung des Insulinrezeptorsubstrates (IRS) eine Phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3 kinase) aktiviert. Diese wiederum phosphoryliert die Proteinkinasen Akt und Erk, die Transkriptionsfaktoren für eine gesteigerte Zellproliferation, -differenzierung und -migration sowie der Regulation von Apoptose aktivieren (39,40,41).

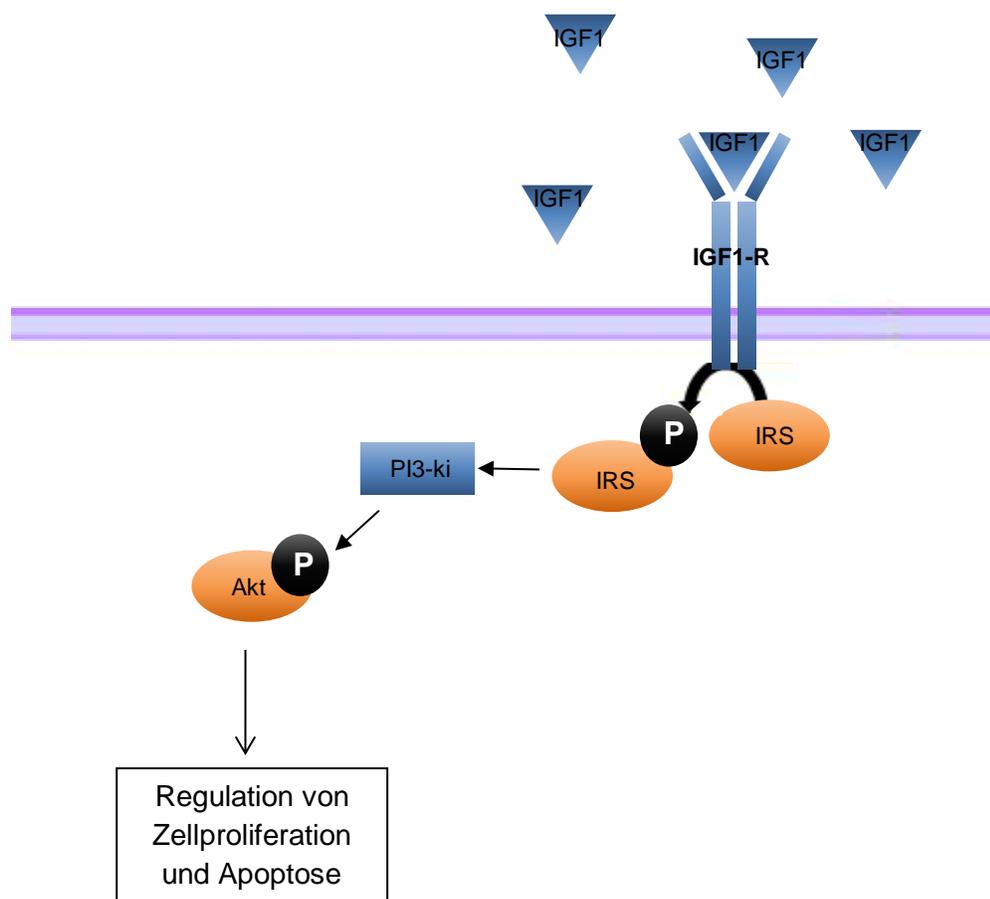


Abbildung 5: Schematische Darstellung des intrazellulären Signalweges von Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF1) über Akt. Bindung von IGF1 an die extrazelluläre Einheit des IGF1-Rezeptors (IGF1-R) mit Thyrosinkinaseaktivität, der über eine Phosphorylierung des Insulinrezeptorsubstrates (IRS) eine Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-ki) aktiviert. Diese wiederum phosphoryliert die Proteinkinase Akt, die Transkriptionsfaktoren für eine gesteigerte Zellproliferation, -differenzierung sowie der Regulation von Apoptose steuert.

Dass eine IUGR auch mit Veränderungen der GH/IGF-Achse beim Fetus einhergeht, zeigen sowohl Daten aus klinischen als auch aus tierexperimentellen Forschungen. Serumwerte Neugeborener mit IUGR zeigen niedrige Konzentrationen an IGF1, IGF2, IGFBP-3 sowie hohe Konzentrationen an GH und implizieren einen gestörten Feedback Mechanismus in der GH-IGF1-Achse (56,57). Die Auswirkung niedriger IGF1 Konzentrationen auf den menschlichen Körper belegen dabei Daten aus klinischen Studien zu kongenitalem Hormonmangel von IGF1: Diese Kinder wiesen unter anderem eine stark ausgeprägte IUGR, mentale Retardierung, Mikrozephalie sowie ein gestörtes postnatales Wachstum auf (58,59).

Ergänzend zeigen tierexperimentelle Forschungsarbeiten, wie z.B. die von *Fu Q et al.* (60), dass in IUGR-Ratten epigenetische Veränderungen im IGF1 Gen stattfinden. Es zeigen sich DNA-Methylierungen des Growth Hormone Response Elements (GHRE), einer Promotorsequenz für die Bindung von GH-Transkriptionsfaktoren im IGF1 Gen. Den Effekt einer Applikation von GH und IGF1 in IUGR Schaffeten demonstrieren Arbeiten, in denen IUGR Schaffeten intraamniotisch IGF1 appliziert wurde und diese mit einer signifikant erhöhten Wachstumszunahme reagierten (61). Die Supplementation von maternalem GH in die Plazenta trächtiger Schafe führte ebenfalls zu signifikant erhöhten Wachstumsraten und verbesserte das Körpergewicht und -länge. Dass es sich beim GH/IGF-System um ein höchst sensibles und genau gesteuertes Gefüge handelt, beweist z.B. das Auftreten von hydrocephalen Hirnläsionen in den Schaffeten nach maternaler GH-Applikation (62).

1.7 Intrinsisches GH/IGF-System der Lunge und IUGR

Es konnte für das Wachstumshormon GH sowie für IGF1 eine lungenspezifische Expression mit auto- und parakriner Wirkung gezeigt werden (60,61): Experimentelle Studien haben eine GH-Expression in der Lunge von perinatalen und neonatalen GH-R *knockout* Mäusen nachgewiesen (63). Somit ist die Bildung von GH nicht nur auf den Hypothalamus beschränkt, sondern zeigt auch eine lungenspezifische autokrine und/oder parakrine Wirkung (63,65) (**Abbildung 3 B**). Auch IGF1 und IGF2 scheinen neben GH in der Lunge exprimiert zu werden (66,67). Experimentelle Arbeiten mit IGF2-

defizienten Mäusen zeigen dicker ausgebildete Alveolarsepten sowie eine verschlechterte Struktur der Alveolen (68). Ergänzend gibt es Ergebnisse zu IGF1-R-*knockout* Mäusen, die aufgrund von respiratorischer Insuffizienz nicht überlebensfähig waren und kurz nach der Geburt verstarben (30). Die dabei zugrundeliegenden Pathomechanismen und die intrazellulären Signalwege sind bislang nicht ausreichend beschrieben. Klinische Studien belegen verstärkt die wichtige Rolle von IGF1 in der Lunge. So zeigen Lungenfunktionsuntersuchungen von Männern im Alter von 25 bis 85 Jahre mit einer Akromegalie, neben erhöhten IGF1-Spiegeln, ein erhöhtes Lungenvolumen (69).

Ein in der Literatur vielfach zitiertes sowie auch validiertes und etabliertes Tiermodell, ist die Induktion der IUGR durch Proteinmangeldiät des Muttertieres während der gesamten Gestation. Angelehnt an die mütterliche Unterernährung während der späten Schwangerschaft beim Menschen, erhalten die trächtigen Muttertiere eine isokalorische Proteinmangeldiät (41,70). So konnte bereits in tierexperimentellen Studien gezeigt werden, dass eine IUGR zu Änderungen in der Entwicklung der Lungenstruktur sowie zu einer verringerten Expression von Surfactantlipiden während der postnatalen Phase führt (24). Eine Dysregulation der Expression von IGF1, IGF2 sowie der IGFBP in der Leber und der Lunge konnten ebenfalls nach IUGR nachgewiesen werden (15,29,24). Da die IGF1-Expression ein Indikator der GH-Aktivität ist, konnte auch für GH eine Dysregulationen mit eingeschränkter Lungenfunktion gezeigt werden (67). Die wichtige regulative Rolle des IGF-Systems bei der intrauterinen Lungenentwicklung und fetalen Lungenreifung wurde bereits in mehreren experimentellen Arbeiten nachgewiesen und ihre verminderten Konzentration im Serum als ein tragender Faktor für die Entstehung einer IUGR diskutiert (20,68). Doch Bislang gibt es relativ wenige Studien zu den molekularen Konsequenzen dieser endokrinen Dysregulation sowie ihrer funktionellen Bedeutung in der postnatalen Entwicklung von wachstumsrestringierten Nachkommen nach IUGR (71).

2. Zentrale Hypothese und Arbeitsprogramm

2.1. Hypothese

Eine wichtige Gruppe von Wachstumshormonen, die in der Regulierung von Organwachstum und -entwicklung eine zentrale Rolle spielen, ist das GH/IGF-System. Da bereits eine Störung in der GH/IGF-Achse sowohl mit IUGR als auch mit einer Lungenfunktionseinschränkung assoziiert werden konnte und beide Hormone als Wachstumsfaktoren gelten, liegt es nahe, ihre funktionelle Rolle in der Lunge nach IUGR zu analysieren.

Die **zentrale Hypothese** dieses Projektes ist daher, dass IUGR zu einer Dysregulation des intrinsisch-pulmonalen GH/IGF-Systems führt. Dies stellt einen potentiellen molekularen Mechanismus in der Entstehung von IUGR-assoziierten Lungen-erkrankungen dar, die mit einer gestörten Lungenfunktion und -entwicklung einhergeht. Ziel des Projektes ist es daher, die genaue Rolle des GH/IGF-Systems und den Einfluss auf Fibroblasten in der Lunge nach IUGR zu untersuchen, um letztlich potentielle Angriffspunkte für Therapie- bzw. Präventionsansätze zu finden (**Abbildung 6**).

Folgende spezifischen Ziele liegen dem Projekt zur Überprüfung der Hypothese zugrunde:

(1) Unterschung des Expressionsprofils des GH/IGF-System in der gesunden späten Lungenenwicklung sowie nach IUGR in Ratten.

(2) Analyse des Einflusses von Mangelernährung als Modell der IUGR *in vitro* auf das GH/IGF-System.

(3) Charakterisierung der funktionellen Rolle des GH/IGF-Systems *in vitro* mittels Fibroblasten.

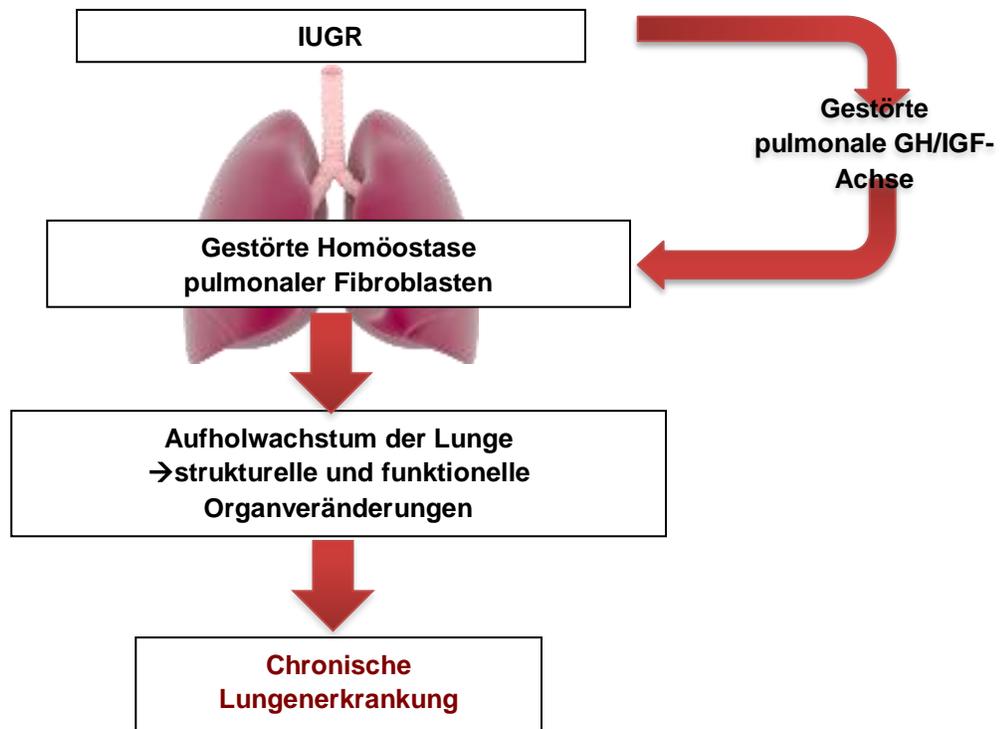


Abbildung 6: Schema zur möglichen Bedeutung des pulmonal intrinsischen Growth Hormone (GH)/ Insulin Like Growth Factor (IGF) GH/IGF-Systems der Lunge in der Pathogenese der Intrauterinen Wachstumsrestriktion (IUGR) assoziierten Lungenerkrankung. IUGR führt durch eine gestörte pulmonale GH/IGF-Achse zur einer gestörten Homöostase pulmonaler Fibroblasten. Postnatal reagiert die Lunge mit einem Aufholwachstum, das zu strukturellen und funktionellen Organveränderungen führt und im späteren Leben mit chronischen Lungenerkrankungen einhergeht.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verwendete Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Gerät		Firma, Sitz
Zentrifuge	Rotina 420R Micro Centrifuge Model SD	Hettich, Tuttingen, Deutschland
Mikroplattenleser	Centrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Absorptionsmessgerät	Nano Quant infinite M200 Pro (Software: I-Control 1.7 software)	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Vortexer	Vortex K1 plus	Kisker, Steinfurt, Deutschland
Thermozykler	7500 Real Time PCR System (Software: 7500 Software v 2.0.5)	Applied Biosystem, Forster City/Kalifornien, USA
Wasserbad	WNB	Memmert, Schwabach, Deutschland
Imager	Molecular Image®ChemiDoc™XRS	Bio-Rad, Hercules/Kalifornien, USA
Taumel-Schüttler	Duomax 1030	Heidolph, Schwabachm Deutschland
Homogenisator	Sonoplus SH 70 G	Bandelin, Berlin, Deutschland
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Folienschweißgerät	Severin Folio	Severin, Sundern, Deutschland
Doppelgel-Elektrophorese System	PerfectBlue™Twin	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Semi-Dry Elektrobloetter	PerfectBlue™	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Power Supplies	PEQLAB Power Supply EV231	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Laborwaage	CPA Laborwaage	Satorius, Göttingen, Deutschland
Pipettierhilfe	Easypet Pipettierhilfe	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Brutschrank	HERAcell 150i CO2 Incubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts, USA
Inkubator	Heraeus Incubator Typ UB 20	Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts, USA
Sterilisator	UV Statalinker 2400	Strategene Corp., San Diego/Kalifornien, USA
Absaugflasche (Zellkultur)	HLC Ditabis	Pforzheim, Deutschland
Zellkulturarbeitsbank	BS48 Techniplast S.P.A	Buguggiate, Italy

3.1.2 Arbeits- und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Arbeits- und Verbrauchsmaterialien

Arbeits- und Verbrauchsmaterialien	Firma, Sitz
Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems, Foster City/Kalifornien, USA
MicroAmp® Adhesive Film Applicator	Applied Biosystems, Foster City/Kalifornien, USA
Parafilm M	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Perfect BlueDoppelgelsystemTwin S (Für große Gele)	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Perfect BlueDoppelgelsystemTwin S (Für kleine Gele)	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Cast-it Gelgießstand	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Glasplatte	PeqLab, Erlangen, Deutschland
PVDF, Porgengröße 0,45µm	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Blotting Paper Sheets	Satorius, Göttingen, Deutschland
Mikrotiterplatten-Verschließroller	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Mikrolöffel	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Peha-soft Nitrile U-Handschuh	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Peha-soft Nitrile fino U-Handschuh	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Einmalpipette einzeln steril	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Kapillarspitzen 200 µl	Biozym, Oldendorf, Deutschland
Eppendorf Comitips plus 2,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Comitips plus 5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
0,1-10 µl epT.I.P.S. LoRetentionDualfilter, Racks	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
0,5-20 µl epT.I.P.S. LoRetentionDualfilter, Racks	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Pipettenspitzen 20µl, 200µl 1000µl nicht gestopft	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Sarstedt-Lagerkästen mit Raster (für 1,5/2 ml Gefäße)	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Sarstedt-Lagerkästen mit Raster (für 0,5 ml Gefäße)	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Falcons 15 ml	BD Falcon, Franklin Lakes/New Jersey, USA
Reaktionsgefäße 0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Serologische Pipette 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Spacer 1,2 cm	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kamm 15 Zähne, 1,0 mm	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kamm 20 Zähne, 1,0 mm	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Filterspitzen	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Mini-Mörser	Roth, Karlsruhe, Deutschland

3.1.3 Chemikalien, Medien und Reagenzien

Tabelle 3: Chemikalien, Medien und Reagenzien

Produkt	Firma, Sitz
TriReagent	Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri, USA
BCA Protein Assay	Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts, USA
Dnase I, Rnase free (inklusive 10x Reaktionspuffer und EDTA-Stopplösung)	Promega, Fitchburg/Wisconsin, USA
5 mM dNTP Mix with dUTP	Eurogentec, Lüttich, Belgien
Hot Gold Star 5 U/ml	Eurogentec, Lüttich, Belgien
MMLV (reverse Transkriptase) inklusive Puffer	Promega, Fitchburg/Wisconsin, USA
Proteinmarker IV (10-170 kDa)	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Randomprimer	Roche, Basel, Schweiz
Rnasin Ribonuclease Inhibitor	Promega, Fitchburg/Wisconsin, USA
Taq DNA Polymerase	Invitrogen, Carlsbad/Kalifornien, USA
TaqMan reaction kit	Eurogentec, Lüttich, Belgien
Uracil-N-Glycosylase UNG – Enzym	Eurogentec, Lüttich, Belgien
ROX passive reference	Eurogentec, Lüttich, Belgien
M-MLV Buffer Pack	Promega, Fitchburg/Wisconsin, USA
RQ1 RNase-Free DNaseI	Promega, Fitchburg/Wisconsin, USA
PlatinumTaq DNA Polymerase	Invitrogen, Carlsbad/Kalifornien, USA
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Acrylamide Mix Gel 30 (Rotiphorese)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Albumin Bovine Serum WB	PAA, Pasching, Österreich
Ammoniumpersulfat	Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri, USA

Aprotinin	Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri, USA
Bovine Serum Albumin Fraktion V pH 7	PAA, Pasching, Österreich
Bromphenolblau Natrium-Salz	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland
ECL Plus Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare, Little Chalfont, England
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic)	Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri, USA
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol vergällt 99,8%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol	Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri, USA
Glycin, Elpograde	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchloridlösung 3	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Leupeptin 1 mg/ml	Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri, USA
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol rein	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumfluorid	Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri, USA
Natriumorthovanadat 200 mM	Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri, USA
Natronlauge, mind. 32 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Nonidet P40 (IGEPAL® CA-630)	Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri, USA
Pierce Western Blot signal enhancer	Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts, USA
Propanol 99,8% RNA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure 1N	Merck, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure 32 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
SDS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Temed	Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri, USA
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TriReagent	Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri, USA
Wasserstoffperoxid 30 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Collagenase Typ I, 280 U/mg	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, USA
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts, USA
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri, USA
Corning Dispase 100 ml	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Phosphate Buffered Saline (PBS) buffer GIBCO 10x, pH7,4	Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts, USA
Tissue Culture Dish, 60x15 mm	Sarstedt Group, Deutschland
Tissue Culture Dish, 100x20 mm	Sarstedt Group, Deutschland
Zellsieb 70 µm	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland

Tissue Culture Plate 24-Well Flat Bottom Cell	Sarstedt Group, Deutschland
Neubauer Hämocytometer, Zählkammer-Tiefe: 0,1mm, Kleinstquadratgröße: 0,0025mm ²	Marienfeld, Deutschland
Trypanblau-Färbelösung 0,4%	Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts, USA
Trypsin-EDTA Solution	Sigma Aldrich, St. Louis/Missouri, USA
Growth Hormone	Cat# 869008; Calbiochem, USA
Insulin Like Growth Factor	Product Number I 8779, Sigma-Aldrich, USA
IGF1 Mouse ELISA Kits (ab100695)	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich

3.1.4 Puffer und Stammlösungen

Tabelle 4: Puffer und Stammlösungen

Transferpuffer (Towbin-Puffer) 10x

- 0,25 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)
- 2 M Glycin
- zum Blotten 20 % Methanol in 1x Puffer

Laufpuffer (Lämmli-Puffer) 10x

- 0,25 M Tris
- 2 M Glycin
- 1 % Sodium dodecyl sulfate (SDS)

Sammelgel (pH 6,8)

- 4 % Acrylamid
- 0,16 M Tris hydrochloride (Tris/HCL)
- 0,1 % SDS
- 0,1 % Ammonium Persulfate (APS)
- 0,004 % Tetramethylethylenediamin (TEMED)

Trenngel (pH 8,8)

- 8-12 % Acrylamid
- 0,26 M Tris/HCL
- 0,1 % SDS
- 0,1 % APS
- 0,004 % TEMED

TBS (Englisch für *Tris-buffered saline*, TBS)-Polysorbate 20 (Tween)

- TBST-Puffer: 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 500 mM NaCl; 0,1 % Tween 20 (v/v)
- Destilliertes Wasser (*Aqua dest.*)
- Tween
- TBS-Puffer (Englisch für *Tris-buffered saline*, TBS)

Radioimmunoprecipitationspuffer (Ripa-Puffer)

- Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) 200 mM (Lagerung bei 4 °C, ca. 9 Monate in Isopropanol)
- Leupeptin 1 µg/µl in *Aqua dest.*
- Aprotinin 5 µg/µl in *Aqua dest.*
- Pepstatin A 1,5 µg/µl in Methanol
- Natriumorthovanadat (Na₃VO₄) 200 mM in *Aqua dest.*
- Natriumfluorid (NaF) 200 mM in *Aqua dest.*

Trennpuffer (Stripping Puffer) pH 6,7

- 0,05 M Tris
- 2 % SDS
- 0,7 % β-Mercaptoethanol

3.1.5 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden mit der Primer Express Software (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA) entwickelt und die Primer bei MWG Eurofins synthetisiert.

Tabelle 5: Die zur TaqMan real-time PCR verwendeten Primer und Sonden.

Primer	Orientierung	Sequenz (5'-3')
<i>rat</i> β Actin	taq (Probe) forward reverse	5'(FAM)-CAC TAT CGG CAA TGA GCG GTT CCG-(TAMRA)3' 5'-TGA GCT GCC TGA CGG TCA G-3' 5'-TGC CAC AGG ATT CCA TAC CC-3'
<i>rat</i> GH	taq (Probe) forward reverse	5'(FAM)-TCTGCTTCTCAGAGACCATCCCAGCC-(TAMRA)3' 5'-GGACAGCGCTATTCCATTCAG-3' 5'CGAAGCAATTCCATGTCAGTTCT-3'
<i>rat</i> GH-R	taq (Probe) forward reverse	5'(FAM)-AAAACGATGAGCCCGATATGGTCAACATC-(TAMRA)3' 5'-GGGATGGATAATTCTGGAGTATGAA-3' 5'-TCGTGCTCTTTATCCAGTCTCAGT-3'
<i>rat</i> IGF1	taq (Probe) forward reverse	5'(FAM)-CCTTTACCAGCTCGGCCACAGCC-(TAMRA)3' 5'-CTACCTGGCACTCTGCTTGCT-3' 5'-TGGTCCACACACGAACTGAAG-3'
<i>rat</i> IGF2	taq (Probe) forward reverse	5'(FAM)-TGTTGGTGCTTCTCATCTCTTTGGCCTT-(TAMRA)3' 5'-CCGGCTTCCAGGTACCAAT-3' 5'-GCAGCGATGCAGCACAAG-3'
<i>rat</i> IGF1-R	taq (Probe) forward reverse	5'(FAM)-ATCAGTTTCACAGTCTACTACAAGGAGGCAC-(TAMRA)3' 5'-CCTGGAAGAACCGCATCATC-3' 5'-CCGTGCTATTCCGTGACGTT-3'
<i>rat</i> Insulin-R	taq (Probe) forward reverse	5'(FAM)-ACCTCAGTGCCAGTGATGTCTTCCATCTT-(TAMRA)3' 5'-ACCACTGTACGCTTCTTCAAACC-3' 5'-CCCCTCATCCGGAACGTAT-3'
<i>rat</i> Collagen1α1	taq (Probe) forward reverse	5'(FAM)-CAAGGCTGCAACCTGGATGCCATC-(TAMRA)3' 5'-AGAGCGGAGAGTACTGGATCGA 5'-CTGACCTGTCTCCATGTTGCA-3'

* *rat* Englisch für Ratte

Tabelle 6: Die zur SYBR-Green real-time PCR verwendeten Primer.

Primer	Orientierung	Sequenz (5'-3')
<i>rat</i> Elastin	forward reverse	GAAAACCCCGAAGCCCT CCCCACCTTGATATCCCAGG
<i>rat</i> Fibrillin	forward reverse	TGCTCTGAAAGGACCCAATGT CGGGACAACAGTATGCGTTATAAC

3.1.6 Verwendete Antikörper für das Western Blot Verfahren

Tabelle 7: Verwendete Antikörper für das Western Blot Verfahren.

Primär-AK	kDa	Verdünnung in	Sekundär AK Verdünnung in Milch	Firma
Akt (Protein Kinase B)	60kDa	1:2000 in BSA	1:2000	Cell Signaling, Danvers/Massachusetts, USA
βActin	34 kDa	1:2000 in Milch	Mouse 1:2000	Cell Signaling, Danvers/Massachusetts, USA
Caspase	35 kDa	1:1000 in Milch	Mouse 1:2000	Cell Signaling, Danvers/Massachusetts, USA
cleaved Caspase	17, 19 kDa	1:1000 in Milch	Mouse 1:2000	Cell Signaling, Danvers/Massachusetts, USA
Cyclin D1	36 kDa	1:200 in Milch	Mouse 1:1000	Santa cruz Biotechnology
GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)	37 kDa	1:3000 in Milch	α-Rabbit 1:3000	Cell Signaling, Danvers/Massachusetts, USA
GH-R (GH-Rezeptor)	72kDa	1:200 in BSA	α-Rabbit 1:500	Abcam, Cambridge, United Kingdom
IGF1-R (IGF1-Rezeptor)	95 kDa	1:000 in BSA	1:2000	Cell Signaling, Danvers/Massachusetts, USA
Insulin-R (Insulin-Rezeptor)	95kDa	1:000 in BSA	1:2000	Cell Signaling, Danvers/Massachusetts, USA
STAT5 (Signal transducer and activator of transcription)	90 kDa	1:000 in BSA	1:2000	Cell Signaling, Danvers/Massachusetts, USA
pAkt (phosphorylierte Protein Kinase B)	60kDa	1:000 in BSA	1:2000	Cell Signaling, Danvers/Massachusetts, USA
PCNA (Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen)	36 kDa	1:20000	Mouse 1:2000	Dako, Glostrup Denmark
pSTAT5 (phosphoryliertes STAT5 Protein kinase B)	90kDa	1:000 in BSA	1:2000	Cell Signaling, Danvers/Massachusetts, USA

3.2 In vivo

3.2.1 Das Tiermodell - Induktion der intrauterinen Wachstumsrestriktion

Im vorliegenden Projekt ging es darum, die möglichen Effekte einer intrauterinen Wachstumsrestriktion auf die Entwicklung der Lunge zu untersuchen. Die Versuche fanden in der Arbeitsgruppe für fetale Programmierung und experimentelle Pneumologie der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin der Uniklinik Köln statt und waren zu Beginn der vorliegenden Arbeit bereits abgeschlossen. Da eine Beschreibung des Tierversuches für ein besseres Verständnis der Arbeit hilfreich ist, folgt im Kurzen eine Schilderung des Versuchmodells: Alle tierexperimentellen Verfahren wurden nach den Richtlinien der Bundesregierung Deutschland und den Bezirksregierungen Mittelfranken und Köln durchgeführt (Regierung von Mittelfranken, AZ: 54-2531.31-14/05 and AZ: 54-2532.1-31/09; LANUV Nordrhein-Westfalen AZ: 2012.A316, 87-51.04.201/A372 and 84-02.04.2015/A120). Tragende Wistar Ratten wurden in Einzelhaltungen bei einem künstlichen Tag/Nacht-Rhythmus von 12h/12h und bei konstanten 22 Grad Celcius gehalten. Ein gut etabliertes Verfahren zur Induktion einer IUGR ist die Fütterung der Muttertiere mit einer proteinarmen Nahrung, einer Proteinmangeldiät (PMD) oder *low-protein diet* (LP). Dazu erhielten die trächtigen Muttertiere mit Beginn der Schwangerschaft Nahrung mit einem Proteinanteil von 8%. Eine Vergleichsgruppe erhielt im Vergleich dazu eine Kontrolldiät mit 17% Protein (**Abbildung 7**). Die Nahrung stammte von der Firma Altromin [C1000 (*normal-protein-diet*, 17% Protein), C1003 (*low-protein-diet*, 8% Protein)] und C1320 (Standard-Diät) für die postnatale Phase]. Die Geburt der Ratten verlief spontan am Tag 23 der Schwangerschaft (E23). Entsprechend der Fütterung während der Schwangerschaft wurden die Tiere als Co (Kontrollgruppe, *normal-protein diet*) und IUGR (*low-protein diet*) Ratten definiert. Um eine beschleunigte postnatale Gewichtszunahme [postnataler Tag 1 (P1) bis P23] und ein postnatales Aufholwachstum nach IUGR zu induzieren, wurde die Wurfgröße auf 6 Tiere reduziert. Während der Laktation (P1-P23) erhielten beide Versuchsgruppen Standardfutter. Das Absetzen erfolgte am P23.

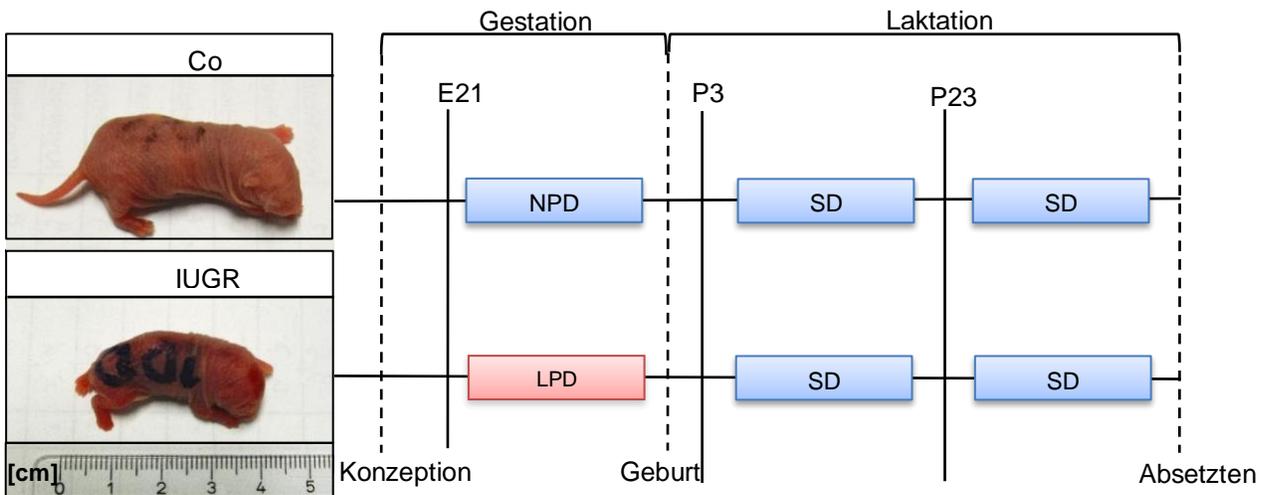


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Tierversuchsmodells zur Induktion einer Intrauterinen Wachstumsrestriktion (IUGR) durch Proteinmangeldiät (PMD) in Ratten. Die trächtigen Muttertiere erhielten während der Schwangerschaft Nahrung mit einem Eiweißanteil von 8% [C1003 (*low-protein diet*; LPD)] der Firma Altromin. Eine Vergleichsgruppe erhielt im Vergleich dazu 17% Protein [C1000 (*normal-protein diet*; NPD)]. Die Geburt der Ratten verlief spontan am postnatalen Tag 23 (P23) der Schwangerschaft. Während der Laktation erhielten sämtliche Würfe Standardfutter (SD). Das Abstillen erfolgte am P23.

IUGR- und Kontrolltiere wurden an E21 sowie an P3 und P23 getötet; nachfolgend wurde die Lungen entnommen. Die Nachkommen wurden unmittelbar vor der Organentnahme gewogen und gemessen. Um die Rattenfetten an E21 zu gewinnen, wurden die Muttertiere getötet und die Feten wurden sofort per Kaiserschnitt entnommen. Um die postnatale Entwicklung der Lunge zu untersuchen, wurden die Nachkommen bei P3 und P23 getötet. Für die postnatalen Stadien wurden nur männliche Nachkommen verwendet. Für die embryonale Phase wurden männliche und weibliche Ratten verwendet. E21: n = 8-12 / Gruppe aus 2 Würfen; P3: n = 8 / Gruppe 5-6 Würfe; P23: n = 14 / Gruppe 4-7 Würfe. Für die spezielle Fragestellung dieser Arbeit wurden zusätzlich pulmonale Fibroblasten am Tag P3 aus den Lungen männlicher Ratten isoliert und wird im Kapitel *in vitro* (Punkt 3.3) näher erläutert.

3.2.2 Lungenaufbereitung

Die Lungen wurden *in toto* entnommen und in flüssigem Stickstoff für die mRNA und Proteinanalyse an E21, P3, und P23 für die molekulare / biochemische Untersuchungen schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.3 DNA Untersuchungen mittels real-time PCR

3.3.1 mRNA Isolation und real-time PCR

Im weiteren Verlauf wurde die Gesamt-RNA aus unfixiertem Lungengewebe mithilfe von TRIzol TriReagent (Tabelle 3) isoliert. Zum Lungengewebe wurde jeweils 1 ml TRIzol hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben in einer Gewebsmühle mit Hilfe von Metallkugeln für 20 Sekunden bei 30 Hz homogenisiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Darauffolgend wurden die Proben jeweils mit 200 µl Chloroform versetzt, 1550 Sekunden gemischt und danach 2-3 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend erfolgte der erste Zentrifugationsschritt bei 12000 U/min und 4 °C. Hierbei lässt sich die Entstehung von drei Phasen beobachten. In der oberen, wässrigen Phase, ist die RNA enthalten. Darunter folgt die DNA-haltige Interphase. Die untere der drei Phasen enthält die Proteine. Die oberste Phase wurde abgenommen und je in ein 2 ml Gefäß mit Isopropanol überführt. Nun wurden die Proben auf Eis inkubiert und bei 12000 U/min zentrifugiert. Hierbei bildete sich ein RNA-*Pellet*. Es erfolgte die RNA-Waschung mit 1 ml 75 % Ethanol in RNase freiem Wasser pro Ansatz. Daraufhin wurden die Proben erneut für 5 Minuten bei 15000 U/min und 4 °C zentrifugiert und die Pellets wurden für ca. 30 Minuten getrocknet. Abschließend wurden die *Pellets* mit jeweils 50 µl RNase freiem Wasser gelöst und bei -80 °C zur weiteren Nutzung aufbewahrt.

3.3.2 Umschreibung von mRNA in doppelsträngige cDNA

Zuvor wurden die untersuchten Proben in Reinheit und Konzentration mit dem Nano Quant infinite M200 Pro und der dazugehörigen Software gemessen und ausgewertet. Als erster Schritt erfolgte ein DNA-Verdau unter DNase-Verwendung, um eventuell vorhandene genomische DNA zu entfernen. Hierzu wurden pro Ansatz 1 µl von dem 10x DNase I Puffers und der RQ1 RNase-Free DNase I zu der RNA pipettiert. Die Ansätze wurden 15 Minuten bei RT inkubiert. Zur Inaktivierung der DNase wurde anschließend 1 µl EDTA Stop Solution (25 mM) zu den Proben beigefügt und für 15 Minuten bei 65 °C erwärmt. Jetzt wurde ein Gemisch aus 0,6 µl Randomprimer (0,5µg/µl), 0,4 µl Oligo-dT- primer (0,5 µg/µl) und 4 µl Aqua dest. beigefügt und für 5 Minuten bei 70 °C inkubiert. In diesem Zuge lagert sich der Oligo-dT-Primer an die Poly-A-Sequenz und der Random-Primer an eine unspezifische Region des mRNA Stranges an. Danach wurden die Proben

für 1 Minute auf Eis gestellt um eine fehlerfreie Funktion des im Anschluss hinzugefügten Enzyms (dNTP-Gemisch) zu ermöglichen. Ein Mix von 5 µl mMLV-buffer (5-fach), 1,25 µl dNTP-Gemisch (10 mM jeweils von dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 0,5 µl Rnase-Inhibitor (40 U/µl), 1 µl MMLV (200 U/µl) und 2.25 µl Diethyl pyrocarbonat (DEPC) *Aqua dest.* wurde zu der RNA beigemischt. Nun konnte der eigentliche Umschreibprozess während einer einstündigen Inkubation bei 37 °C erfolgen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20 °C aufbewahrt.

3.3.3 Durchführung der TaqMan real-time PCR

Zur Bestimmung der relativen mRNA-Expression der Proben kam das Kit der Firma Invitrogen zum Einsatz. Zum bereits vorgemischten PCR Super Mix der Firma Invitrogen wurden die restlichen Bestandteile (*Aqua dest.*, *forward* und *reverse* Primer, Sonde) entsprechend der Anleitung des Herstellers hinzugefügt, so dass letztendlich ein Gesamtvolumen von 25 µl pro Ansatz vorlag. Zu 12,5 µl Platinum Supermix wurden 8,5 µl destilliertes Wasser hinzugefügt. Anschließend wurden 0,5 µl von der Sonde (2 µmol/l, Endkonzentration 200 nmol/l) und jeweils 0,5 µl von dem *forward* und *reverse* Primer (6 µmol/l, Endkonzentration 600 nmol/l) beigefügt. Daraufhin wurde der Mix ebenfalls auf die Reaktionsplatte aufgeteilt und 2,5 µl cDNA hinzugegeben. Die Proben wurden für 3 Minuten bei 1200 rpm und 20 °C zentrifugiert und in den Thermozykler eingesetzt. Die Gesamt-RNA wurde für die in Tabelle 6 aufgeführten Gene analysiert.

3.3.4 Durchführung der SYBR green I real-time PCR

Zur Amplifizierung wurde mit dem SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix der Firma Invitrogen (Carlsbad/Kalifornien, USA) gearbeitet. Pro Reaktionsansatz wurden 12,5 µl IQ SYBR Supermix, 5,5 µl destilliertes Wasser und jeweils 0,5 µl von dem *forward* und *reverse* Primer zugefügt (10 µmol/l, Endkonzentration 250 nM). Zu jedem Reaktionsansatz wurde 1 µl cDNA pipettiert, so dass es ein Endvolumen von 20 µl pro Well vorlag. Abschließend wurden die Proben für 3 Minuten bei 1200 rpm und 20 °C zentrifugiert sowie in den Thermozykler eingesetzt. Die Oligonukleotide für die vorbestimmten Gene wurden mithilfe der Primer Express® Software Version 3.0 (Applied Biosystems, Forster City/Kalifornien, USA) gestaltet. Hierbei wurde nach einheitlichen und standardisierten Auswahlkriterien vorgegangen. Zusätzlich wurden sie mithilfe der

Internetdatenbank des *National Center for Biotechnology Information* zur Qualitätskontrolle überprüft und abhängig von dem gegebenen Score- und E-Value-Wert ausgewählt. Die Gesamt-RNA wurde für die in Tabelle 7 aufgeführten Gene analysiert. Die Menge der spezifischen mRNA in den Proben wurde in Relation zu den konstitutiv exprimierten Genen (Kontrollgene oder *housekeeping genes*) Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Hypoxanthine-guaninephosphoribosyl-transferase (HPRT) und β -Actin gesetzt. Die Ergebnisse der real-time RT-PCR wurden basierend auf der delta-delta-CT Methode berechnet. Die Induktion von mRNA (*fold induction of mRNA*) im Verhältnis zur entsprechenden Kontrollgruppe, Co, (1,0-fache Induktion) gesetzt.

3.4 Proteinnachweis mittels Western Blot

3.4.1 Proteindetektion

Zur Proteinextraktion wurde jeweils gefrorenes unfixiertes Lungengewebe verwendet und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Im nächsten Schritt wurde 5 ml RIPAPuffer (Tabelle 5) angesetzt. Das Gewebe wurde mit 200 μ l RIPA Puffer versetzt. Der restliche Puffer wurde für die anschließende Proteinbestimmung sowie für die Herstellung der Verdünnungsreihe aufbewahrt. Die Proben wurden mit einem Mini-Mörser zerkleinert und anschließend in drei wiederholenden Zyklen für 20 Sekunden und bei 50 % der Energie sonifiziert. Falls noch kleine Gewebestücke sichtbar waren, wurde der Vorgang wiederholt. Danach wurden die Proben eine Stunde auf Eis inkubiert und für 5 Minuten bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C für weitere Verwendung aufbewahrt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach erfolgter Isolation das BCA Protein Assay Kit verwendet. Hierbei wurden in Doppelbestimmung Proben auf eine 96 Wells-Platte aufgetragen und anschließend mithilfe des Tecan Nano Quant infinite M200 pro berechnet.

3.4.2 SDS Page

Im Anschluß wurden die Proben auf einem reduzierenden 10% SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) Gel aufgetragen und auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Die Proteine wurden mit Hilfe der SDS-PAGE nach Laemmli entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Das Prinzip dieses Verfahrens ist es, auf ein Gel aufgetragene Proteine einem Spannungsfeld auszusetzen, in welchem sie abhängig von ihrer Größe und Ladung unterschiedlich weit in Richtung Pluspol wandern. Es wurde stets mit einem Konzentrationsgradienten innerhalb des Gels gearbeitet, wobei die unteren zwei Drittel des Gels zur optimalen Auftrennung der kleinen Proteine aus einem 10%igen Gel und das obere Drittel für eine gute Darstellung der größeren Proteine aus einem 8%igen Gel bestanden. Zur Optimierung der Probenvolumina und der Bandenschärfe wurde mit einem Sammelgel gearbeitet. Aufgetragen wurden je nach Blot 20µg oder 40µg Protein der jeweiligen Proben, die mit destilliertem Wasser jeweils auf eine Gesamtmenge von 10µl aufgefüllt wurden. Zur Stabilisierung des pH-Wertes der Proben und zur Ladung der Proteine sowie zur Markierung der Laufmittelfront wurden den Proben außerdem 2,5µl 5x Probenpuffer zugesetzt. Die so vorbereiteten Proben wurden bei 70°C für 10 Minuten aufgekocht und kurz abzentrifugiert. Die Gelelektrophorese lief in Lämmli-Puffer bei 80V durch das Sammelgel bis die Lauffront das Trenngel erreichte. Im Trenngel lief die Elektrophorese bei 120V bis die Lauffront das untere Ende des Gels erreichte.

3.4.3 Blotting

Zur Übertragung der Proteine aus dem Gel auf eine Membran wurde das Gel in einer Blotkammer auf eine 10x14 cm große Nitrozellulosemembran gelegt. Das Gel und die Membran wurden beidseitig in jeweils zwei 10x14 cm große Whatman-Papern (Filterpapier) eingebettet. Der Proteintransfer erfolgte bei 1,3mA/cm² mit ca. 300ml Transferpuffer (4°C kalter Towbin-Puffer mit 10% Methanol) über zwei Stunden.

3.4.4 Proteindetektion

Nach dem Proteintransfer wurde der Blot für 30 Minuten bei RT mit 5% Milch und 2% BSA in TBST blockiert. Die Blots wurden mit den in Tabelle 8 aufgeführten Antikörpern behandelt. Als Ladekontrolle wurden Maus-anti-Ratte-β-Actin und GAPDH

(Tabelle 8) aufgetragen. Die Blots wurden anschließend mit dem jeweiligen Primärantikörper für 30 Minuten bei RT und zusätzlich über Nacht bei 4°C inkubiert. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran dreimal für 10 Minuten mit TBST gewaschen und dann für eine Stunde bei RT mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Anti-Maus-IgG, (Cell Signaling, Danvers, MA, # 7076, 1: 2000) und Anti-Kaninchen-IgG (Cell Signaling, Danvers, MA, # 7074, 1: 2000) wurden als sekundäre Antikörper verwendet. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal 10 Minuten in TBST gewaschen. Entwickelt wurden die Blots mit Hilfe des ECL Prime Western Blotting Detecting Reagent mit dem Bio-Rad ImageLab Software (Bio-Rad, Munich, Germany).

3.4.5 Stripping

Um die Detektion weiterer Proteine auf derselben Membran zu ermöglichen, wurde der Blot nach der Entwicklung erneut dreimal in TBST für zehn Minuten gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 30 Minuten in Stripping-Puffer in einem 56°C warmen Wasserbad inkubiert, um die gebundenen Antikörper von der Membran zu lösen; danach wie üblich dreimal 10 Minuten in TBST gewaschen und dann für 90 bis 120 Minuten in TBST mit 5% Milch und 2% BSA bei RT blockiert. Nachfolgend wurde direkt der neue Primärantikörper auf den Blot gegeben und wie oben beschrieben fortgefahren.

3.5 ELISA

Für die Bestimmung der IGF1 Konzentration im Rattenserum wurde das Serum aus IUGR- und Kontrolltieren an P3 und P23 mittels des Kits der Firma Abcam analysiert. Dazu wurde das Serum aufgetaut und für zwei Stunden bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 2000g für 15min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einem Verdünnungspuffer im Verhältnis 1:100 verdünnt. Aus dem verdünnten Serungemisch wurde eine Verdünnungsreihe aus sechs unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt. Die 96 Vertiefungen der Mikrotiterplatte sind mit einem IGF1-Antikörper beschichtet. Dazu wurde das Serum aufgetaut und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 2000g für 15min zentrifugiert. Es folgte das Pipettieren der IGF1-Standards A-E (IGF1 in Proteinpuffer [BSA]) in den Konzentrationen von 1000 pg/ml; 500pg/ml; 250 pg/ml; 125 pg/ml; 62,5 pg/ml), der Kontrolle 1 (niedrige

IGF1-Konzentration) und Kontrolle 2 (hohe IGF1-Konzentration), sowie des vorbehandelten Probenmaterials in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte. Dabei wurden je 20 µl des Materials in zwei Vertiefungen einbracht, um Doppelbestimmungen zu erhalten. Anschließend wurden 100 µl Assay-puffer (Proteinpuffer [BSA]) in jede Vertiefung gegeben und für 90min bei 37°C inkubiert. Die Lösung wurde aus den Vertiefungen verworfen und die Platte auf Fließpapier trocken geklopft. Es folgte die Zugabe von 100 µl Antikörper-Enzym-Konjugat in jede Vertiefung und eine Inkubation für 60 min bei 37°C. Die Platte wurde anschließend dreimal mit 300 µl Waschlösung PBS gewaschen und auf Fließpapier trocken geklopft. Danach wurden 100 µl ABC Working solution in jede Vertiefung gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Lösung wurde aus den Vertiefungen verworfen, die Platte auf Fließpapier trocken geklopft und fünfmal mit 300 µl Waschlösung PBS gewaschen. Danach wurden 90 µl Chromogenlösung in jede Vertiefung gegeben und für 20-25min bei 37°C auf einem Horizontalschüttler in Dunkelheit inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen wurde 90 µl Stopplösung in jede Vertiefung pipettiert. Es zeigte sich eine gelbe Färbung. Die Absorption der Lösung wurde nach 30 min mithilfe des Tecan Nano Quant infinite M200 pro bei 450 nm gemessen und die Konzentrationen berechnet.

3.6 Zellkulturversuche

In den *in vitro* Versuchen wurde mit folgenden zwei Zellreihen gearbeitet (**Abbildung 8**):

(1) *Mouse embryonic fibroblasts* (MEF, Englisch für embryonale Fibroblasten aus der Maus) [Diese wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Benzing und Schermer, Uniklinik Köln zur Verfügung gestellt.]

(2) Primäre neonatale pulmonale Fibroblasten (pnpF) aus der Ratte

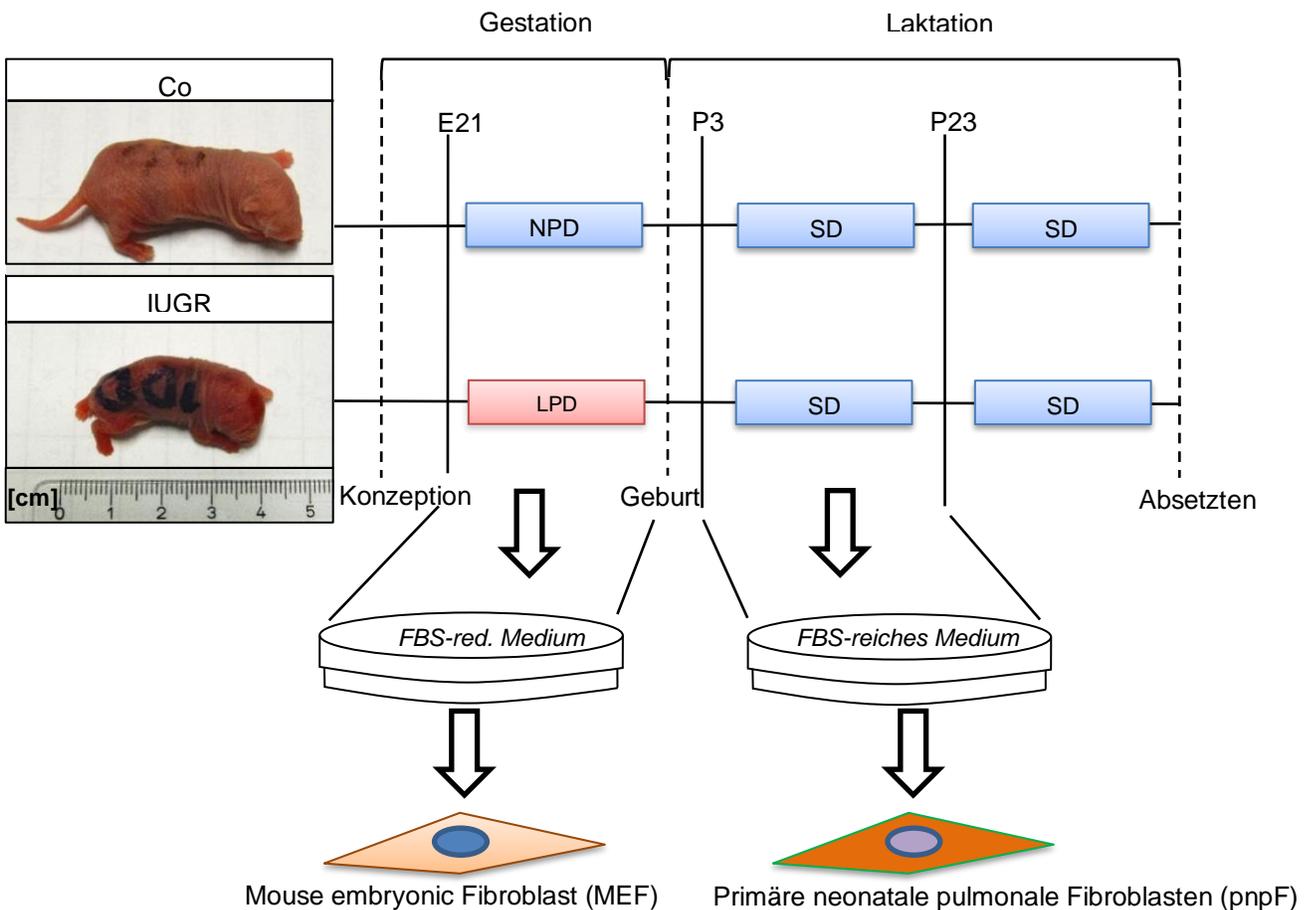


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Zellkulturversuche zur Analyse pulmonaler Fibroblasten nach intrauteriner Wachstumsrestriktion (IUGR). Dazu wurden embryonale Fibroblasten der Maus (mouse embryonic fibroblasts/MEF) sowie primäre neonatale pulmonale Fibroblasten (pnpF) aus Lungen von 3 Tage alten (P3) Ratten nach IUGR analysiert. Entsprechend des Tierversuches wurden MEF Zellen in Hunger-Medium, mit reduziertem Fetal-Bovine-Serum (FBS), und pnpF in FBS reichem Medium, mit physiologischen FBS-Konzentrationen, inkubiert.

3.6.1 Nährstoffmangel-Versorgung *in vitro* als Modell der Proteinmangeldiät (IUGR) und Stimulationsversuche mit GH/IGF1

3.6.1.1 Vorbereitung

Für den Nährstoffmangel-Versuch wurde mit der MEF Zellreihe gearbeitet. Zu Beginn wurde die Zellreihe hochgezüchtet: Dazu wurden diese mit frischem Nährmedium auf Zellkulturplatten ausgesät und bei 37°C mit 5% CO₂ und 21% O₂ kultiviert. Abhängig von der Morphologie und der Konfluenz der Zellkultur, wurde das Nährmedium im Abstand von 2 bis 4 Tagen gewechselt und die Zellen auf mehrere Zellkulturplatten aufgeteilt. Als Nährmedien kam DMEM (Tabelle 3) mit einem 10% FBS Anteil zum Einsatz.

3.6.1.2 Passage

Je nach Proliferationsrate wurden die Zellen nach 2 bis 4 Tagen von kleinen T25 auf große T75 Zellkulturplatten umgesetzt. Dazu wurde das alte Nährmedium abgesaugt und der Zellboden mit 2 ml PBS (*phosphate buffered saline*) kurz gespült und wieder abgesaugt. Um die Zellen von Boden der Schale zu lösen, wurden die Zellen mit 3 ml Trypsin für 3 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurde die Trypsinreaktion mit 6 ml Nährmedium gestoppt, die gelösten Zellen in 15 ml Tubes aufgenommen und für 4 Minuten bei 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in frischem Nährmedium resuspendiert und in 10 ml frischem Nährmedium für kleine Zellkulturplatten und 25mL für große Zellkulturplatten überführt. Für die Überführung Zellen auf die neuen Platten wurde eine Verdünnung von 1:6 für kleine Zellkulturplatten und eine Verdünnung von 1:4 für große Zellkulturplatten.

3.6.1.3 Zellzählung

Um eine definierte Menge an Zellen auszusähen, erfolgte im Vorfeld eine Zellzählung unter dem Mikroskop in einer Zählkammer. Dazu wurde die zu untersuchende Zellreihe mit Trypanblau angefärbt und dazu im Verhältnis von 1:10 mit Trypanblau verdünnt. Von den 1:10 mit Färbelösung verdünnten Zellen wurden wiederum 10 µl auf eine Zählkammer gegeben. Unter dem Mikroskop wurden die Zellen gezählt und so die Konzentration an gelösten Zellen im gesamten Medium hochgerechnet: Die Anzahl der Zellen multipliziert mit 10⁴/mL unter Miteinberechnung des Verdünnungsfaktors 1:10

ergab die definierte Zellzahl pro mL. Um die gewünschte Anzahl an Zellen jeweils auf die neue Zellkulturschale überführen zu können, wurde die entsprechende Menge an in Medium gelösten Zellen aufgenommen und frischem Nährmedium auf einer großen oder kleinen Zellkulturplatte ausgesät.

3.6.1.4 Nährstoffmangel-Versorgung *in vitro* als Modell der Proteinmangeldiät

Für den Nährstoffmangel-Versorgungsversuch wurde die MEF Zelllinie in einer definierten Menge von 2×10^6 Zellen pro Zellplatte ausgesät und für 24 Stunden im jeweiligen Nährmedium inkubiert (Punkt 3.3.1.1 Vorbereitung). Nachfolgend erfolgte ein Nährmediumwechsel und die Zellreihen wurden mit drei verschiedenen Nährmedien einer reduzierten FBS Konzentration inkubiert (FBS-reduziertes Medium) (**Abbildung 8**). Für die MEF Zellreihe wurden die Ansätze mit FBS-Konzentrationen von jeweils 0,5%, 2,5% und 7,5% genutzt. Die Kontrollgruppen wurden mit normal konzentriertem Nährmedium (FBS-reiches Medium, 10% FBS) inkubiert. Die Inkubation erfolgte für eine Gruppe für 24 Stunden und für eine weitere für 48 Stunden. Nach 24 bzw. 48 Stunden erfolgte die Ernte und es wurden 1500µL Überstand des Mediums aus den Zellplatten für ELISA Versuche abgenommen und bei -80°C eingefroren. Das restliche Nährmedium wurde abgesaugt, die Platte mit PBS abgespült und die Zellen von der Platte geschabt. Die am Boden verbliebenen Zellen wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei 14000rpm bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Das am Boden verbliebene Zellpellet wurde abhängig von seiner Größe in 60 – 200 µl RIPA Puffer resuspendiert, für 60 Minuten auf Eis inkubiert und und bei 14000rpm bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde auf zwei Eppendorf-Reaktionsgefäße aufgeteilt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -80°C eingefroren. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach erfolgter Isolation das BCA Protein Assay Kit verwendet. Hierbei wurden in Doppelbestimmung Proben auf eine 96 Wells-Platte aufgetragen und anschließend mithilfe des Tecan Nano Quant infinite M200 pro berechnet. Western Blots zur Proteinanalyse erfolgten wie unter Punkt 3.4 Proteinnachweis bereits beschrieben und mit den in Tabelle 8 aufgeführten Antikörpern behandelt

3.6.1.5 Zellkulturversuche zur Stimulation mit GH oder IGF1

Für den Stimulationsversuch wurde die MEF Zelllinie in einer definierten Menge von 1×10^6 Zellen pro Zellplatte für 24 Stunden und von $0,5 \times 10^6$ Zellen pro Zellplatte für 48 Stunden ausgesät und für 60 Stunden inkubiert (Punkt 3.3.1.1 Vorbereitung). Danach wurde das FBS-reiche Medium durch ein FBS-reduziertes Medium ersetzt und für 12 Stunden inkubiert und danach wieder mit FBS-reichem Medium versetzt. Im Anschluss erfolgte im 12 Stunden Rhythmus die Stimulation der Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen mit den Hormonen GH und IGF1. Als Kontrollgruppe diente immer eine nicht stimulierte Gruppe mit entsprechendem Vehikel. Die Inkubation erfolgte für eine Gruppe für 24 Stunden (h) und für eine weitere für 48 Stunden. [GH Stimulation (n=3 für 24h, n=3 für 48h) für die IGF1 Stimulation (n=4 für 24 h, n=4 für 48 h)]. Nach 24 bzw. 48 Stunden erfolgte die Ernte. Es wurden 1500µL Überstand des Mediums aus den Zellplatten für ELISA Versuche abgenommen und bei -80°C eingefroren. Das restliche Nährmedium wurde abgesaugt, die Platte mit PBS abgespült und die Zellen von der Platte geschabt. Die am Boden verbliebenen Zellen wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei 14000rpm bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Das am Boden verbliebene Zellpellet wurde in zwei Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und jeweils für die Protein- und RNA-Isolation weiterbearbeitet. Für die RNA Isolation wurde das Pellet in Tri-Reagent gelöst und sofort bei -80°C eingefroren. Im Verlauf erfolgte die mRNA Isolation, Umschreibung von mRNA in doppelsträngige cDNA (reverse Transkription) und SYBR green I real-time PCR wie unter dem Punkt 3.3 DNA Untersuchungen mittels real-time PCR bereits beschrieben. Die SYBR green I real-time PCR erfolgte für die in Tabelle 6 aufgeführten Gene. Für die Proteinisolation wurde abhängig von der Größe der Pellets, diese in 60 - 200 µl RIPA Puffer resuspendiert, für 60 Minuten auf Eis inkubiert und und bei 14000rpm bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde auf zwei Eppendorf-Reaktionsgefäße aufgeteilt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -80°C eingefroren. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach erfolgter Isolation das BCA Protein Assay Kit verwendet. Hierbei wurden in Doppelbestimmung Proben auf eine 96 Wells-Platte aufgetragen und anschließend mithilfe des Tecan Nano Quant infinite M200 pro berechnet. Western Blots zur Proteinanalyse erfolgten wie unter Punkt 3.4

Proteinnachweis bereits beschrieben und mit den in Tabelle 8 aufgeführten Antikörpern behandelt

3.6.2 Primäre neonatale pulmonale Fibroblasten

3.6.2.1 Isolation primärer neonataler pulmonaler Fibroblasten

Die Isolation der pnpF erfolgte aus Wistar Ratten am postnatalen Tag 3. Die Lungen wurden nach der Organentnahme in PBS auf Eis gekühlt und anschließend unter der Zellkulturbank weiterverarbeitet. Für die Isolation der pnpF aus der Gewebemasse wurde dem Lungengewebe Lysepuffer aus 10-fach verdünntem PBS mit 17 U/ml Collagenase (und 2,4 U/ml Dispase) zugegeben und mit dem Skalpell zerkleinert. Das Lysat wurde aufgenommen und drei Stunden in einem Schüttelinkubator bei 37°C lysiert. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 1200 rpm für vier Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 3 ml DMEM-Nährmedium mit 10% FBS und 1% P/S resuspendiert und über ein Zellsieb auf eine Small Plate ausplattiert und bei 37°C mit 5% CO₂ und 21% O₂ bebrütet. Am Folgetag erfolgte ein Mediumwechsel (**Abbildung 8**). Abhängig von der Morphologie und Konfluenz der Zellen wurde das Nährmedium im Abstand von 2 bis 4 Tagen gewechselt.

3.3.2.2 Passage der primären neonatalen pulmonalen Fibroblasten

Je nach Proliferationsrate wurden die Zellen nach 2 bis 7 Tagen von kleinen auf große Zellplatten umgesetzt. Der Vorgang erfolgte wie unter Punkt 3.3.1.2 bereits beschrieben.

3.3.2.3 DNA und Proteinanalyse

Je nach Proliferationsrate wurden die Zellen nach 2 bis 4 Tagen von den kleinen Zellkulturplatten auf große Zellkulturplatten umgesetzt. Dazu wurde das alte Nährmedium abgesaugt und der Zellboden mit 2 ml PBS kurz gespült und wieder abgesaugt. Um die Zellen von Boden der Schale zu lösen, wurden die Zellen mit 3 ml Trypsin für 3 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurde die Trypsinreaktion mit 6 ml Nährmedium gestoppt, die gelösten Zellen in 15 ml Tubes aufgenommen und für 4 Minuten bei 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet für die weitere Analyse der cDNA und Proteinanalyse weiterverwertet. Das am Boden verbliebene Zellpellet wurde in zwei Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und jeweils für die Protein- und RNA-Isolation

weiterbearbeitet. Für die RNA Isolation wurde das *Pellet* in Tri-Reagent gelöst und sofort bei -80°C eingefroren. Im Verlauf erfolgte die mRNA Isolation, Umschreibung von mRNA in doppelsträngige cDNA (reverse Transkription) und real-time PCR, wie unter Punkt 3.3 bereits beschrieben. Für die Proteinisolation wurde abhängig von der Größe der Pellets, diese in 60 - 200 µl RIPA Puffer resuspendiert, für 60 Minuten auf Eis inkubiert und bei 14000rpm bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde auf zwei Eppendorf-Reaktionsgefäße aufgeteilt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -80°C eingefroren oder auf Eis gestellt und am gleichen Tag zur Proteinbestimmung benutzt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach erfolgter Isolation das BCA Protein Assay Kit verwendet. Hierbei wurden in Doppelbestimmung Proben auf eine 96 Wells-Platte aufgetragen und anschließend mithilfe des Tecan Nano Quant infinite M200 pro berechnet. Western Blots zur Proteinanalyse erfolgten wie unter Punkt 3.4 Proteinnachweis bereits beschrieben und mit den in Tabelle 8 aufgeführten Antikörpern behandelt

3.3.3 ELISA zur Bestimmung von IGF1 im Zellkulturüberstand

Für die Bestimmung der IGF1 Konzentration im Zellkulturüberstand wurde der zuvor eingefrorene Zellkulturüberstand wieder aufgetaut mittels des IGF1 Mouse ELISA Kits der Firma abcam (ab100695) analysiert. Die Reagenzien und Proben wurden bei RT inkubiert. Für die Analyse von Zellkulturüberständen eignet sich der Assay Diluent B Puffer (Item E) des ELISA Kits. Dieser wurde vor Gebrauch mit destilliertem Wasser verdünnt (15ml mit 60 ml destilliertem Wasser). Anschließend wurden die Proben 1:2 mit dem Assay Diluent B verdünnt. Es folgte das Pipettieren der IGF1-Standards A-G (IGF1 in Proteinpuffer [BSA]) in den Konzentrationen von 2000 pg/ml; 666,7 pg/ml; 222,2 pg/ml; 74,07 pg/ml; 24,69,5 pg/ml, 8,23 pg/ml und 2,74 pg/ml) sowie des vorbehandelten Probenmaterials in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte. In jedes Well der Mikrotiterplatte wurden 100µl der Standard oder Probe pipetiert und für 2,5 Stunden bei RT inkubiert. Die Lösung wurde anschließend verworfen und mit 300 µl einfach konzentrierter Waschlösung (Item B) gewaschen. Anschließend wurden 100 µl Biotik Antikörper Lösung in jedes Well pipetiert und für 1 Stunde bei RT inkubiert. Die Lösung wurde verworfen, die Platte auf Fließpapier trocken geklopft und vier Mal mit 300 µl einfach konzentrierter

Waschlösung (Item B) gewaschen. Anschließend wurden 100 µl Streptavidin-Lösung in jedes Well gegeben und für 45min bei RT inkubiert. Die Lösung wurde verworfen, die Platte auf Fließpapier trocken geklopft und vier Mal mit 300 µl einfach konzentrierter Waschlösung (Item B) gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe von 100µl TMB One-Step Substrate Reagent (Item H), für 30 min bei RT auf einem Horizontalschüttler im Dunkeln inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen wurde 50 µl Stopplösung (Item I) in jede Vertiefung gegeben. Es zeigte sich eine gelbe Färbung. Die Absorption der Lösung wurde nach 30 min mithilfe des Tecan Nano Quant infinite M200 pro bei 450 nm gemessen und die Konzentrationen berechnet.

3.4 Daten Analyse

Die Ergebnisse der real-time RT-PCR wurden basierend auf der delta-delta-CT Methode berechnet. Die Induktion von mRNA (*fold induction of mRNA*) im Verhältnis zur entsprechenden Kontrollgruppe, Co, (1,0-fache Induktion) gesetzt. Die quantitative Analyse der Westernblots erfolgte mittels Densitometrie der Image Lab Software (Image Lab Software Version 6.0, California, USA). Dabei wurde die Intensität der zu untersuchenden Bande zum Verhältnis der entsprechenden Bande der Ladungskontrolle (β Actin) im jeweiligen Stadium gesetzt [Intensität (zu untersuchendes Protein)/Intensität (β Actin)]. Zur statistischen Berechnung der Unterschiede zwischen IUGR und Kontrolltieren zu den verschiedenen Zeitpunkten, erfolgte ein zweiseitiger Mann-Whitney-Test oder One-way bzw. Two-way ANOVA, gefolgt von einem Bonferroni Post-Test. Die Auswertung erfolgte mit der Computer Software Graph Pad Prism (GraphPad Software Version 6.0, San Diego, CA, USA). Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde dabei als signifikant gewertet. Sämtliche Ergebnisse sind als Durchschnittswerte angegeben und mit einem Standardfehler des Mittelwertes dargestellt.

4. Ergebnisse

4.1 Vorarbeiten

Im Rahmen von Vorarbeiten dieses Projektes in der Arbeitsgruppe Fetale Programmierung/Experimentelle Pneumologie erfolgte bereits eine Phänotypisierung der Tiere sowie eine Messung des Körper- sowie des Lungengewichts an E21 und an P3 und P23. Hierbei zeigte sich, dass die maternale Gabe von *low-protein diet* (8% Casein; IUGR) während der Gestation zu einem signifikant niedrigeren Geburtsgewicht (IUGR) der Nachkommen an P1 führt, verglichen mit der Kontrollgruppe, deren Mütter *normal-protein diet* (17% Casein, Co) erhalten haben (**Abbildung 9**). Zur Laktationsphase (P1-P23) erfolgte nicht nur eine Reduktion auf 6 Tiere pro Wurf, sondern auch eine Futterumstellung der Mütter beider Gruppen auf Standardfutter. Die Nachkommen mit IUGR sowie deren Lungen wiesen ein deutliches Aufholwachstum auf, so dass an P23 kein signifikanter Gewichtsunterschied zwischen IUGR und Co bestand (**Abbildung 9**).

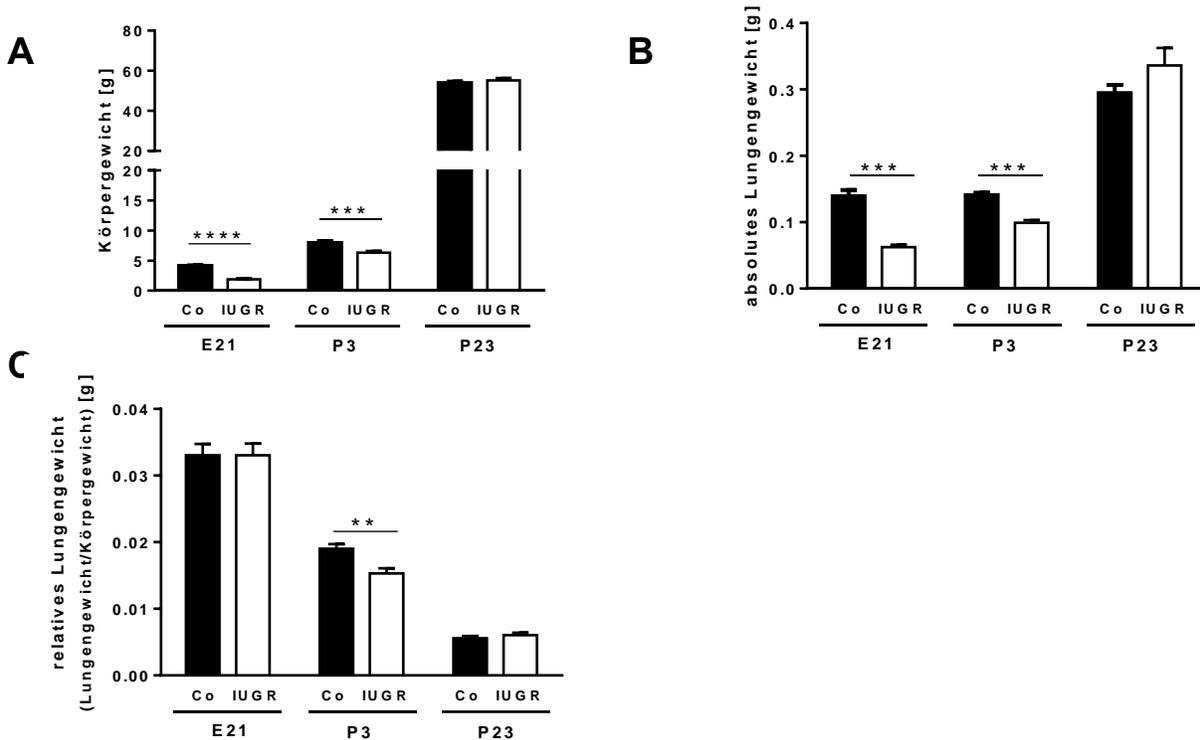


Abbildung 9: Phänotypisierung der Tiere nach IUGR. A: absolutes Körpergewicht (g) an postnatalen Tag (P) 1, P3 und P23. B: absolutes Lungengewicht (g). C: relatives Lungengewicht bezogen auf das Körpergewicht. IUGR (weiß); Co (schwarz). Mittelwert ± SEM (Standardfehler des Mittelwerts). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Two-way ANOVA, Mann-Whitney Test.

4.2 *in vivo* Versuche

Bei Ratten findet die Alveolarisation postnatal statt. Nach einer Tragezeit von 20 bis 22 Tagen, befindet sich die Rattenlunge in der sakkulären Phase und entspricht in der Entwicklung der 26-28 Schwangerschaftswoche des Menschen. Im Anschluss findet bei Ratten überwiegend in den ersten zwei Wochen nach Geburt die Alveolarisation der Lunge statt (72). Deshalb liegt ein besonderer Fokus der Arbeit auf P3 und P23 der Tierversuche, da diese den Übergang der sakkulären Phase in die frühe und späte alveoläre Phase repräsentieren. Der intrauterine Tag 21 (E21) vervollständigt mit der sakkulären Phase die gesamte Zeitspanne der Sakkularisation bis zur Alveolarisation der Lunge in der Ratte. Um den Einfluss einer IUGR auf das Expressionsmuster des intrinsischen GH/IGF-Systems der Lunge zu untersuchen, erfolgte die Analyse an E21, P3 und P23 anhand von verschiedenen Untersuchungsmethoden. Wie im Methodenteil zuvor beschrieben wurde mRNA sowie Protein aus den Lungen isoliert, um nachfolgend mittels real-time RT-PCR oder Western Blot das Expressionsprofil und die intrazelluläre Aktivität des GH/IGF1-Systems sowie Zellüberleben anhand von Proliferations- und Apoptosemarkern zu untersuchen.

4.2.1 Expressionanalyse des GH-Systems

Die Genexpressionsanalyse des Wachstumshormons GH zeigte im embryonalen Stadium (E21) eine fast 10-fach gesteigerte Expression in Lungen nach IUGR verglichen mit der Kontrollgruppe auf. An P3 und P23 fanden sich keine Unterschiede in der GH-mRNA Expression zwischen beiden Gruppen (**Abbildung 10A**). Die Expression des GH Rezeptors (GH-R) hingegen zeigte weder prä- noch postnatal signifikante Unterschiede in den Lungen nach IUGR. (**Abbildung 10B**). Die densitometrische Analyse der Western Blots zum GH-R, zeigte keine signifikante Erniedrigung der Proteinmenge an E21 und P3. Im späteren postnatalen Verlauf (P23) kam es zu einem signifikanten Anstieg des GH-R in der Lunge nach IUGR (**Abbildung 10C, D**). Um die intrazelluläre Aktivität des GH-R zu untersuchen, wurde aktiviertes Stat5 (phosphoryliertes Stat5, pStat5) in den Lungen nach IUGR und Kontrolllungen mittels Western Blot analysiert.

Die Aktivierung von Stat5 (pStat5) war in der intrauterinen Phase (E21) signifikant vermindert nach IUGR verglichen mit Kontrollen; wohingegen an P23 pStat5 in Lungen nach IUGR im Vergleich zu Kontrolllungen unverändert war, was auf ein *catch-up* der Signalkaskade postnatal hindeutet (**Abbildung 11**).

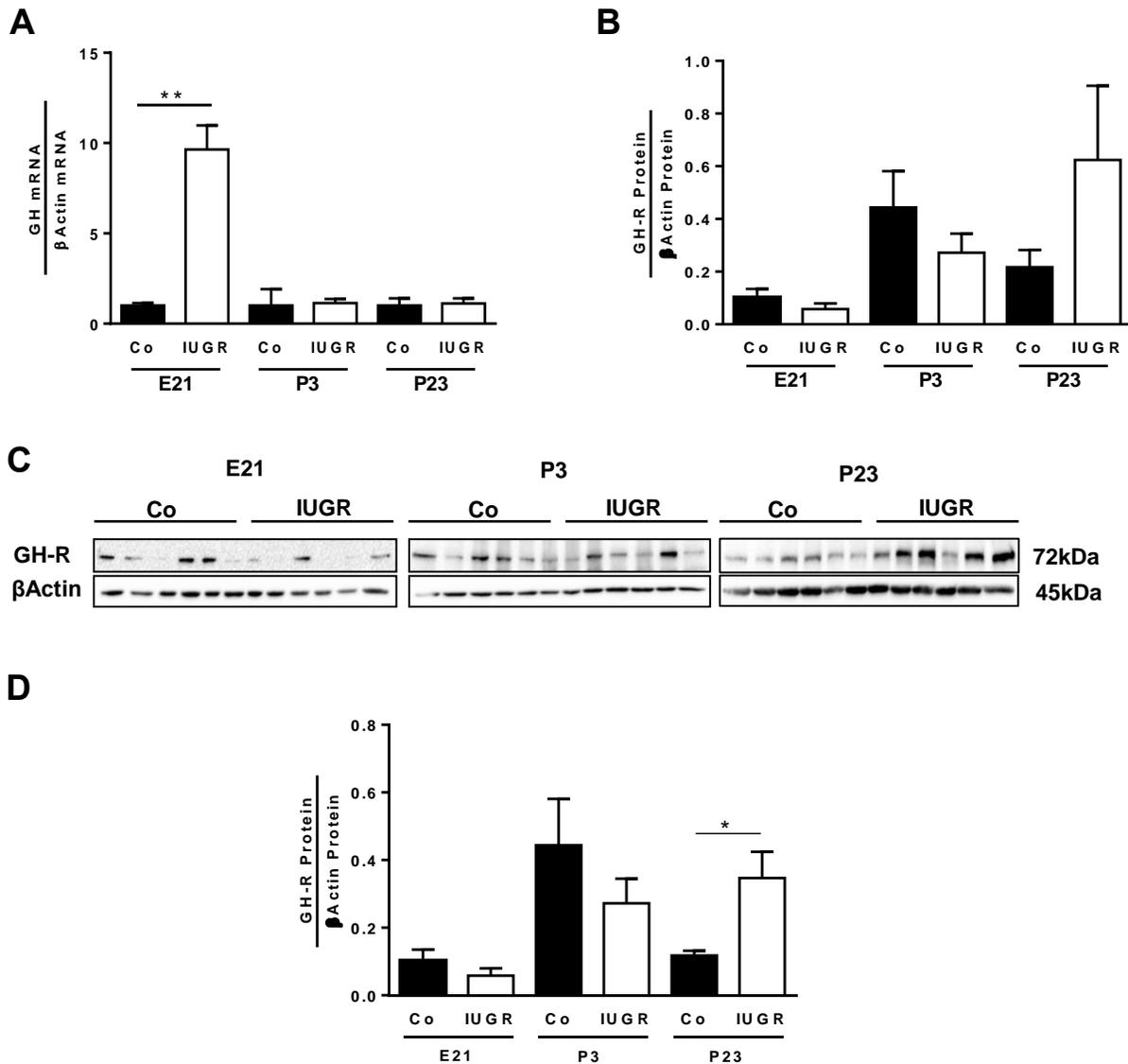
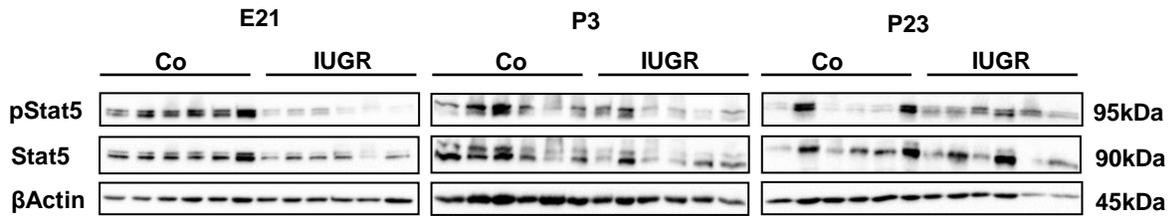
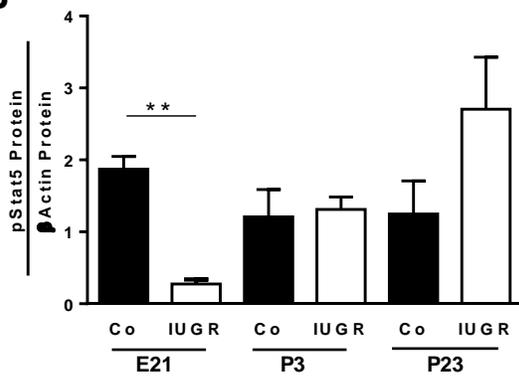


Abbildung 10: mRNA Expressionprofil der Wachstumsfaktoren Growth Hormone (GH) sowie des Rezeptors GH-Rezeptor (GH-R) in der Lunge nach IUGR. A: GH mRNA Expressionprofil. B: GH-R mRNA Expressionprofil. Proteineexpressionsprofil des Rezeptors für GH (GH-R) in der Lunge nach IUGR. C: repräsentativer Western Blot für den embryonalen Tag 21 (E21), postnatalen Tag 3 (P3) und 23 (P23). D: Densitometrische Auswertung der Expression von GH-R anhand der Western Blots. Die Intensität der GH-R-Bande bzw. wurde in Verhältnis gesetzt zur entsprechenden Bande der Ladungskontrolle βActin im jeweiligen Stadium [Intensität (Rezeptor)/Intensität (βActin)]. n= 6 Tiere pro Stadium und Gruppe; IUGR (weiß); Co (schwarz). Mittelwert ± SEM (Standardfehler des Mittelwerts). *p<0,05, **p<0,01 Mann-Whitney Test.

A



B



C

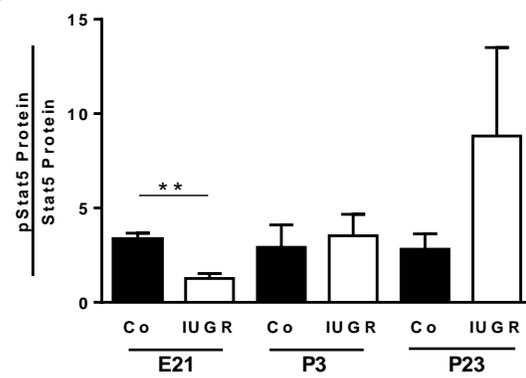


Abbildung 11: Proteinexpressionsprofil für Stat5 und aktiviertes Stat5 (Phosphorylierung; p) (Signalkaskade des GH-Systems) in der Lunge nach IUGR. A: repräsentativer Western Blot für Stat5 und pStat5 für den embryonalen Tag 21 (E21), Tag 3 (P3) und 23 (P23). B und C: Densitometrische Auswertung der Expression von Stat5 und pStat5 anhand der Western Blots. Die Intensität der Stat5-Bande bzw. der pStat5 wurde in Verhältnis gesetzt zur entsprechenden Bande der Ladungskontrolle β Actin im jeweiligen Stadium [Intensität (pStat5)/Intensität (β Actin)] (B). Die Intensität der phosphorylierten Stat5- (pStat5) Bande wurde in Bezug zur entsprechenden von Stat5 im jeweiligen Stadium gesetzt [Intensität (pStat5)/Intensität (Stat5)] (C). n = 6 Tiere pro Stadium und Gruppe; IUGR (weiß); Co (schwarz). **p < 0,01. Mann-Whitney Test.

4.2.2 Analyse des IGF1-Systems

Der Wachstumsfaktor IGF1, der in der postnatalen Phase von großer Bedeutung ist, war in seiner mRNA Expression in Lungen mit IUGR verglichen mit Kontrollen an E21 signifikant erniedrigt. In der postnatalen Phase (P3, P23) fanden sich keine Genexpressionunterschiede zwischen beiden Gruppen (**Abbildung 12A**). Die Expression des Wachstumsfaktors IGF2, dem insbesondere in der pränatalen Lungenentwicklung eine entscheidende Rolle zukommt, war signifikant an E21 in Lungen nach IUGR erhöht, wohingegen nach der Geburt an P3 und P23 keine Unterschiede zwischen IUGR und Co bestanden (**Abbildung 12B**). Da die Arbeit sich auf die postnatale Lungenentwicklung fokussiert, erfolgten keine weiteren Analysen zu IGF2 und seinem Rezeptor (IGF2-R), sondern vielmehr zum IGF1-R. Die mRNA Analyse des IGF1-R zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Expression nach IUGR. In den Western Blot Analysen verzeichnete der IGF1-R hingegen einen signifikanten Anstieg an E21 nach IUGR. An P23 ist dieser Anstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe weiterhin als Tendenz zu beobachten, ein signifikanter Unterschied bleibt jedoch aus (**Abbildung 12C, E, F**).

Da Insulin nicht nur den Glukosemetabolismus reguliert, sondern ebenso wie IGF1, IGF2 und GH ein Wachstumsfaktor ist, haben wir zusätzlich zur weiteren Differenzierung der Wirkung des IGF/GH- Systems neben der Expression des IGF1-R, auch die des Insulinrezeptors (Insulin-R) untersucht (73). Die Analyse des Insulin-R ist außerdem von Bedeutung, da es IGF2 binden kann (74). Dieser zeigt eine verminderte mRNA-Expression in der intrauterinen Phase (E21) nach IUGR und ist in der postnatalen Phase (P3 und P23) wiederum unverändert. (**Abbildung 12D**).

Um die intrazelluläre Insulin/IGF1-Signalkaskade zu untersuchen wurde phosphoryliertes (aktives) Akt (pAkt) mittels Western Blot analysiert. Die Ergebnisse zeigen an E21 entsprechend der verminderten Expression des Liganden IGF1 und des Insulinrezeptors eine erniedrigte Aktivität der Akt Signalkaskade ($p < 0.05$). In der postnatalen Phase an P23 ist die Phosphorylierung jedoch signifikant erhöht (**Abbildung 13A, B**).

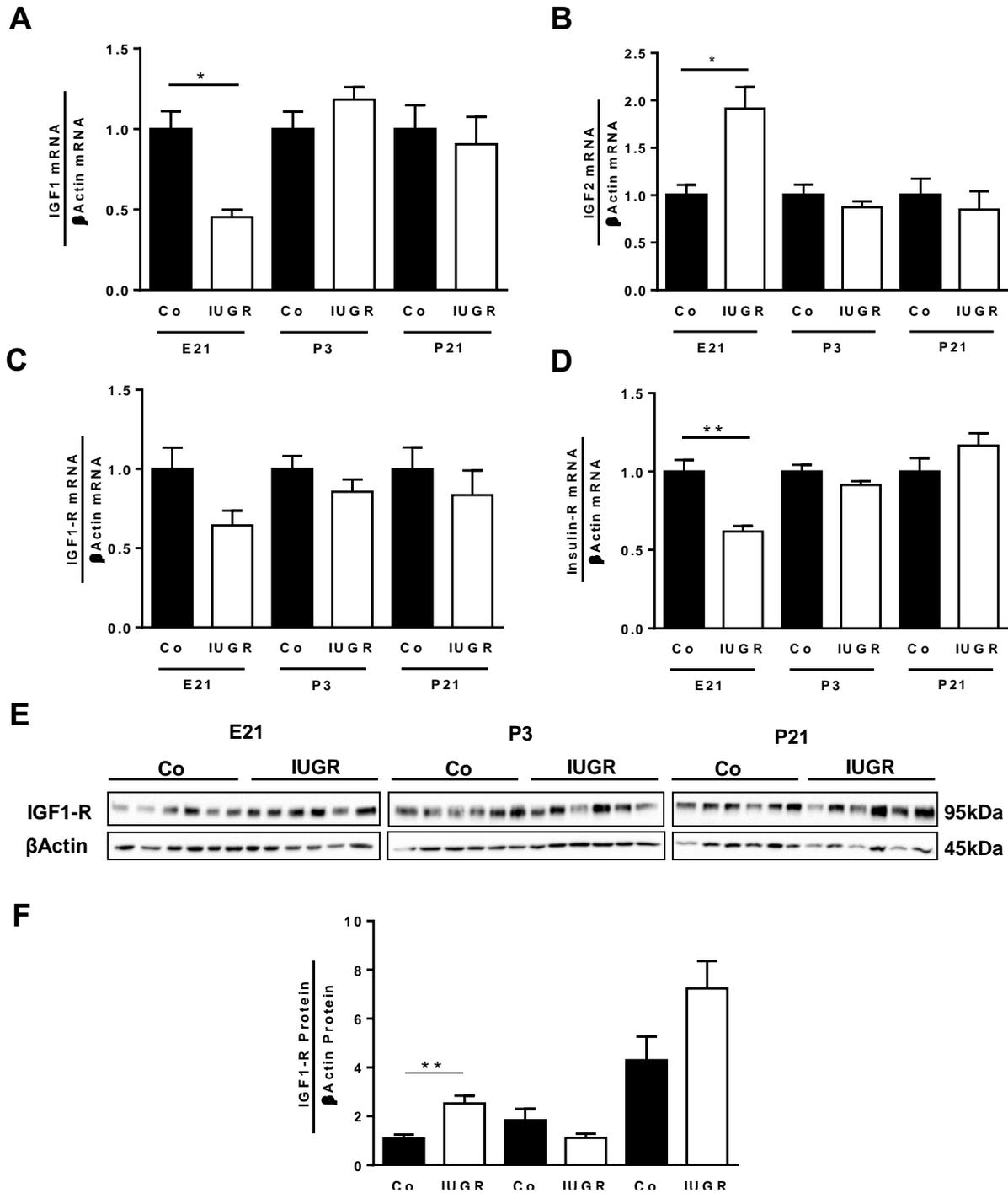
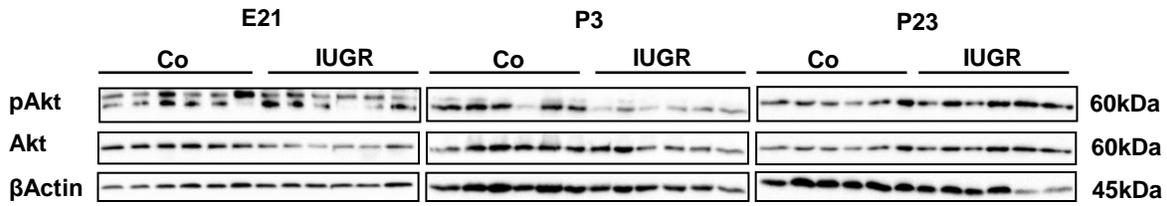
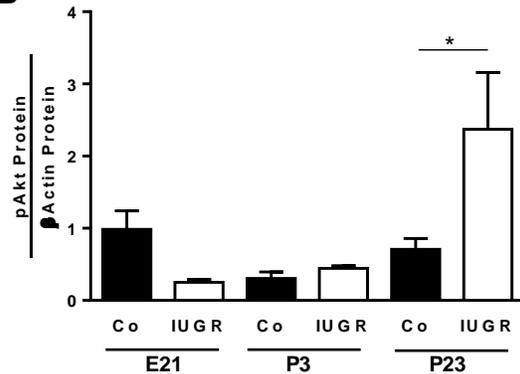


Abbildung 12: mRNA Expressionprofil der Wachstumsfaktoren Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF1), Insulin-Like Growth Factor 2 (IGF2) sowie des IGF1-Rezeptor (IGF1-R) sowie des Rezeptors für Insulin (Insulin-R) in der Lunge nach IUGR. A: IGF1 mRNA Expressionprofil, B: IGF2 mRNA Expressionprofil, C: IGF1-R mRNA Expressionprofil, D: Insulin-R mRNA Expressionprofil. Proteinexpressionprofil des Rezeptors für Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF1) in der Lunge nach IUGR. E: repräsentativer Western Blot für den embryonalen Tag 21 (E21), postnatalen Tag 3 (P3) und 23 (P23). F: Densitometrische Auswertung der Expression von IGF1-R anhand der Western Blots. Die Intensität der IGF1-R-Bande bzw. wurde in Verhältnis gesetzt zur entsprechenden Bande der Ladungskontrolle βActin im jeweiligen Stadium [Intensität (Rezeptor)/Intensität (βActin)]. n= 6 Tiere pro Stadium und Gruppe; IUGR (weiß); Co (schwarz). Mittelwert ± SEM (Standardfehler des Mittelwerts). *p<0,05, **p<0,01 Mann-Whitney Test.

A



B



C

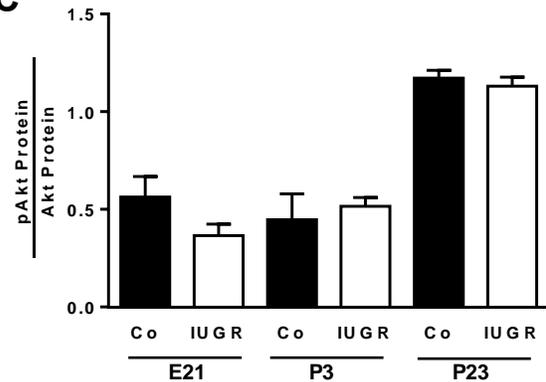


Abbildung 13: Proteinexpressionsprofil für Akt und aktiviertes Akt (Phosphorylierung; p) (Signalkaskade des IGF-Systems) in der Lunge nach IUGR. A: repräsentativer Western Blot für Akt und pAkt für den embryonalen Tag 21 (E21), postnatalen Tag 3 (P3) und 23 (P23). B und C: Densitometrische Auswertung des phosphorylierten Akt (pAkt) bezogen auf β Actin (B) oder totales Akt (C) anhand der Western Blots. Die Intensität der pAkt Bande wurde in Verhältnis gesetzt zur entsprechenden Bande der Ladungskontrolle β Actin im jeweiligen Stadium [Intensität (pAkt)/Intensität (β Actin)] (B). Die Intensität der phosphorylierten Akt- (pAkt) Bande wurde in Bezug zur entsprechenden von Akt im jeweiligen Stadium gesetzt [Intensität (pAkt)/Intensität (Akt)] (C). n= 6 Tiere pro Stadium und Gruppe; IUGR (weiß); Co (schwarz). Mittelwert \pm SEM (Standardfehler des Mittelwerts). *p<0,05. Mann-Whitney Test.

Um einen systemischen Effekt als Ursache der veränderten GH/IGF-Signalkaskade auszuschließen, erfolgte die Messung der Serum IGF1 Konzentration am P3 und P23. Das Serum wurde im Vorfeld aus denselben Tieren wie für die Proben der Protein und DNA Analyse isoliert. Die Messung erfolgte mittels eines ELISA Verfahrens. Dabei zeigten sich weder an P3 oder P23 signifikante Unterschiede in den Konzentrationen von IGF1 nach IUGR und der Kontrollgruppe (**Abbildung 14**).

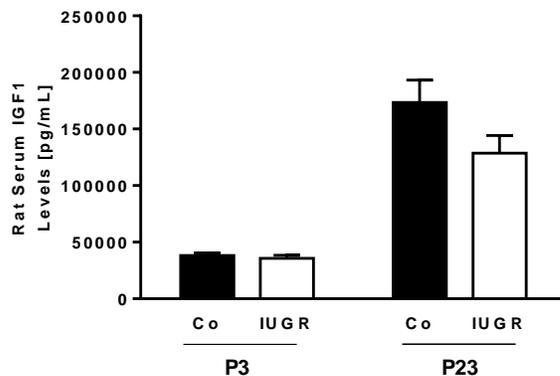


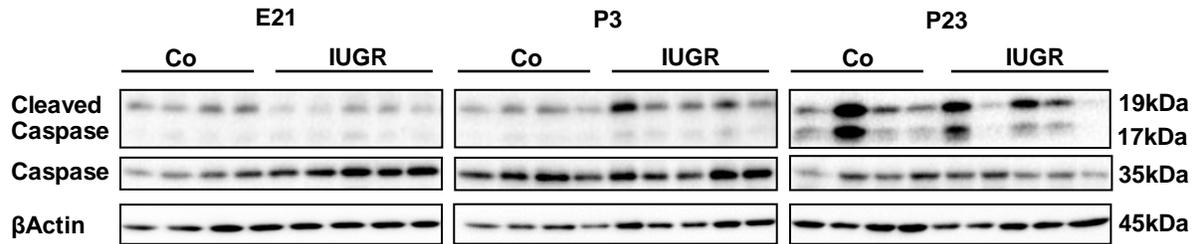
Abbildung 14: Serumkonzentration von Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF1) in der Lunge nach Intrauteriner Wachstumsrestriktion (IUGR). A: Auswertung der Serumkonzentration von IGF1 anhand eines Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Verfahrens. n= 6-7 Tiere pro Stadium und Gruppe, postnataler Tag 3 (P3), P23. IUGR (weiß); Co (schwarz). Mann-Whitney Test.

4.2.3 Analyse von Proliferation, Apoptose und der Extrazellulären Matrix

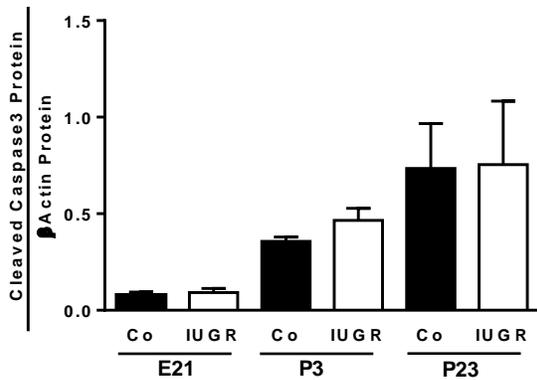
Die vorherigen Studien der Arbeitsgruppe konnten bereits ein gestörtes Lungewachstum und eine veränderte Zusammensetzung der ECM nach IUGR zeigen (41). Zudem ist das GH/IGF-System wichtig für die Differenzierung und Proliferation von Zellen (32,33,39,40,41). Daher erfolgten näheren Analysen für Marker der Proliferation, Apoptose und ECM Zusammensetzung.

Gespaltene (*cleaved*; aktivierte) Caspase3 dient als Indikator für Apoptose. Daher wurde mittels Western Blot die ungespaltene (Caspase3) sowie die aktive (cleaved Caspase3) untersucht. Die Analyse des Western Blots zeigt eine erhöhte Aktivität der totalen Caspase im intrauterinen Stadium (E21) nach IUGR, mit signifikantem Unterschied in Relation zur aktiven Form (cleaved Caspase). Im weiteren postnatalen Verlauf kommt es zu keinen signifikanten Unterschieden (**Abbildung 15 A-C**).

A



B



C

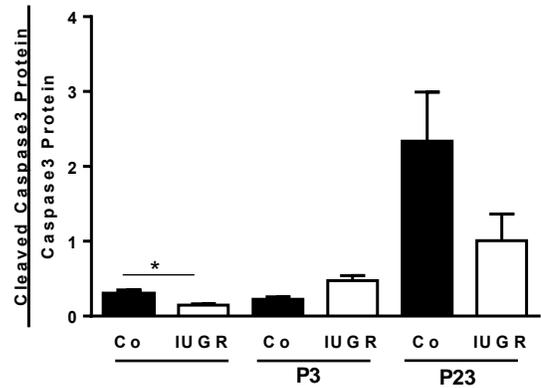
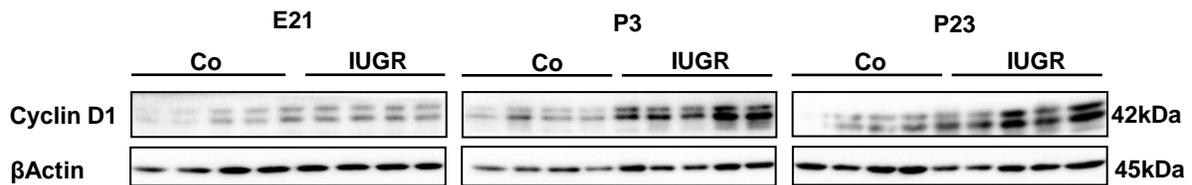


Abbildung 15: Proteinexpressionsprofil für Caspase3 und aktivierte (cleaved) Caspase3 in der Lunge nach IUGR. A: repräsentativer Western Blot für den embryonalen Tag 21 (E21), postnatalen Tag 3 (P3), P23. B und C: Densitometrische Auswertung der Expression von Caspase3 und aktivierter (cleaved) Caspase3 anhand der Western Blots. Die Intensität der cleaved Caspase3 Bande wurde in Bezug zur entsprechenden von β Actin im jeweiligen Stadium gesetzt [Intensität (cleaved Caspase)/Intensität (β Actin)] (B). Die Intensität der cleaved Caspase Bande wurde in Bezug zur entsprechenden von Caspase3 im jeweiligen Stadium gesetzt [Intensität (cleaved Caspase)/Intensität (Caspase3)] (C). n= 4-5 Tiere pro Stadium und Gruppe; IUGR (weiß); Co (schwarz). Mittelwert \pm SEM (Standardfehler des Mittelwerts). * $p < 0,05$. Mann-Whitney Test.

Als Marker für Zellproliferation dienten Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) und Cyclin D1. Die Analyse beider Marker zeigte eine deutlich erhöhte Proteinexpression im intrauterinen Stadium (E21) nach IUGR im Vergleich zur Kontrollgruppe (**Abbildung 16A, B, 17A, B**).

An P3 hingegen ist PCNA in Lungen nach IUGR im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant verändert, nimmt jedoch an P23 im Vergleich zur Kontrollgruppe wieder signifikant zu (**Abbildung 17A, B**). Im Gegensatz zu PCNA ist die Proteinmenge von Cyclin D1 auch an P3 und P23 in Lungen von Tieren nach IUGR verglichen mit Kontrolltieren signifikant erhöht ($p < 0.05$) (**Abbildung 16A, B**).

A



B

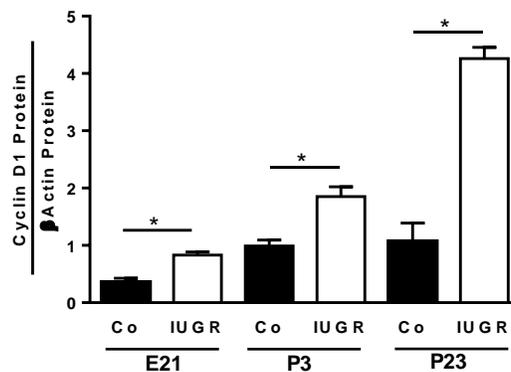
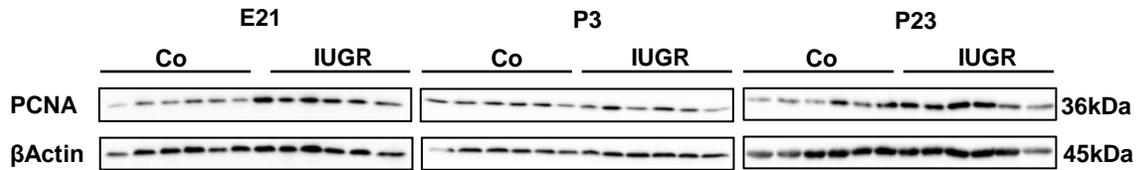


Abbildung 16: Proteinexpressionsprofil für Cyclin D1 in der Lunge nach IUGR. A: repräsentativer Western Blot für den embryonalen Tag 21 (E21), postnatalen Tag 3 (P3), P23. B: Densitometrische Auswertung der Expression von Cyclin D1 anhand der Western Blots. Die Intensität der Cyclin D1 Bande wurde in Bezug zur entsprechenden von β Actin im jeweiligen Stadium gesetzt [Intensität (Cyclin D1)/Intensität (β Actin)]. $n = 4-5$ Tiere pro Stadium und Gruppe Embryonaler Tag 21 (E21), postnataler Tag 3 (P3), P23. IUGR (weiß); Co (schwarz). Mittelwert \pm SEM (Standardfehler des Mittelwerts). $*p < 0.05$. Mann-Whitney Test.

A



B

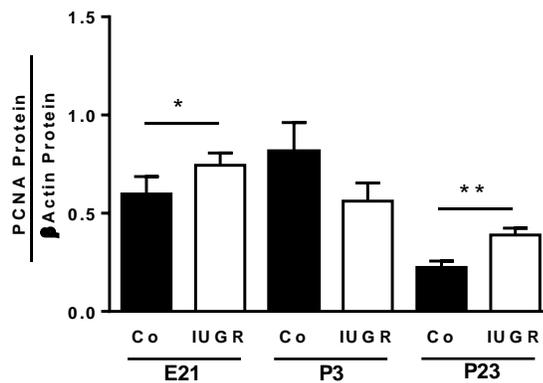
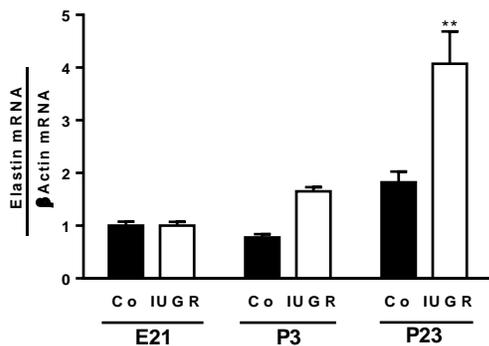


Abbildung 17: Proteinexpressionsprofil für Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in der Lunge nach IUGR. A: repräsentativer Western Blot für den embryonalen Tag 21 (E21), postnatalen Tag 3 (P3), P23. B: Densitometrische Auswertung der Expression von PCNA anhand der Western Blots. Die Intensität der phosphorylierten PCNA Bande wurde in Bezug zur entsprechenden von β Actin im jeweiligen Stadium gesetzt [Intensität (PCNA)/Intensität (β Actin)]. n= 6 Tiere pro Stadium und Gruppe; IUGR (weiß); Co (schwarz). Mittelwert \pm SEM (Standardfehler des Mittelwerts). *p<0,05 **p<0,01. Mann-Whitney Test.

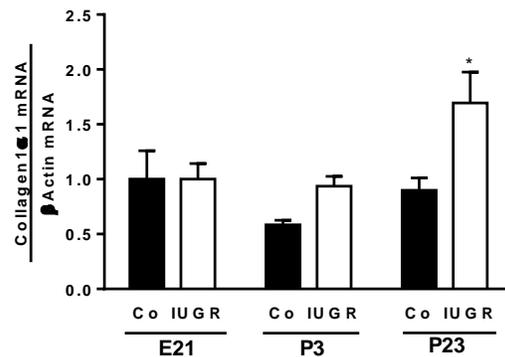
Um zu untersuchen, ob die Dysregulation des intrinsischen GH/IGF-Systems nach IUGR mit einer veränderten Regulation der ECM assoziiert ist, wurde die Genexpression von für die pulmonale ECM wichtigen Komponenten durchgeführt: Elastin, Collagen 1 α 1 und Fibrilin 1A. Der Genexpressionsanstieg von Elastin und Collagen 1 α 1 an P23 (späte alveolären Phase) bezogen auf E21 war in Lungen nach IUGR verglichen mit Kontrollungen signifikant höher, was auf ein catch-up der Expression postnatal nach IUGR hindeutet (**Abbildung 18A, B**). Elastin und Collagen 1 α 1 weisen somit einen

dynamischen Anstieg nach IUGR im Verlauf der alveolären Phase auf und könnten einen wesentlichen Zusammenhang zu IUGR assoziierten Erkrankungen darstellen. Die Expression von Fibrillin 1A hingegen zeigte dabei keine wesentlichen Unterschiede nach IUGR im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (**Abbildung 18C**).

A



B



C

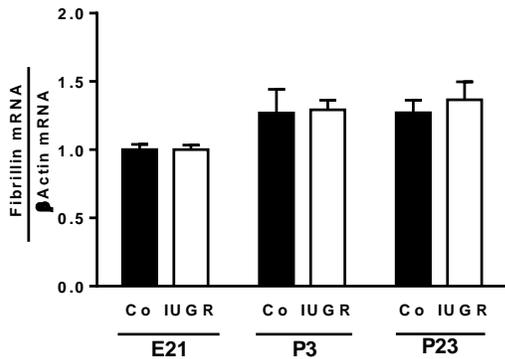


Abbildung 18: mRNA Expressionprofil für Komponenten der Extrazellulärmatrix (ECM) der Lunge nach IUGR: Elastin, Collagen1α1, Fibrillin 1A: Elastin mRNA Expressionprofil, B: Collagen1α1 mRNA Expressionprofil, C: Fibrillin 1mRNA Expressionprofil. Embryonaler Tag 21 (E21), postnataler Tag 3 (P3), P21. IUGR (weiß); Co (schwarz). Mittelwert ± SEM (Standardfehler des Mittelwerts). *p<0,05, **p<0,01. Two way Anova Test, mit nachfolgendem Bonferroni post Test.

4.3 Zellkulturversuche

Die *in vitro* Versuche hatten zwei wesentliche Ziele: a) Untersuchung des Einflusses eines Nährstoffmanges als Modell für IUGR auf die Fibroblasten der Lunge; und b) Charakterisierung der funktionellen Rolle von GH/IGF1 auf die Zellhomeostase von pulmonalen Fibroblasten. Dazu wurden embryonale Fibroblasten der Maus (mouse embryonic fibroblasts/MEF) sowie primäre neonatale pulmonale Fibroblasten (pnpF) eingesetzt.

4.3.1 Nährstoffmangel-Versorgung *in vitro* als Modell der Proteinmangeldiät

Ziel dieses *in vitro* Modells war es den Einfluss einer Proteinmangeldiät (IUGR) im intrauterinen Zustand der Lunge auf das GH/IGF-System der pulmonalen Fibroblasten gezielt zu untersuchen. Dazu wurde eine IUGR in ein *in vitro* Modell translatiert und embryonale Fibroblasten der Maus (MEF) in einem Nährstoff-reduzierten Medium inkubiert. Durch eine schrittweise Reduzierung der für das Zellwachstum essentiellen Komponente, fetales Kälberserum (FBS), konnten dosis abhängige Veränderungen registriert werden. Durch die Isolierung der Proteine aus den Zellen nach 24 und 48 Stunden zusammen mit einer Abnahme von Mediumüberstand wurden zusätzlich auch zeit abhängige Unterschiede beobachtet. Aus den Proben wurden Proteine isoliert, die Konzentrationen gemessen und Western Blots zum Nachweis der Rezeptoren (GH-R und IGF1-R), für die Schlüsselproteine der intrazellulären GH-Signalkaskade (pStat5 und totales Stat5) sowie für Proliferations (PCNA)- und Apoptosemarker (cleaved Caspase3 und Caspase3) durchgeführt. Die Reproduzierbarkeit des Modells wurde durch ein fünfmaliges Wiederholen der Versuche gezeigt.

Die Analyse mittels Western Blots zeigte, dass eine stufenweise reduzierte FBS-Konzentration (10%, 7,5%, 2,5% und 0,5%) für 24 Stunden (**Abbildung 19A**) und 48 Stunden (**Abbildung 19B**) mit einer Abnahme der GH-R Proteinmenge einherging. Die Reduktion des GH-R infolge abnehmender FBS-Konzentrationen war begleitet von einer verminderten intrazellulären Aktivierung der Stat5 (pStat5) nach 24 Stunden (**Abbildung 20A**) und 48 Stunden (**Abbildung 20B**).

Bei einer 0,5 prozentigen FBS Konzentration kam es sogar sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden zu einem signifikanten Abfall der GH-R und pStat5 Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe (**Abbildung 19A, B, 20A, B**).

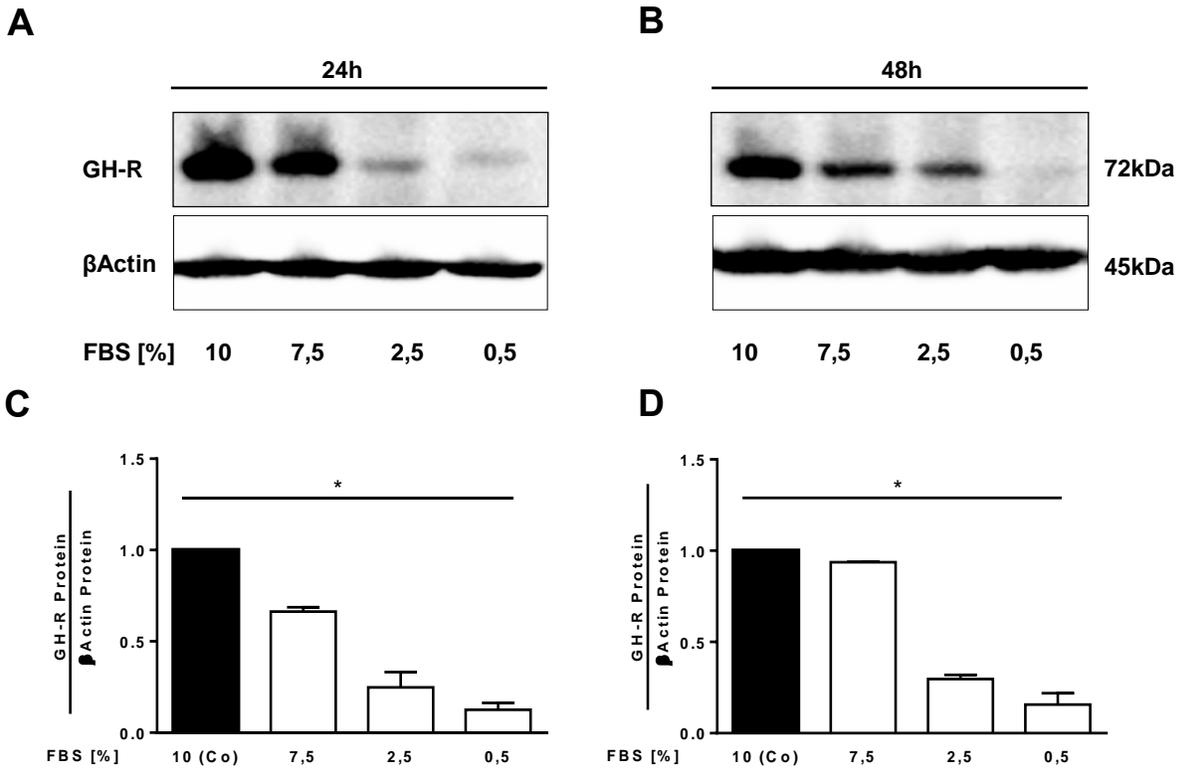


Abbildung 19: Proteinexpressionprofil des Rezeptors für GH (GH-R) in mouse embryonic fibroblasts (MEF) nach FBS-Restriktion. A, B: repräsentativer Western Blot für GH-R nach FBS-Restriktion nach 24h (A) und 48h (B). C, D: Densitometrische Auswertung der Expression von GH-R nach 24h (C) und 48h (D) anhand der Western Blots. Die Intensität der GH-R-Bande wurde in Verhältnis gesetzt zur entsprechenden Bande der Ladungskontrolle β Actin im jeweiligen Stadium [Intensität (Rezeptor)/Intensität (β Actin)]. n= 5 Versuchesrunden pro Konzentration und Gruppe; FBS-Restriktion (weiß); Co (schwarz). Mittelwert \pm SEM (Standardfehler des Mittelwerts). * $p < 0,05$. One-way ANOVA Test, mit nachfolgendem Dunn's post Test.

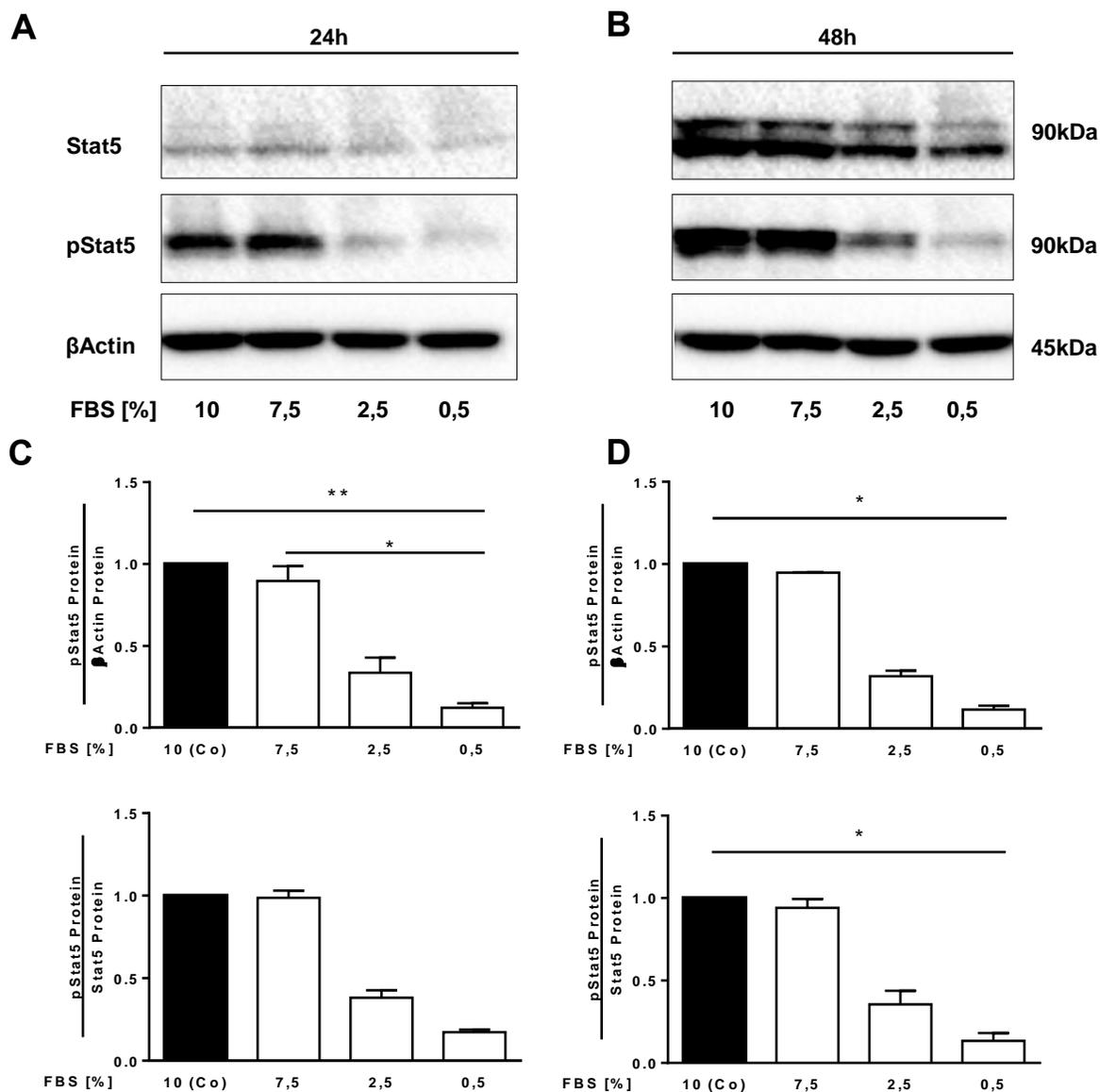


Abbildung 20: Proteinexpressionprofil für Stat 5 und aktiviertes Stat5 (Phosphorylierung; p) (Signalkaskade des GH-Systems) in mouse embryonic fibroblasts (MEF) nach FBS-Restriktion. A, B: repräsentativer Western Blot für pStat5 nach FBS-Restriktion nach 24h (A) und 48h (B). C, D: Densitometrische Auswertung der Expression von pStat5 nach 24h (C) und 48h (D) anhand der Western Blots. Die Intensität der phosphorylierten Stat5- (pStat5) Bande wurde in Bezug zur entsprechenden Bande der Ladungskontrolle β Actin im jeweiligen Stadium [Intensität (pStat5)/Intensität (β Actin)] bzw. zur entsprechenden von Stat5 im jeweiligen Stadium gesetzt [Intensität (pStat5)/Intensität (Stat5)]. n=5; FBS-Restriktion (weiß); Co (schwarz). Mittelwert \pm SEM (Standardfehler des Mittelwerts). *p<0,05, **p<0,005. One-way ANOVA Test, mit nachfolgendem Dunn's post Test.

Die Analyse des IGF1 Rezeptors (IGF1-R) zeigte hingegen eine Zunahme der Proteinexpression mit abnehmender FBS-Konzentration, vor allem bei einer 0,5 prozentigen FBS Konzentration nach 24 und 48 Stunden war die Reduktion der IGF1-R Proteimenge signifikant. (**Abbildung 21**).

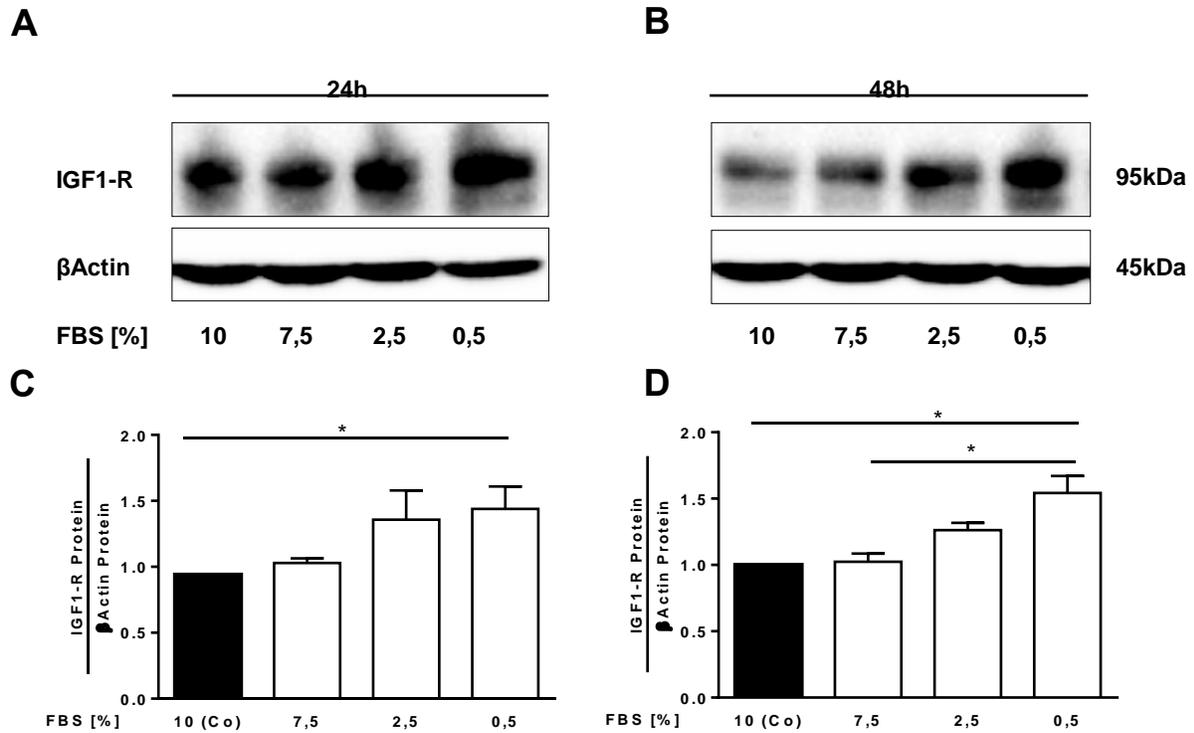


Abbildung 21: Proteinexpressionsprofil des Rezeptors für IGF1 (IGF-1R) in mouse embryonic fibroblasts (MEF) nach IUGR. A, B: repräsentativer Western Blot für IGF1-R nach FBS-Restriktion nach 24h (A) und 48h (B). C, D: Densitometrische Auswertung der Expression von IGF1-R nach 24h (C) und 48h (D) anhand der Western Blots. Die Intensität der IGF1-R Bande wurde in Verhältnis gesetzt zur entsprechenden Bande der Ladungskontrolle βActin im jeweiligen Stadium [Intensität (Rezeptor)/Intensität (βActin)]. n= 5 Versuchsrunden pro Konzentration und Gruppe; IUGR (weiß); Co (schwarz). Mittelwert ± SEM (Standardfehler des Mittelwerts). *p<0,05. One-way ANOVA Test, mit nachfolgendem Dunn's post Test.

Die Analyse des Proliferationsmarkers PCNA ergab keine signifikanten Veränderungen (**Abbildung 22A, B**). Der Apoptosemarker Caspase3 zeigte in seiner aktiven Form (cleaved Caspase3) ebenfalls keine signifikanten dynamischen Veränderungen infolge einer und FBS Konzentrationsminderung. (**Abbildung 23A, B**).

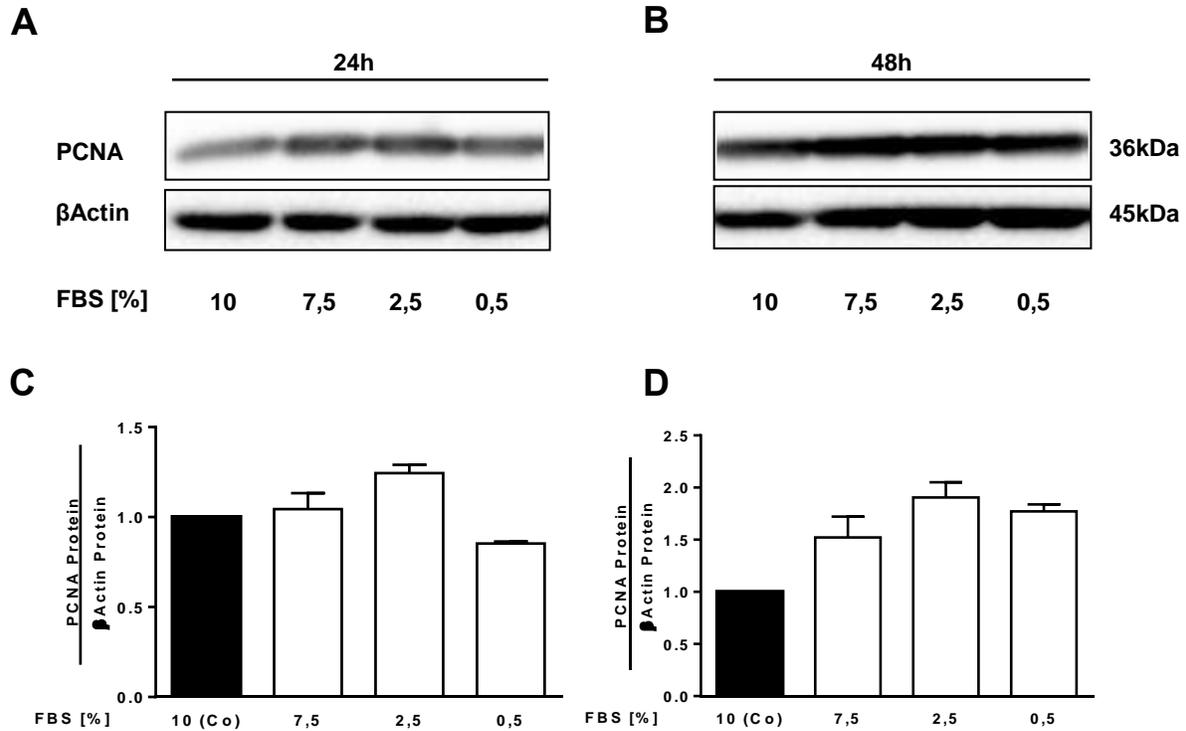


Abbildung 22: Proteinexpressionprofil für totales Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in mouse embryonic fibroblasts (MEF) nach IUGR. A, B: repräsentativer Western Blot für PCNA nach FBS-Restriktion nach 24h (A) und 48h (B). C, D: Densitometrische Auswertung der Expression von PCNA nach 24h (A) und 48h (B) anhand der Western Blots. Die Intensität der IGF-1R-Bande wurde in Verhältnis gesetzt zur entsprechenden Bande der Ladungskontrolle βActin im jeweiligen Stadium [Intensität (Rezeptor)/Intensität (βActin)]. n= 5 Versuchesrunden pro Konzentration und Gruppe; IUGR (weiß); Co (schwarz). Mittelwert ± SEM (Standardfehler des Mittelwerts). One-way ANOVA Test, mit nachfolgendem Dunn's post Test.

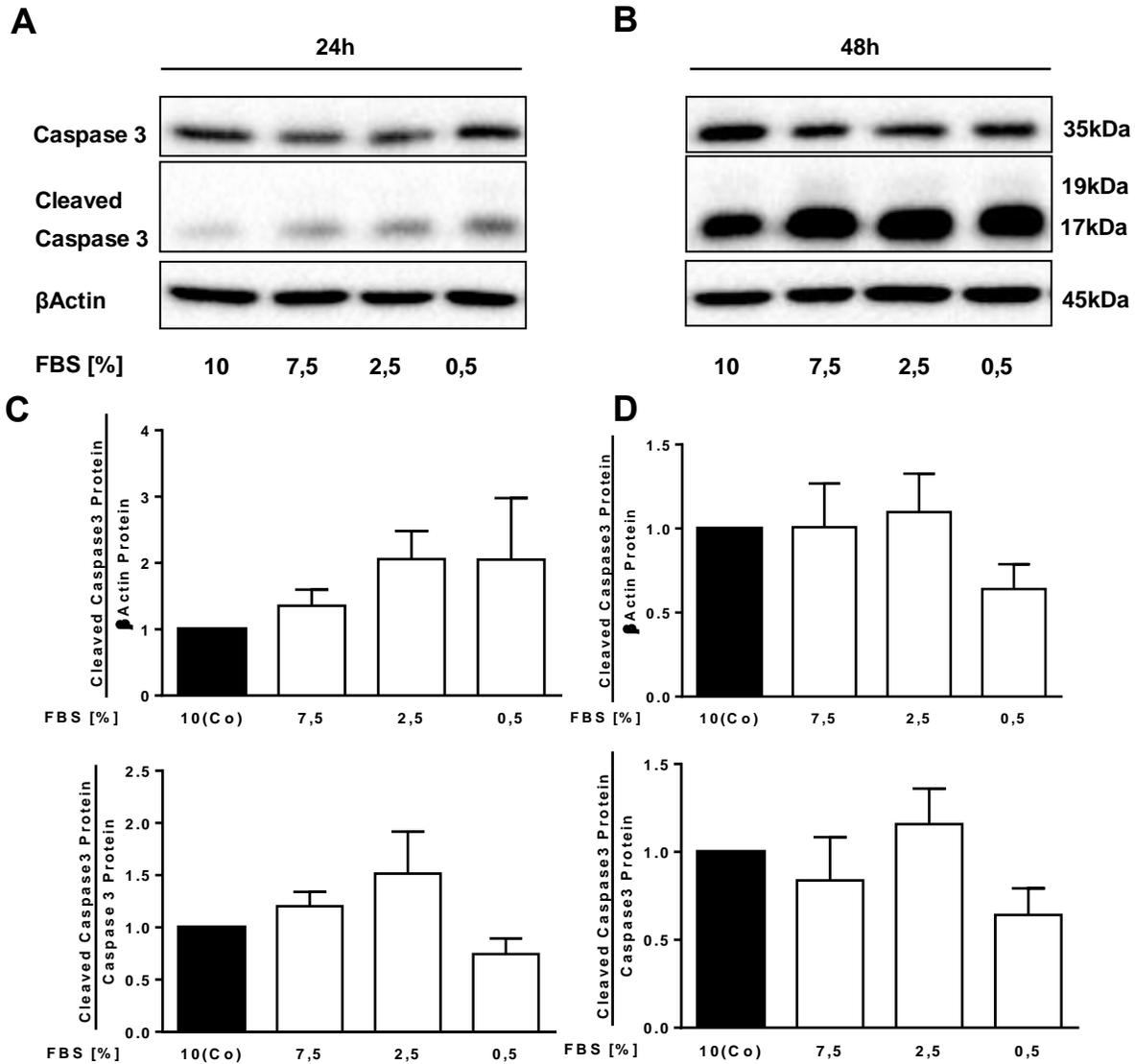


Abbildung 23: Proteinexpressionprofil für Caspase3 und aktivierte (cleaved) Caspase3 in mouse embryonic fibroblasts (MEF) nach FBS-Reduktion. A, B: repräsentativer Western Blot Caspase3 und aktivierte (cleaved) Caspase3 nach FBS-Reduktion nach 24h (A) und 48h (B). C, D: Densitometrische Auswertung der Expression von cleaved Caspase 3 nach 24h (C) und 48h (D) anhand der Western Blots. Die Intensität der cleaved Caspase3 Bande wurde in Bezug zur entsprechenden von β Actin im jeweiligen Stadium gesetzt [Intensität (cleaved Caspase)/Intensität (β Actin)] bzw. zur entsprechenden von Caspase3 im jeweiligen Stadium gesetzt [Intensität (cleaved Caspase)/Intensität (Caspase3)] n= 5 Versuchesrunden pro Konzentration und Gruppe; IUGR (weiß); Co (schwarz). Mittelwert \pm SEM (Standardfehler des Mittelwerts). One-way ANOVA Test, mit nachfolgendem Dunn's post Test.

4.3.2 Zellkulturversuche zur Stimulation mit GH und IGF1

Ziel dieses *in vitro* Modells war die funktionelle Charakterisierung der Rolle des GH/IGF-Systems in der Regulation von Proliferation und Apoptose. Dazu wurden Zellen der MEF-Linie mit unterschiedlich hohen Konzentrationen an GH und IGF1 in FBS (10%)-reichem Zellmedium inkubiert. Vor der Stimulation wurden die Zellen wie unter 4.3.1 beschrieben FBS-reduziertem Medium exponiert. Um ebenfalls Zeit abhängige Veränderungen zu überprüfen, erfolgte die Stimulation in einem 12 Stundenrhythmus für insgesamt 24 als auch 48 Stunden. Nach Abnahme der Zellkulturüberstände, Zellernte und anschließender Proteinisolierung, wurden Proteine bzw. deren Phosphorylierung für Apoptose [cleaved Caspase3 (aktiv) und Caspase3] und Proliferation (PCNA) untersucht.

Weder nach 24 noch nach 48 Stunden zeigten sich nach Stimulation mit IGF1 als auch mit GH signifikante Unterschiede verglichen zum Vehikel (**Abbildung 24A,C; 25A,C**). Höhere IGF1-Konzentrationen für 48 Stunden führten zu einem signifikanten Anstieg der Apoptose (cleaved Caspase3); die Zellproliferation (PCNA) war jedoch nicht signifikant verändert (**Abbildung 24B,D**). Die Stimulation mit GH führte nach 48 Stunden zu keiner signifikanten Veränderung der Apoptose und Proliferation (**Abbildung 25B,D**).

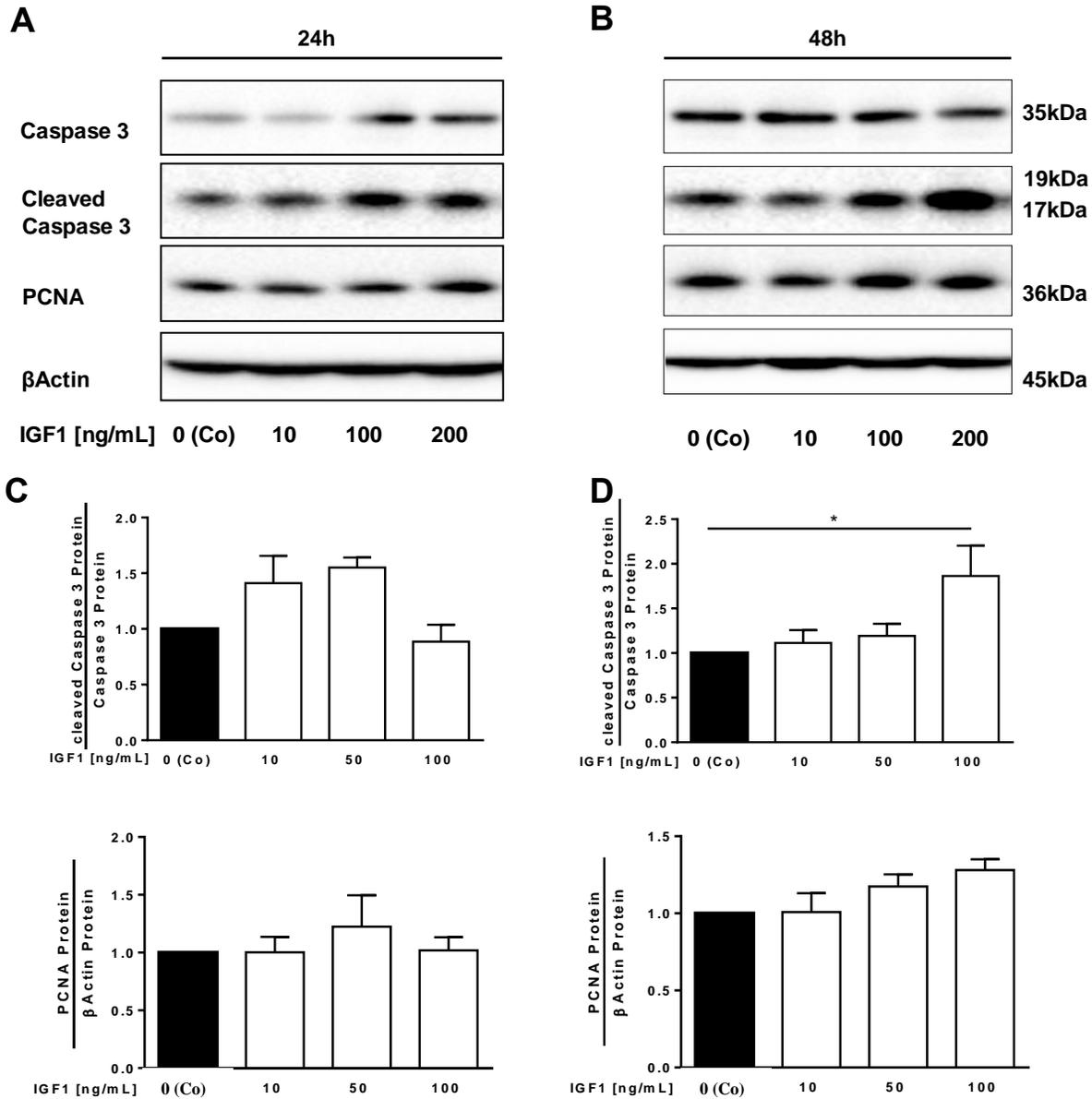


Abbildung 24: Proteinexpressionprofil der Marker für Apoptose (Caspase und aktivierte Caspase) und Zellproliferation (PCNA) in mouse embryonic fibroblasts (MEF) nach FBS-Reduktion und Stimulation mit IGF1 nach 24h und 48h und Vehikel Stimulierung der Kontrolle (Co). A, B: repräsentativer Western Blot für cleaved Caspase und PCNA nach FBS-Reduktion und Stimulation mit IGF1 nach 24h (A) und 48h (B). C, D: Densitometrische Auswertung der Expression der aktivierten Caspase (cleaved Caspase) und PCNA nach 24h (C) und 48h (D) anhand der Western Blots. Die Intensität der aktivierten Caspase (cleaved Caspase) Bande wurde auf die entsprechende Bande von Caspase im jeweiligen Zeitpunkt gesetzt [Intensität (cCaspase)/Intensität (Caspase)]. Die Intensität der PCNA-Bande wurde in Bezug zur entsprechenden Bande der Ladungskontrolle β Actin im jeweiligen Zeitpunkt gesetzt [Intensität (PCNA)/Intensität (β Actin)]. n= 5 Versuchsrunden pro Konzentration und Gruppe; Stimulationsgruppe mit IGF1 (weiß); Co (schwarz). Mittelwert \pm SEM (Standardfehler des Mittelwerts). One-way ANOVA Test, mit nachfolgendem Dunn's post Test.

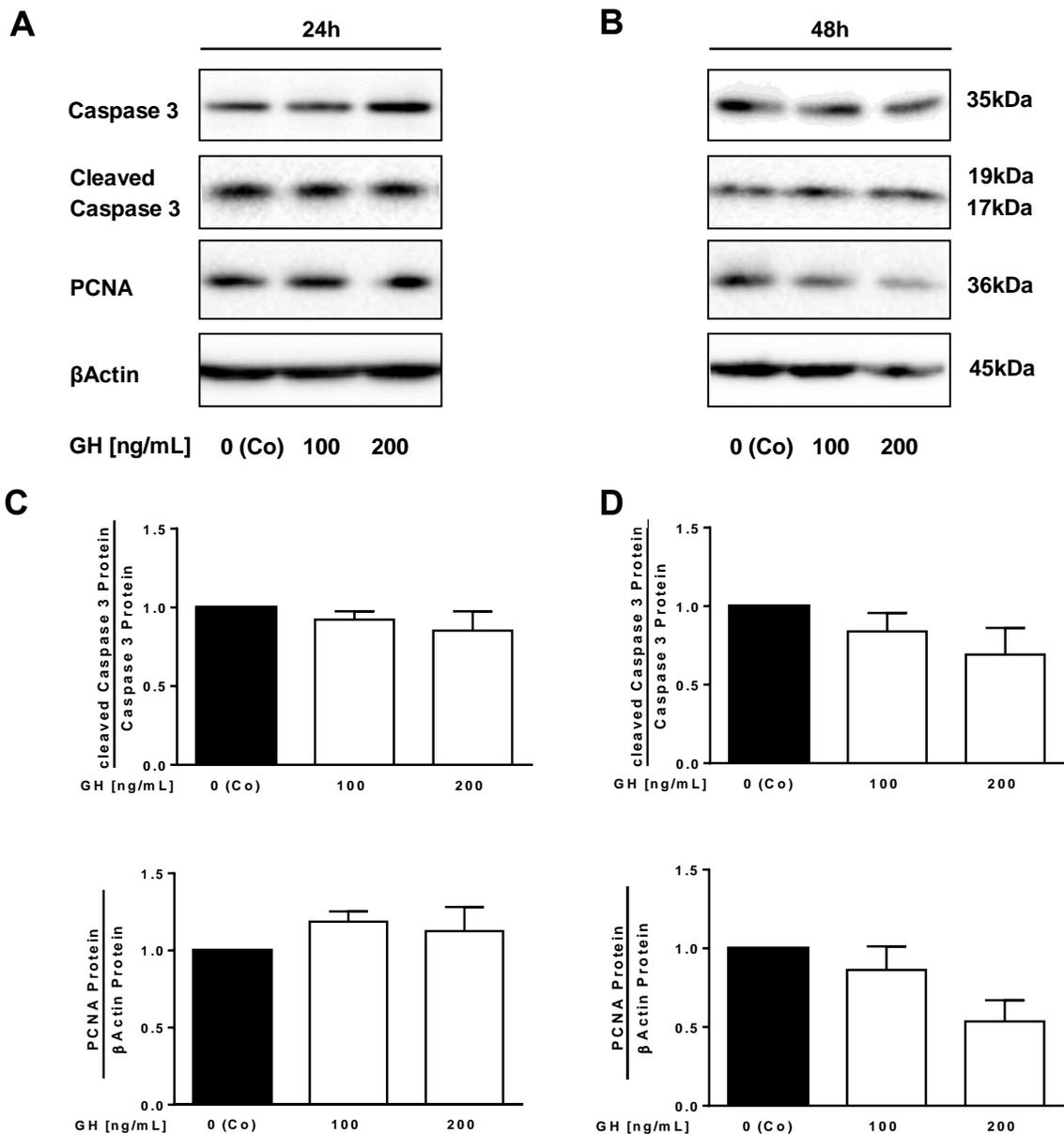


Abbildung 25: Proteinexpressionsprofil der Marker für Apoptose (Caspase und aktivierte Caspase) und Zellproliferation (PCNA) in mouse embryonic fibroblasts (MEF) nach FBS-Reduktion und Stimulation mit GH nach 24h und 48h und Vehikel Stimulierung der Kontrolle (Co). A, B: repräsentativer Western Blot für cleaved Caspase und PCNA nach FBS-Reduktion und Stimulation mit GH nach 24h (A) und 48h (B). C, D: Densitometrische Auswertung der Expression der aktivierten Caspase (cleaved Caspase) und PCNA nach 24h (C) und 48h (D) anhand der Western Blots. Die Intensität der aktivierten Caspase (cleaved Caspase) Bande wurde auf die entsprechende Bande von Caspase im jeweiligen Zeitpunkt gesetzt [Intensität (clCaspase)/Intensität (Caspase)]. Die Intensität der PCNA-Bande wurde in Bezug zur entsprechenden Bande der Ladungskontrolle β Actin im jeweiligen Zeitpunkt gesetzt [Intensität (PCNA)/Intensität (β Actin)]. n = 5 Versuchsrunden pro Konzentration und Gruppe; Stimulationsgruppe mit GH (weiß); Co (schwarz). Mittelwert \pm SEM (Standardfehler des Mittelwerts). One-way ANOVA Test, mit nachfolgendem Dunn's post Test.

4.3.3 Primäre neonatale pulmonale Fibroblasten

Um den postnatalen Einfluss einer IUGR auf pnpF zu untersuchen, erfolgte die Isolation und Analyse pnpF an P3 nach IUGR und Kontrolle. Aus den Proben wurden Proteine isoliert, die Konzentrationen gemessen und Western Blots für die Rezeptoren (GH-R und IGF1-R), für die intrazelluläre GH-Signalkaskade (pStat5 und totales Stat5) und Proliferationsmarker (PCNA und Cyclin D1) durchgeführt. Die Analyse der Rezeptoren für GH (GH-R) und IGF1 (IGF1-R) zeigte keine signifikant erniedrigte Expression des GH-R nach IUGR im Vergleich zur Kontrolle (**Abbildung 26; 27**). Die Untersuchung von phosphoryliertem Stat5 (aktives Stat5, pStat5) als intrazelluläre Signalkaskade für GH zeigte hingegen eine signifikante Zunahme von pStat5 bezogen auf totales Stat5 in den pnpF nach IUGR verglichen mit der Kontrollgruppe (**Abbildung 28A, B**).

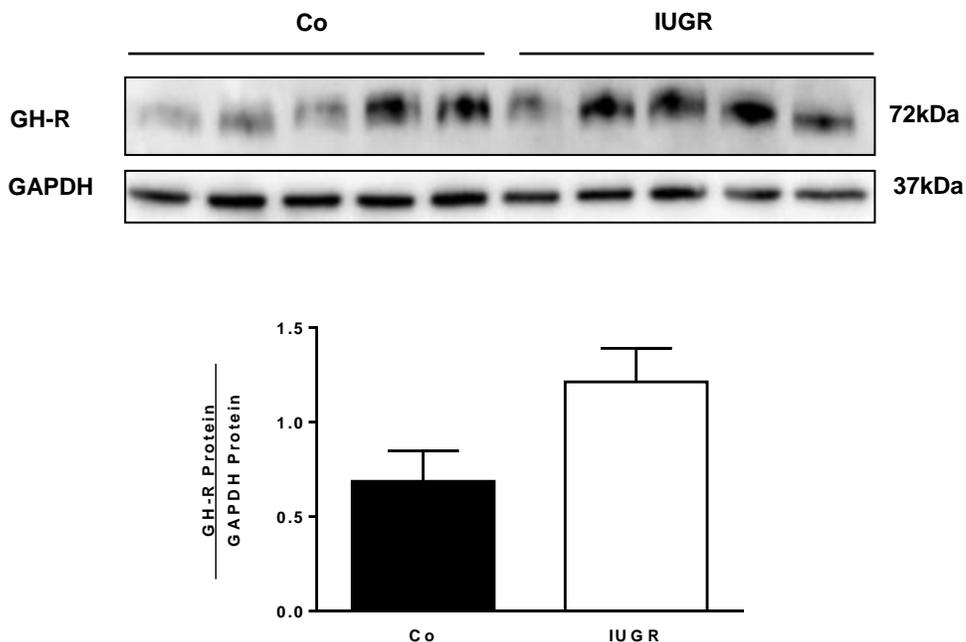


Abbildung 26: Proteinexpressionsprofil des Rezeptors für GH (GH-R) in primären neonatalen pulmonalen Fibroblasten nach IUGR. A: repräsentativer Western Blot für GH-R für den postnatalen Tag 3 (P3). B: Densitometrische Auswertung der Expression von GH-R anhand der Western Blots. Die Intensität der GH-R-Bande bzw. wurde in Verhältnis gesetzt zur entsprechenden Bande der Ladungskontrolle GAPDH im jeweiligen Stadium [Intensität (Rezeptor)/Intensität (GAPDH)]. n= 5 Tiere pro Stadium und Gruppe; IUGR (weiß); Co (schwarz). Mann-Whitney Test.

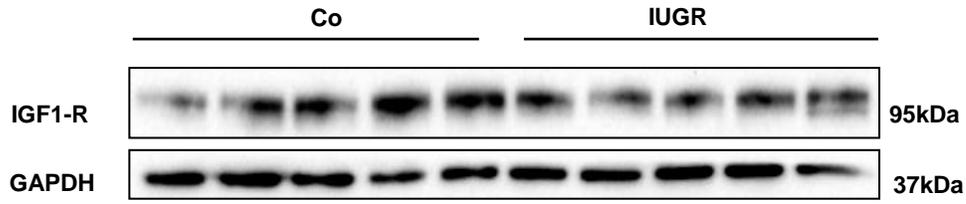
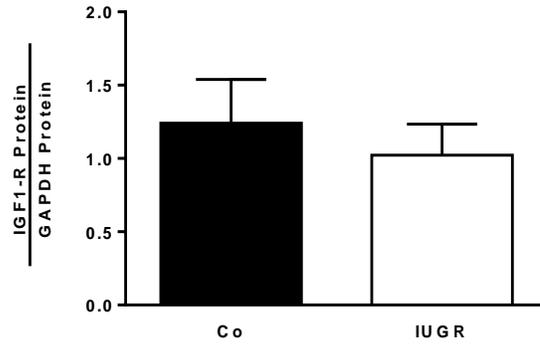
A**B**

Abbildung 27: Proteinexpressionsprofil des Rezeptors Insulin Like Growth Factor 1-Rezeptor (IGF1-R) in primären neonatalen pulmonalen Fibroblasten nach IUGR. A: repräsentativer Western Blot für IGF1-R für den postnatalen Tag 3 (P3). A: Densitometrische Auswertung der Expression von IGF1-R anhand der Western Blots. Die Intensität der IGF1-R-Bande bzw. wurde in Verhältnis gesetzt zur entsprechenden Bande der Ladungskontrolle GAPDH im jeweiligen Stadium [Intensität (Rezeptor)/Intensität (GAPDH)]. n= 5 Tiere pro Stadium und Gruppe; IUGR (weiß); Co (schwarz). Mittelwert \pm SEM (Standardfehler des Mittelwerts).

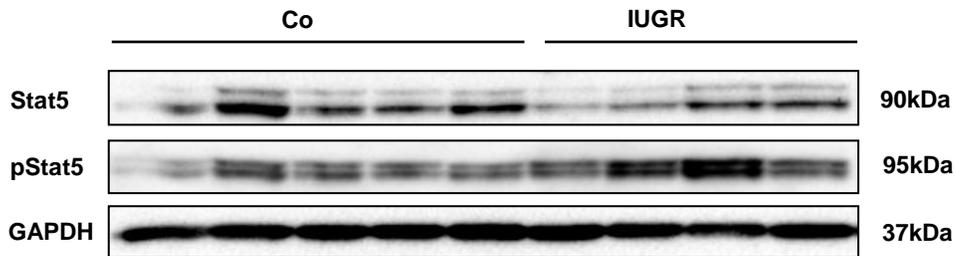
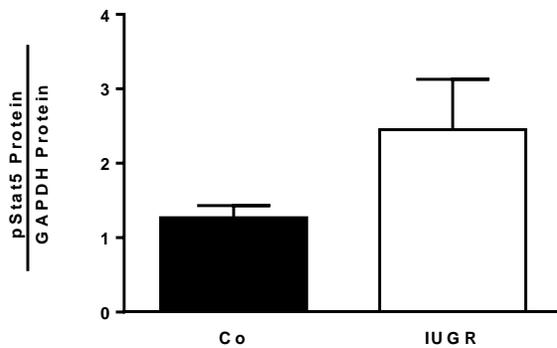
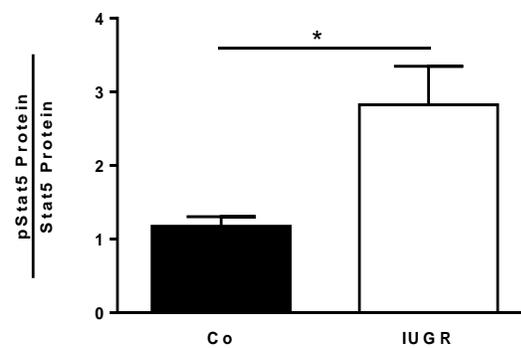
A**B****C**

Abbildung 28: Proteinexpressionsprofil für Stat5 und aktiviertes Stat5 (Phosphorylierung; p) (Signalkaskade des GH-Systems) in primären neonatalen pulmonalen Fibroblasten nach IUGR. A: repräsentativer Western Blot für Stat5 und pStat5 für den postnatalen Tag 3 (P3). B, C: Densitometrische Auswertung der Expression von Stat5 und pStat5 anhand der Western Blots. Die Intensität der Stat5-Bande bzw. der pStat5 wurde in Verhältnis gesetzt zur entsprechenden Bande der Ladungskontrolle GAPDH im jeweiligen Stadium [Intensität (Stat5 bzw. pStat5)/Intensität (GAPDH)] (B). Die Intensität der phosphorylierten Stat5- (pStat5) Bande wurde in Bezug zur entsprechenden von Stat5 im jeweiligen Stadium gesetzt [Intensität (pStat5)/Intensität (Stat5)] (C). n= 4-5 Tiere pro Stadium und Gruppe; IUGR (weiß); Co (schwarz). Mittelwert \pm SEM (Standardfehler des Mittelwerts). * $p < 0,05$. Mann-Whitney Test.

Um zu untersuchen, ob die gesteigerte pStat5 Aktivität in den primären neonatalen pulmonalen Fibroblasten mit Änderungen in der Proliferation assoziiert sind, wurde PCNA als Marker für Proliferation und CyclinD1 als Regulator des Zellzyklus` mittels Western Blot untersucht: Hier zeigten beide Marker eine signifikant erhöhte Proteinexpression verglichen mit den Fibroblasten von Kontrollungen (**Abbildung 29A, B; 30A, B**).

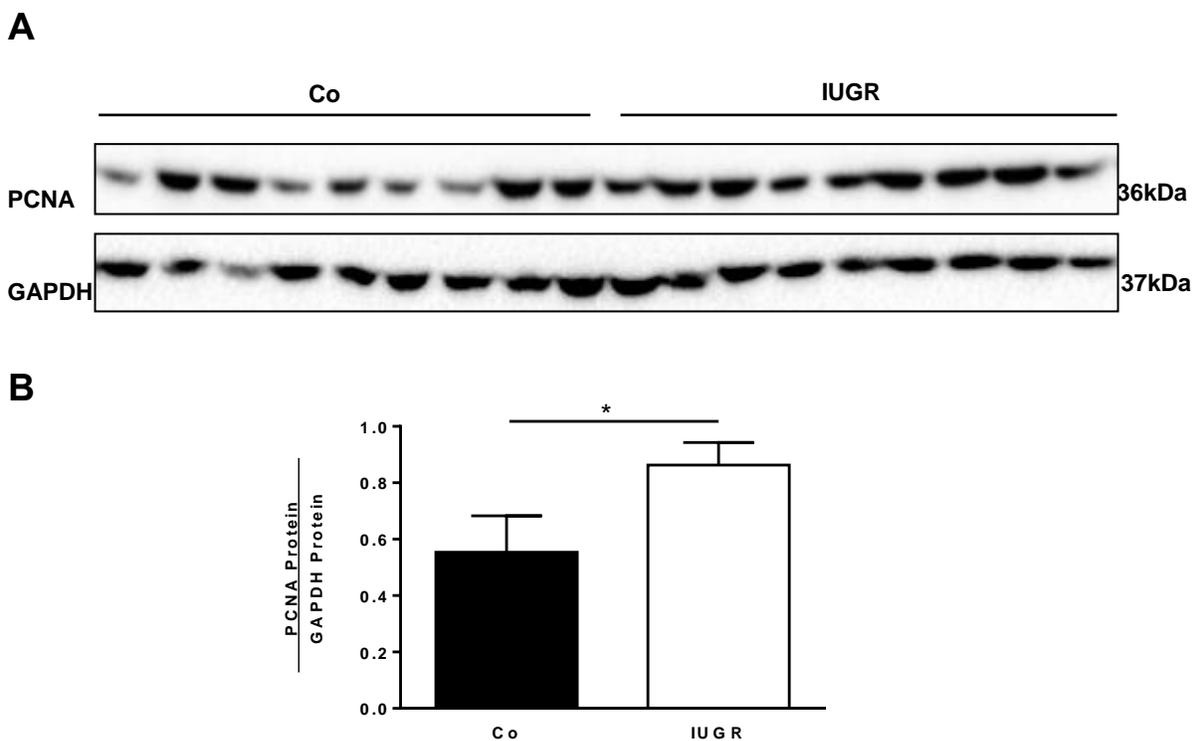


Abbildung 29: Proteinexpressionsprofil für PCNA in primären neonatalen pulmonalen Fibroblasten nach IUGR. A: repräsentativer Western Blot für PCNA für den postnatalen Tag 3 (P3). B: Densitometrische Auswertung der Expression von PCNA anhand der Western Blots. Die Intensität der phosphorylierten PCNA Bande wurde in Bezug zur entsprechenden von GAPDH im jeweiligen Stadium gesetzt [Intensität (PCNA)/Intensität (GAPDH)]. n= 5 Tiere pro Stadium und Gruppe; IUGR (weiß); Co (schwarz). Mittelwert \pm SEM (Standardfehler des Mittelwerts). *p<0,05. Mann-Whitney Test.

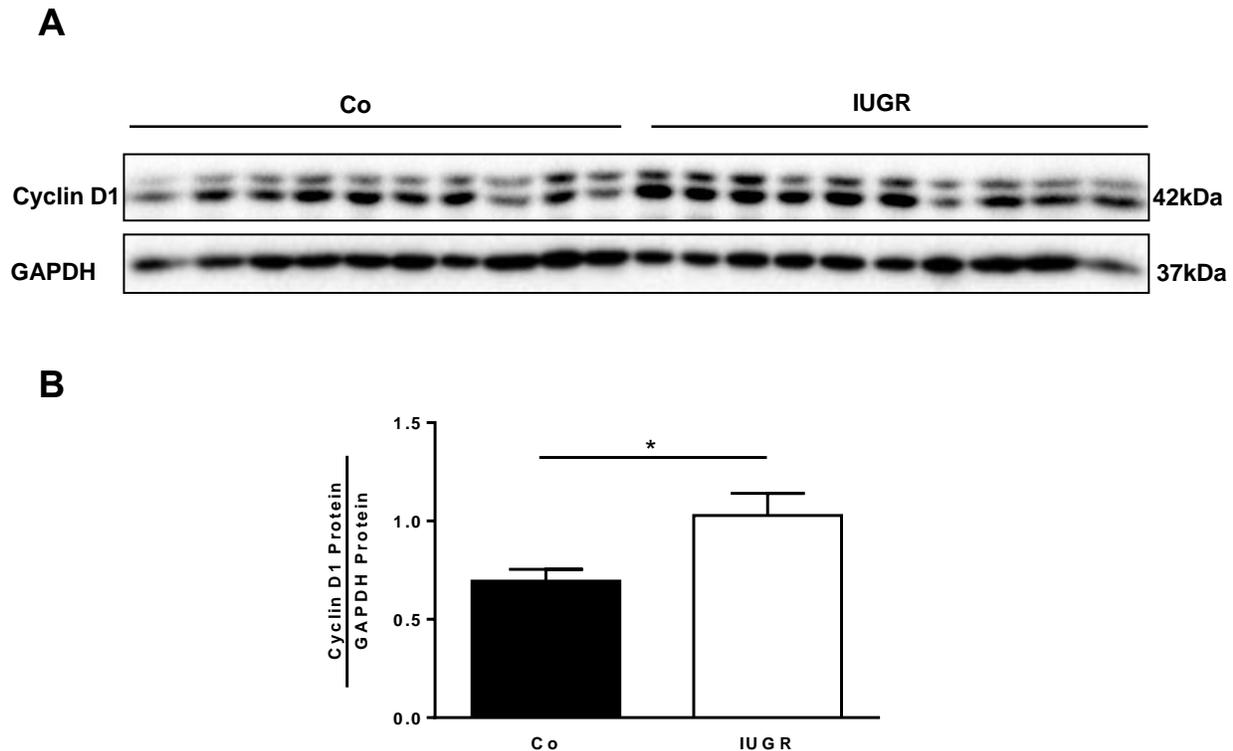


Abbildung 30: Proteinexpressionsprofil für Cyclin D1 in primären neonatalen pulmonalen Fibroblasten nach IUGR. A: repräsentativer Western Blot für Cyclin D1 für den postnatalen Tag 3 (P3). B: Densitometrische Auswertung der Expression von Cyclin D1 anhand der Western Blots. Die Intensität der Cyclin D1 Bande wurde in Bezug zur entsprechenden von GAPDH im jeweiligen Stadium gesetzt [Intensität (Cyclin D1)/Intensität (GAPDH)]. n= 5 Tiere pro Stadium und Gruppe; IUGR (weiß); Co (schwarz). Mittelwert \pm SEM (Standardfehler des Mittelwerts). * $p < 0,05$. Mann-Whitney Test.

Die *in vitro* Versuche demonstrieren zusammenfassend folgende Punkte:

- (1) Ein Nährstoffmangel beeinflusst das GH/IGF-System von embryonalen Fibroblasten.
- (2) Eine Stimulation mit GH und IGF1 hat geringe Effekte auf das Zellüberleben. Eine Inkubation der Zellen unter anderen Bedingungen (Serum-reduziertes Medium) lässt sich an dieser Stelle diskutieren und wird unter 5.3 näher erläutert.
- (3) PnpF der Lunge zeigen nach IUGR deutliche Veränderungen in der Aktivität des GH/IGF-Systems sowie des Zellüberlebens und -proliferation.

5. Diskussion

5.1 Einleitung

Ziel der vorliegenden Forschungsarbeit war es, einen möglichen neuen Zusammenhang zwischen dem GH/IGF-System der Lunge und einer gestörten Lungenentwicklung nach IUGR darzustellen. Im Zuge dessen wurden anhand der drei definierten Ziele (siehe 2.1) folgende maßgeblichen Untersuchungsergebnisse erzielt:

(1) Eine intrauterine Mangelernährung führt intrauterin zu einer Hemmung des GH- und IGF1-Signalweges; postnatal hingegen zu einer gesteigerten Aktivierung des GH- und IGF1-Signalweges in den Lungen nach IUGR.

(2) Mit der verstärkten Aktivierung des GH- und IGF1-Signalweges war eine gesteigerte Expression von Proliferationsmarkern sowie Komponenten der extrazellulären Lungenmatrix (ECM) assoziiert.

(3) Fibroblasten der Lunge spielen eine entscheidende Rolle während der Alveolarisation. Die Ergebnisse aus den Zellkulturversuchen zeigen, dass Fibroblasten aus Lungen nach IUGR ebenfalls eine verstärkte Aktivierung des GH/IGF-Systems sowie eine gesteigerte Proliferation aufweisen.

5.2 Veränderungen des GH/IGF-Systems in der Lunge nach einer Mangelernährung

5.2.1 GH-Signalkaskade

Der Fokus der vorliegenden Forschungsarbeit liegt auf der alveolären Phase der Lungenentwicklung, welche besonders wichtig für die Alveolenbildung und das Lungenwachstum ist. Sollte es zu Störungen während dieser kritischen Entwicklungsphase kommen, kann dies langfristige Folgen für Lungenstruktur und letztlich -funktion haben. Dabei scheint GH vor allem in der Phase der Alveolarisation eine wichtige Rolle zu spielen, da in diesem Stadium eine verstärkte Expression in der Lunge gemessen wird (75) und die Abwesenheit von GH in GH-mRNA Knockout Mäusen zu einer Änderung des Lungenproteoms führt (76). Klinische Studien beweisen, dass im

Zustand einer Unterernährung die GH-Werte normal oder erhöht sind und mit niedrigen IGF1-Spiegeln einhergehen. Daher gibt es einen möglichen Zustand der GH-Resistenz, mit einer unangemessenen Reaktion auf GH auf der Ebene der Leber. Dieser Zustand des erworbenen GH-Widerstands ist wahrscheinlich eine adaptive Antwort auf eine verminderte Energieaufnahme. Die jüngsten Erkenntnisse deuten darauf hin, eine GH-Resistenz während einer Mangelernährung aus einer Abnahme der Stat5-Phosphorylierung resultiert. Diese Abnahme wird durch eine verstärkte Aktivierung von Fibroblastenwachstumsfaktor-21 (FGF-21) und / oder Sirtuin1 (SIRT1) vermittelt, die wiederum durch die Mangelernährung verstärkt aktiviert werden (77). Unter Einbeziehung dieser Erkenntnisse, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass eine IUGR intrauterin in der Lunge zu einer GH-Resistenz führt: Intrauterin kommt es an E21 zu einer fast zehnfach erhöhten Expression von GH nach IUGR im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die komplementäre Untersuchung des GH-R zeigt im Gegensatz dazu eine erniedrigte Aktivität. Phosphoryliertes Stat5 (pStat5), als ein möglicher intrazellulärer Signalweg über den GH-R, ist in seiner Aktivität signifikant erniedrigt. Komplementär ist auch die Expression von IGF1 an E21 signifikant erniedrigt und wird unter dem Punkt 5.2.2 näher erläutert. Verfolgt man die Entwicklung weiter, so gleicht sich die Expression von GH postnatal zwischen der IUGR- und der Kontrollgruppe an. Der GH-R sowie pStat5 durchlaufen postnatal, vor allem an P23 dagegen eine starke Zunahme ihrer Aktivität verglichen zum intrauterinen Aktivitätszustand. GH und GH-R mRNA sind vor allem in mesenchymalen und epithelialen Zellen der neonatalen Rattenlunge nach der Geburt (4 bis 14 Tage) aktiv und somit während der Alveolarisation erhöht messbar (67,75,76). In Anbetracht der engen Bedeutung von GH zu IGF1, lässt sich anhand der Ergebnisse auch die autokrine und parakrine Rolle von GH in der Steuerung von IGF1 in der Lunge nach IUGR verdeutlichen, wenn man die inverse Aktivität beider Hormone vergleicht: IGF1 ist intrauterin nach IUGR in seiner Expression vermindert und steigt ebenfalls postnatal an. Es scheint wie bei der systemischen GH/IGF1-Achse auch in der Lunge ein Feedback-Mechanismus zwischen GH und IGF1 zu existieren; niedrige IGF1 Spiegel stimulieren wiederum die GH Expression (**Abbildung 10, 12**). Folglich wäre auch eine überleitende Aktivierung von IGF1 durch GH über pStat5 anzunehmen (78).

Des Weiteren deuten die postnatal wieder abfallenden GH mRNA Werte auf ein kompensatorisches Aufholwachstum der Lunge hin. Für diese Wachstumsform ist ein Abfall von systemisch wirkendem GH als Folge starker Insulin- und IGF Zunahme charakteristisch (79). Die Dynamik von GH und IGF1 in der Lunge ähnelt somit der der systemischen GH/IGF-Achse während eines Aufholwachstums. In Anbetracht der Dynamik des Gesamtgewichtes bei Rattennachkommen nach IUGR aus den Vorarbeiten (Abbildung 9), liegt ein GH/IGF1 vermitteltes spezifisches Aufholwachstum der Lunge nahe.

5.2.2 IGF1-Signalkaskade und Effekte auf Proliferation, Apoptose und die ECM

In der Lungenentwicklung kommt IGF1 vor allem während der alveolären Phase eine wichtige Rolle zu: Untersuchungen von Lungen gesunder Ratten zeigten in tierexperimentellen Versuchen, dass IGF1 und sein Rezeptor, der IGF1-R, während der sakkulären und alveolären Phase der Lungenentwicklung vermehrt exprimiert werden. IGF2 hingegen wird vermehrt während der kanalikulären und sakkulären Phase exprimiert (80,81). Tierexperimentelle Arbeiten haben gezeigt, dass in der gesunden Rattenlunge die mRNA Expression von IGF1 in der fetalen und postnatalen Entwicklung weitgehend konstant ist (82). Betrachtet man nun die Analyse zu IGF2, so zeigt sich eine zweifach erhöhte mRNA Expression im intrauterinen Stadium E21 nach IUGR. Zusätzlich ist die Expression von IGF1 bei IUGR an E21 stark erniedrigt und gleicht sich postnatal an P3 wieder der Kontrollgruppe an. Die Ergebnisse belegen somit die Annahme, dass eine Störung der Lungentwicklung nach IUGR bereits im sakkulären Stadium beginnt.

Die zentrale Komponente des IGF-Systems ist der IGF1-R. Dieser gehört mit dem Insulin Rezeptor (Insulin-R) zur Tyrosin Kinase Rezeptor Familie (RTKs) und weist auf Aminosäureebene eine sechzig prozentige Homologie mit dem Insulin Rezeptor (Insulin-R) auf (83). Die starke Strukturhomologie des Insulin Rezeptors (Insulin-R) mit dem IGF1 Rezeptor (IGF1-R) ermöglicht die potentielle Bindung von IGF1 auch an den Insulin-R, der ebenfalls eine wachstumssteigernde Wirkung ausübt (84). Insulin, IGF1 und IGF2 binden jedoch mit geringer Affinität zum nicht-kognitiven Rezeptor (85). Die Potenz von IGF2 den IGF1-Rezeptor zu aktivieren, liegt dabei deutlich unter der von IGF1 (68). Die mRNA Expression des Insulin-R war in der Analyse kongruent zur mRNA

Expression des IGF1-R verändert und stellt damit dem IGF1-R gegenüber keinem höheren Mehrwert dar. Neben dem IGF1-R und dem Insulin-R, existiert noch ein IGF2 Rezeptor (IGF2-R). Die Affinität zum IGF2 Rezeptor spielt jedoch eine untergeordnete Rolle, da es sich hierbei um keinen RTK handelt, sondern um einen Mannose-6-phosphat Rezeptor, welcher keine intrazellulären Signalwege aktiviert, sondern vielmehr als Clearance Rezeptor fungiert (86). Seine Funktion und Veränderung wurden deshalb nicht näher analysiert, zumal die Affinität von IGF2 zum IGF1-R und Insulin-R am stärksten ist (87). Wie bereits erwähnt haben Studien gezeigt, dass in der gesunden Rattenlunge die mRNA Expression des IGF1-R, ähnlich der von IGF1, relativ konstant ist (82). Nach IUGR kommt es postnatal jedoch zu keinen signifikanten Änderungen. Betrachtet man allerdings die Proteinexpression des IGF1-R sowie des intrazellulären Signalweges über phosphoryliertes Akt (pAkt), so sind diese nach IUGR verändert: Deutlich ist die Regulierung des IGF1-R im embryonalen Stadium (E21) nach IUGR mit signifikant erhöhter Expression und erhöhten Werten in der späten postnatalen Phase an P23. Die erhöhte Expression des Rezeptors an E21 ist womöglich als Kompensationsmechanismus für die intrauterin (E21) niedrige IGF1 mRNA Expression zu erklären. Eine intrazellulär verstärkte Signalaktivierung über Akt bleibt entsprechend der niedrigen IGF1 Expression aus: Die Analyse des Western Blots zu aktiviertem Akt (pAkt) zeigen intrauterin (E21) nach IUGR eine erniedrigte Aktivität dieser Signalkaskade des IGF1-R. Postnatal kommt es jedoch an P23 verglichen mit der Kontrollgruppe zu einer einer zweifachen Zunahme der Aktivität von pAkt. Es kommt also im Vergleich zu E21 postnatal im späten Stadium (P23) auch zu einer möglicherweise verstärkten Signaltransduktion von IGF1 über Akt. Diese Aktivierung übt eine antiapoptotische und mitogene Wirkung aus (88): phosphoryliertes Akt beeinflusst viele Prozesse, die an der Apoptose und Proliferation der Zelle beteiligt sind (89,90). Die Phosphorylierung von Akt führt zu einer Inaktivierung der Apoptosefaktoren Caspase 3 und Caspase 9 (91) und fördert so das Überleben der Zellen (**Abbildung 31**). So zeigt auch die Analyse von Caspase 3 in der Lunge einen Zusammenhang mit aktiviertem Akt: Intrauterin (E21) kommt es nach IUGR im Vergleich zur Kontrollgruppe durch eine erniedrigte Aktivität von phosphoryliertem Akt (pAkt) zu einer erhöhten Aktivität des Apoptotsemarkers Caspase 3. Die verhältnismäßig niedrige Aktivität der aktivierten Caspase 3 (cleaved Caspase 3) steigt verzögert früh

postnatal (P3) an. Der fehlende hemmende Einfluss von phosphoryliertem Akt auf Caspase 3 im intrauterinen Zustand nach IUGR führt somit verzögert postnatal zu einer erhöhten Apoptose in der Lunge und kehrt sich erst spät postnatal, bei signifikant erhöhtem pAkt nach IUGR, um. Es kann von einem direkten Einfluss von Akt auf die Aktivität von Caspase 3 und einem veränderten Gleichgewicht von Apoptose in der Lunge nach IUGR ausgegangen werden (**Abbildung 31**).

Daneben beeinflusst Akt die Zellzyklusprogression durch die Regulierung der Cyclin D1 Funktion, einem wichtigen Regulator der Zellzyklus-Progression und Transkriptions-Co-Regulator (92). Die Proliferation eukaryotischer Zellen wird im Nukleus an spezifischen Kontrollpunkten der Zellreplikation durch Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) kontrolliert. Die Aktivität von CDK unterliegt dabei der Steuerung von Phosphorylierungsprozessen zyklisch auf- und wieder abgebauter Cycline, die dadurch einen steigernden Effekt auf den Zellzyklus ausüben (93). Vor allem Cyclin D1 ist für den entscheidenden Eintritt der Zelle in den DNA-Replikationszyklus verantwortlich (94). Die Aktivität von Cyclin D1 ist durch Akt beeinflussbar (**Abbildung 31**). Aktiviertes Akt (pAkt) inhibiert den nukleären Export sowie den anschließenden Abbau von Cyclin D1 und damit dessen Inaktivierung (95). pAkt hemmt zudem die Komplexbildung des proliferativen nukleären Antigens (PCNA) mit einem Kinase-Inhibitor und hält dessen Funktion als DNA-Replikationsfaktor aufrecht (**Abbildung 31**). Dieser Komplex kann außerdem zusätzlich Cyclin D1 binden und somit den Zellzyklus hemmen (74,75). Neben Cyclin D1 stellt daher PCNA, eines der vielen Zielgene des Akt Signalweges für den Zellzyklus dar (96). Zusammenfassend können die Komponenten pAkt, Cyclin D1 und PCNA untereinander Komplexe bilden und sich in ihrer Aktivität positiv modulieren (**Abbildung 31**).

Die Western Blot Analysen demonstrieren, dass pAkt um mehr als das Doppelte seiner Aktivität am postnatalen Tag P23 nach IUGR im Vergleich zur Kontrollgruppe ansteigt. In Übereinstimmung ist die Aktivität von Cyclin D1 um das Vierfache an P23 nach IUGR im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht und zeigt auch im intrauterinen Stadium (E21) und frühen postnatalen Tag (P3) signifikant erhöhte Werte nach IUGR. Die beschriebene erhöhte Cyclin D1 Expression in der Lunge intrauterin als auch früh und spät postnatal nach IUGR, entsteht möglicherweise durch eine direkte Aktivierung von Akt. Eine Erklärung für die erhöhten Cyclin D1 Werte am intrauterinen Tag 21 (E21) trotz niedriger

IGF1 Werte und pAkt nach IUGR, lässt sich durch die erhöhte Aktivität des IGF1-R erklären. Neuere Untersuchungen zum IGF1-R haben gezeigt, dass es neben seiner Funktion als klassischer Signaltransduktor mit Tyrosinkinase Aktivität auch unmittelbar als Transkriptionsfaktor fungieren kann. Dazu transloziert der IGF1-R von der Zellmembran in den Zellkern. Im Zellkern interagiert der nukleäre IGF1-R mit dem Transkriptionsfaktor Lymphoid enhancer-binding factor 1 (LEF1), welcher dadurch die Aktivität des Cyclin D1 Promotors steigern kann (97). Die Aktivität von PCNA ist ähnlich zu der von Cyclin D1 reguliert: Intrauterin an E21 und postnatal an P23 ist die Aktivität signifikant erhöht. Da es sich im Western Blot um totales PCNA in seiner nicht aktiven Form handelt, sind Werte zur Aktivität nur in Betrachtung mit seiner aktiven Form aussagekräftig. Cyclin D1 und PCNA sind während der gesamten Lungenentwicklung dynamisch reguliert und signifikant in ihrer Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe verändert. Da es sich hierbei um die Analyse der gesamten Lunge handelt und Cyclin D1 und PCNA neben IGF1 und Akt von einer Reihe anderer Faktoren gesteuert werden, wurde der gezielte Einfluss von GH und IGF1 auf den Zellzyklus, die Proliferation und Apoptose auf pulmonale Fibroblasten *in vitro* Versuchen näher analysiert und werden im Verlauf der Diskussion näher erläutert.

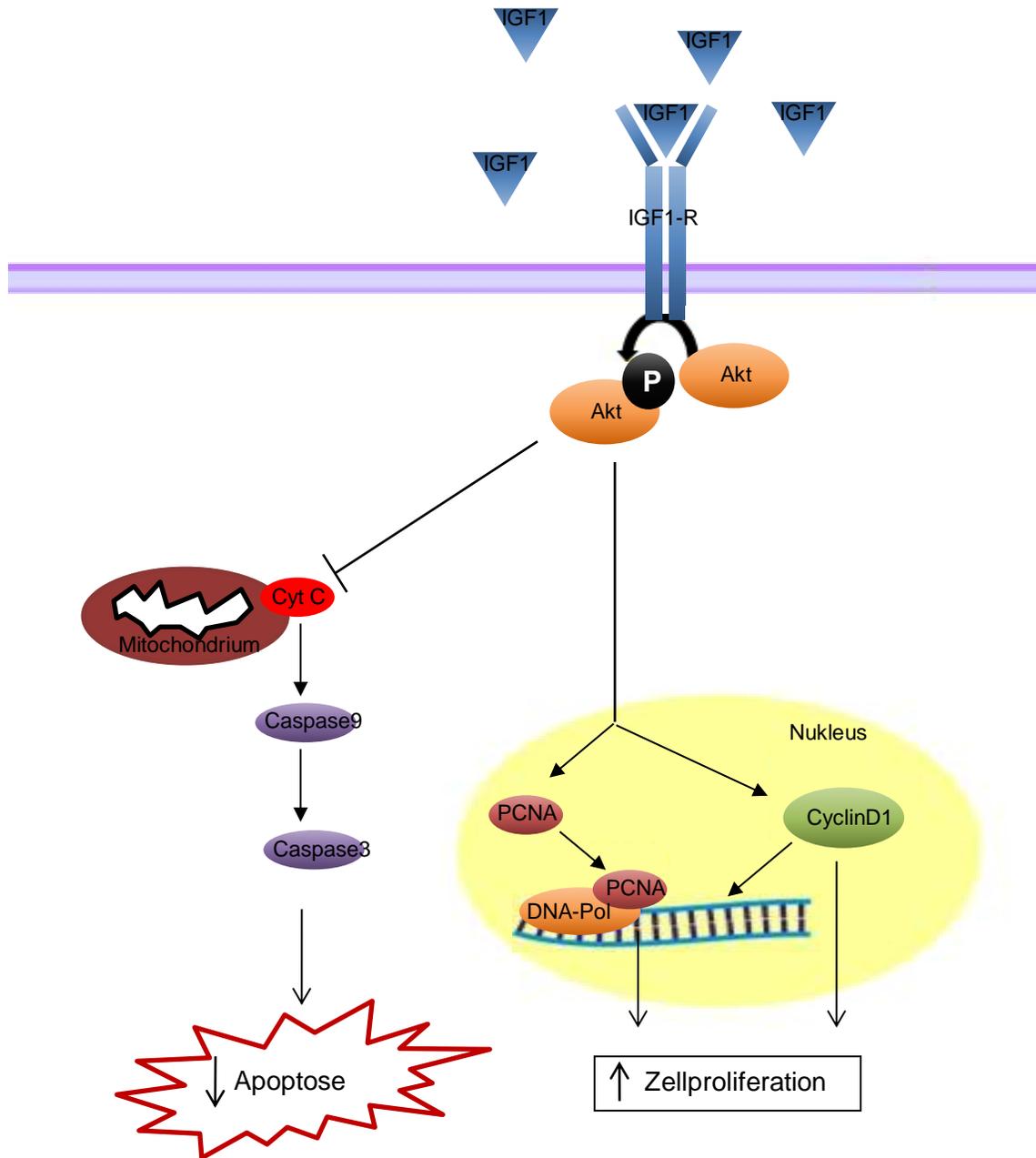


Abbildung 31: Schematische Darstellung als mögliches Arbeitsmodell zur Wirkung von Insulin Like Growth Factor (IGF1) auf Proliferation (B) und Apoptose (A) über den intrazellulären Signalweg von Akt in der Lunge. Bindung von IGF1 an die extrazelluläre Einheit des IGF1-Rezeptors (IGF1-R) mit führt zu Phosphorylierung und damit Aktivierung von Akt (pAKT). **A:** pAkt aktiviert Faktoren für die Zellreplikation (PCNA) und den Zellzyklus (Cyclin D1) und führt zu einer gesteigerten Zellproliferation. **B:** pAkt inhibiert die Cytochrom C (Cyt C) gesteuerte Aktivierung der Apoptose über Caspase 9, welche wiederum Caspase 3 aktiviert und führt somit zu einer Inhibierung von Apoptose.

Um einen möglichen Effekt systemisch wirkenden GHs und IGF1 auszuschließen, erfolgten Serumanalysen aus den Rattennachkommen an P3 und P23. Das systemisch zirkulierende GH unterliegt starken pulsatilen neuroendokrinen Schwankungen (98). Deshalb lassen sich über die Messung von GH keine gezielten Aussagen zu Konzentrationsunterschieden zwischen der IUGR- und der Kontrollgruppe machen. Da GH jedoch die Synthese des systemisch wirkenden IGF1 auf direktem Weg steuert und IGF1 keinen pulsatilen Schwankungen unterliegt, wurden Serumanalysen zu IGF1 angefertigt. Diese zeigten keine signifikanten Konzentrationsunterschiede an den postnatalen Tagen 3 (P3) und P23 zwischen IUGR- und Kontrolltieren. Es ist somit von pulmonal spezifischen Veränderungen auf GH und IGF1 in der Lunge auszugehen, die nicht durch Alterationen der systemischen neurohumoralen Achse beeinflusst wird.

Da die verstärkt proliferativen Effekte hauptsächlich während der Alveolarisation der Lunge stattfinden, ist auch von einer möglichen gestörten Alveolenbildung auszugehen. Dabei ist für die Bildung von alveolaren Gasaustauscheinheiten vor allem die Reifung der extrazellulären Lungenmatrix (ECM) von zentraler Bedeutung (99). Wichtige Komponenten der Lunge sind Elastin, Kollagen, Glykoproteine und Proteine der Basalmembran. Diese und andere Strukturproteine werden während der Lungenentwicklung in die Lungenstruktur eingebettet und haben einen tiefgreifenden Effekt auf die mechanischen Eigenschaften der Lunge nach der Geburt.

Kollagene verleihen der Lunge die nötige Zugspannung und sind Hauptkomponenten der Basalmembran sowie der Bronchien (100). Die Kollagensynthese kann dabei ebenfalls durch eine Mangelernährung verändert werden (101). Die Datenlage zeigt, dass im Rahmen einer Proteinmangeldiät in wachsenden und adulten Ratten eine signifikant reduzierte Kollagensynthese vorzufinden ist (33). Andererseits zeigen ebenfalls tierexperimentelle Forschungsarbeiten, dass es bei Rattennachkommen nach einer IUGR durch Proteinmangeldiät zu einer verstärkten Expression von inflammatorisch wirkenden Zytokinen in der Lunge kommt, die die Kollagensynthese im Lungenparenchym und der Atemwege verstärkt (36). Spiegelbildlich dazu ist auch die Kollagen mRNA Expression in der Lunge nach IUGR in unserem Tiermodell verändert. Die dynamische Analyse zeigt einen stärkeren Anstieg der Genexpression in Lungen nach IUGR als in Lungen der Kontrolltiere während der postnatalen Entwicklung, mit

einem Maximum am postnatalen Tag 23 (P23). Weitere Analysen zu Kollagen-modulierenden Faktoren, wie z.B. Entzündungsparametern, die in der Lunge nach IUGR verändert sind, könnten weiteren Anhalt für eine Erklärung liefern (48,23).

Elastin ist eines der wichtigsten Strukturproteine in den Alveolen der Lunge und verleiht dieser die elastischen Eigenschaften. Daneben ist es maßgeblich in der Alveolarisation beteiligt (102). Tierexperimentelle Versuche in Elastin Knockout Mäusen haben gezeigt, dass die Elastin Expression notwendig für die Ausbildung der terminalen Atemwege während der Alveolarisation ist (103). Auch die im Laufe der Lungenentwicklung verzeichnete Zunahme der Lungencompliance wird dabei auf die erhöhte Expression von Elastin zugeführt (104). Vor allem Tropoelastin wird während der Alveolarisation vermehrt und ausschließlich von Fibroblasten sezerniert (102,105,106). Die Halbwertszeit von Elastin beträgt dabei etwa so viel wie die gesamte Lebenszeitspanne einer Spezies und begründet damit, wieso Faktoren, die die Elastinogenese beeinflussen, ein so großes Potential besitzen Langzeiteffekte auf die mechanischen Eigenschaften der Lunge auszuüben (107). Eine Bandbreite an intrauterinen und frühen postnatalen Faktoren, die zu einer IUGR führen, wie z.B. Mangelernährung oder Hypoxie, sind mit einer veränderten Elastin Produktion assoziiert (108). So führte eine durch Mangelernährung induzierte IUGR postnatal in Ratten zu einer erhöhten Elastinproduktion in Lungen (28). Die Ergebnisse unserer Analyse der mRNA Expression von Elastin decken sich mit denen der zuvor beschriebenen Studienlage und zeigen postnatal signifikant stärker ansteigende Expressionswerte nach IUGR, mit bis zu doppelt erhöhten Anstieg der Werte an P23 bezogen auf E21 verglichen mit Kontrollen. Die Genexpression von Elastin kann dabei von einer Reihe an Faktoren reguliert werden. Neben Transforming growth factor beta (TGF- β), Kortikosteroiden und Vitamin D, ist auch der Effekt von IGF1 auf die Elastinsynthese beschrieben (109). Da die IGF1 Expression und vor allem die Aktivität von IGF1-R und des intrazellulären Signalweges über pAkt nach IUGR ebenfalls postnatal stark ansteigt, ist von einem möglichen Effekt von IGF1 auf die Elastinsynthese auszugehen. Vielmehr legen diese Daten eine Zunahme der Elastinsynthese durch einen verstärkten IGF1-R Signalweg in pulmonalen Fibroblasten nach IUGR nahe.

Zusammenfassend demonstrieren die Versuche, dass das GH/IGF-System der Lunge nach IUGR gestört ist. Es zeigt sich analog zum Aufholwachstum des Körpergewichts

eine Art Aufholwachstum oder *Rescue* (Englisch für Retten der Lunge: Intrauterin zeigt das GH/IGF-System eine deutlich abgeschwächte Aktivität, mit postnatal stark zunehmender Aktivität. Die postnatal stark zunehmende Aktivität des Systems geht mit einer verstärkten Aktivierung der Proliferationmarker von Cyclin D1 und PCNA einher. Auch die Marker für die ECM, vornehmlich Elastin und Kollagen1 α 1, sind postnatal im Verlauf signifikant nach IUGR erhöht.

5.3 Veränderung des GH/IGF-Systems in Fibroblasten nach einer Mangelernährung

Die Studienlage belegt eindeutig die wichtige Rolle von Fibroblasten während der Alveolarisation der Lunge (102,105,106). Vor allem die Population der Myofibroblasten spielt eine wichtige Rolle in dieser Phase. Diese enthalten kontraktile Elemente und exprimieren α smooth muscle actin (α -SMA) (110). Nach Ablauf der Alveolarisation gehen diese in die Apoptose und unterliegen somit streng regulierten Prozessen (111). Kommt es zu einer Störung dieses Gefüges, kann es zum einen bei einem Verlust der Myofibroblasten zu einer gestörten Alveolarisation oder aber auch zu einer übermäßigen Aktivierung kommen, wie z.B. bei Lungenschädigungen (110,112). Dass die letztere beschriebene Veränderung vermutlich IGF1 vermittelt ist, belegen Arbeiten von Anne Chetty et al: Autopsieuntersuchungen menschlicher fetaler Lungen mit Bronchopulmonaler Dysplasie (BPD) wiesen eine erhöhte IGF1-R Dichte im pulmonalen Mesenchym auf (113). Tierexperimentell konnte in neugeborenen Rattenlungen nach Sauerstofftherapie der IGF1-R in Bereichen verstärkter Proliferation nachgewiesen werden (114).

Um einen möglichen direkten Einfluss einer Mangelernährung und den Effekt von GH und IGF1 auf pulmonale Myofibroblasten zu untersuchen, wurden *in vitro* Versuche durchgeführt und zwei verschiedene Zellreihen untersucht (Abbildung 8). Da die Analyse der Lunge intrauterin und postnatal klar abzugrenzende Veränderungen des GH/IGF-Systems zeigte, mit einer Hemmung des Systems intrauterin und postnatal verstärkter Aktivierung, erfolgten gezielte Untersuchungen zu Fibroblasten im Zustand während und nach einer Mangelernährung.

5.3.1 Veränderungen des GH/IGF-Systems in Fibroblasten

5.3.1.1 Nährstoffmangel-Versuch – Einfluss von Mangelernährung auf MEF

Die Analyse der MEF Zellreihe diene zur näheren Untersuchung ihres Verhaltens während einer Mangelernährung (Abbildung 8). Ziel dieser Versuchsreihe war es somit, Rückschlüsse auf das Verhalten pulmonaler Fibroblasten im embryonalen Stadium während einer IUGR ziehen zu können. Dabei zeigte sich im Nährstoffmangel-Versuch eindeutig, dass eine Mangelernährung durch reduziertes FBS einen signifikanten Effekt auf das GH/IGF1 System von MEF-Zellen hat: Mit abnehmender FBS-Konzentration, die den Grad der Mangelernährung widerspiegelt, kam es zu einer erniedrigten Expression des GH-R, Abnahme der Aktivität der intrazellulären Signalkaskade pStat5 sowie zu einer erhöhten Expression des IGF1-R. Die Ergebnisse zeigen zudem, dass die Hemmung des GH/IGF-Systems mit zunehmender Reduktion des FBS (Mangelernährung) assoziiert ist. Betrachtet man die Ergebnisse zu Proliferation anhand der PCNA Expression, so bleibt eine signifikante Veränderung aus. Es lassen sich jedoch Tendenzen einer gesteigerten Aktivität von PCNA mit zunehmend reduzierter FBS-Konzentration nach 48 Stunden erkennen. Ein mögliches Erklärungsmodell könnte die dabei signifikant erhöhte IGF1-R Aktivität spielen, die eine verstärkte IGF1-R vermittelte intrazelluläre Signalkaskade auslöst und die Degradierung von PCNA verhindert (90). Auf ähnliche Weise wäre auch die tendenziell erniedrigte Aktivität der cleaved Caspase3 bei FBS-Konzentrationen von 0,5% nach 24 und 48 Stunden zu erklären sein, die durch ein verstärktes IGF1-R *Signaling* abgebaut wird (91).

Stellt man diese Daten den Ergebnissen aus den *in vivo* Western Blot Analysen der Lunge an E21 gegenüber, so lässt sich eine identische Expression bzw. Aktivität dieser Proteine feststellen. Es ist also von einem hemmenden Einfluss einer IUGR auf das GH/IGF-System pulmonaler Fibroblasten auszugehen und sich auf die gesamte Lunge auswirkt.

5.3.2 Stimulationsversuch – Einfluss von GH und IGF1 auf MEF

Um im Anschluss zu testen, ob Änderungen des GH- und IGF1 Spiegels in der Lunge mit Veränderungen von Proliferation und Apoptose in Fibroblasten einhergehen, wurden MEF-Zellen im Anschluss selektiv mit GH und IGF1 in steigenden Konzentrationen und zwei unterschiedlichen Zeitpunkten (24 und 48 Stunden) stimuliert und untersucht. Ein signifikant gesteigerter Effekt von IGF1 auf die Proliferation bleibt aus. Wider Erwarten ist der Apoptosemarker cleaved Caspase 3 nach 48 Stunden erhöht, nachdem diese in der Lunge postnatal bei erhöhter Aktivität des IGF1-R Signalweges tendenziell, aber nicht signifikant erniedrigt war. Ein direkter Effekt von GH auf Proliferation und Apoptose bleibt ebenfalls aus. GH könnte dabei, wie auch in anderen Forschungsarbeiten vermutet, für pulmonale Fibroblasten in seiner Bedeutung als auto- und parakriner Mediator vornehmlich von Bedeutung sein (76). Dass für IGF1 kein eindeutiger Dosis- und zeitabhängiger Effekt bewiesen werden konnte, lässt sich durch verschiedene Argumente diskutieren: Zum einen wirken GH und IGF synergistisch. Eine bessere Vergleichbarkeit der Potenz hinsichtlich Apoptose und Proliferation, wäre durch eine Co-stimulation von GH und IGF1 zu erzielen. Betrachtet man die Wahl der Dosierung von IGF1, so haben tierexperimentelle Arbeiten anderer Forschungsgruppen darlegen können, dass IGF1 in der Konzentration von 100 ng/ml die ECM muriner Lungenfibroblasten, Mouse lung fibroblasts (MLF), sowie humaner fetalen Lungenfibroblasten signifikant stimuliert (113,115). Eine Inkubation der MEF Zellen in FBS-reduziertem statt in FBS-reichem Medium könnte den Einfluss anderer stimulierender Nährstofffaktoren ausschalten. Zusätzlich ist IGF1 zu 98% an Transporterproteine, sogenannte IGF-binding proteins (IGFBP) gebunden, die die Halbwertszeit (HWZ) des Hormons im Serum erhöhen. Für IGFBP-3, den Haupttransporter für IGF1, konnte dabei eine lungenspezifische Aktivität nachgewiesen werden (116). Während die Halbwertszeit des freien IGF1 mit 4-20 Minuten angegeben wird, verlängert sie sich auf bis zu 18 Stunden gebunden an IGFBP (116). IGF1 übt daher in seiner freien Form vermutlich bereits früher als 24 Stunden einen stimulierenden Effekt auf die Proliferation aus. Dazu demonstriert eine Studie zum proliferativen Effekt von IGF1 auf neuronale Zellen des dorso-lateralen Kortex von Ratten, dass nach IGF1 Stimulation bereits eine Erhöhung von pAkt nach 30 Minuten und Cyclin

D1 nach 6 Stunden gemessen werden kann (117). Durch die Zugabe von IGFBP-3, könnte man möglicherweise den gewünschten Effekt nach 24 Stunden besser messen.

5.3.3 Postnatale Veränderungen des GH/IGF-Systems in pnpF

Durch die Isolation der pnpF lassen sich genaue Analysen hinsichtlich der postnatalen Veränderungen ihres GH/IGF-Systems nach IUGR durchführen (Abbildung 8). Dabei zeigten pnpF aus IUGR Rattenlungen signifikante Unterschiede des intrazellulären Mediators Stat5 (pStat5). Es kommt also möglicherweise zu einer verstärkten pStat5 vermittelten GH-R Signalkaskade in den pnpF nach einer IUGR. Die Expression des IGF1-R hingegen ist nicht verändert. Eine zusätzliche Analyse von Akt könnte dabei noch mehr Aufschluss über die IGF1-Signalkaskade geben. Entsprechend des verstärkten GH-R Signalwegs, präsentieren die Proliferationsmarker Cyclin D1 und PCNA ebenfalls eine signifikant erhöhte Aktivität. Betrachtet man diese Ergebnisse in Zusammenschau mit den Ergebnissen der postnatalen Entwicklung an P3 und P23 aus den *in vivo* Versuchen, so korrelieren diese Daten umfassend. Sie weisen eine postnatal verstärkte Aktivität des GH/IGF-Systems in pulmonalen Fibroblasten nach IUGR auf, mit stark stimulierendem Effekt auf Cyclin D1 und PCNA und damit einer gesteigerten Zellproliferation. Eine IUGR führt somit postnatal zu einer verstärkten Aktivierung von pulmonalen Myofibroblasten.

Die Zusammenschau der Daten weist auf eine pulmonal intrinsische Veränderung pulmonaler Fibroblasten nach einer IUGR hin (**Abbildung 32**). Auf eine Mangelernährung reagieren pulmonale Fibroblasten mit einer verringerten Aktivität des GH/IGF-Systems, die durch eine Erhöhung der IGF1-R Aktivität zu kompensieren versuchen scheint (**siehe 5.2.2.1**). Postnatal reagieren die Zellen wiederum mit einer Aktivierung des Systems und verstärktem zellproliferativen Verhalten (**5.3**). Dass diese Veränderungen eine Auswirkung auf die gesamte Lunge haben, demonstriert die Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen der Lungenanalyse: Im Nährstoffmangel-Versuch kommt es zu einer Hemmung des GH- und IGF1-Signalweges, entsprechend den Ergebnissen der Lunge im intrauterinen Stadium (E21). Die Analyse der pnpF zeigt eine postnatal verstärkte Aktivierung des GH-Signalweges und der Proliferation, entsprechend den Ergebnissen

Lunge an P3 und P23. Die erhöhten mRNA Expressionswerte der ECM in der Lunge können ebenfalls mit dem verstärkt aktiven GH/IGF-System der pulmonaler Fibroblasten in Verbindung gebracht werden, da *in vitro* Versuche bereits einen Effekt von IGF1 über die PI-3 kinase auf die Akt vermittelte Aktivierung von Collagen1 α 1 nachweisen konnten (118). Für eine genauere Aussage müssten an dieser Stelle jedoch weitere Untersuchungen folgen.

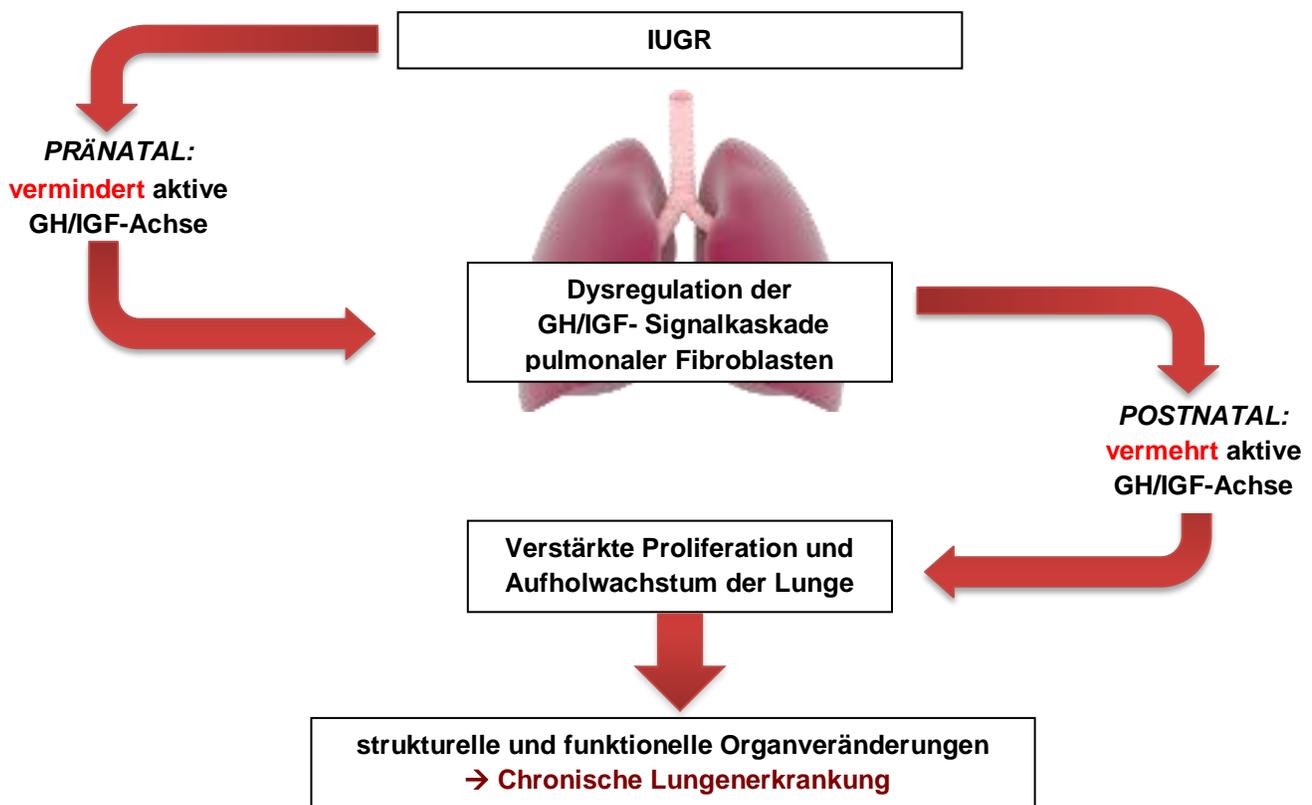


Abbildung 32: Schema zur Bedeutung des pulmonal intrinsischen GH/IGF-Systems der Lunge in der Pathogenese der IUGR assoziierten Lungenerkrankung. Pränatal führt eine IUGR zu einer vermindert aktiven GH/IGF-Signalkaskade der Lunge. Genauer betrachtet handelt es sich um eine Dysregulation der GH/IGF-Signalkaskade pulmonaler Fibroblasten. Postnatal kommt es nach IUGR zu einer vermehrten Aktivierung dieser Achse, die sich in einer verstärkten Proliferation der pulmonalen Fibroblasten äußert und einem Aufholwachstum der Lunge. führt durch eine gestörte pulmonale GH/IGF-Achse zur einer gestörten Homöostase pulmonaler Fibroblasten. Diese ist für die beobachteten strukturellen und funktionellen Organveränderungen und chronischen Lungenerkrankungen nach IUGR verantwortlich.

5.4. Ausblick und translationaler Forschungsansatz

Die Untersuchungen zu dem Einfluss von GH und IGF1 nach IUGR auf pulmonale Fibroblasten liefern erste Hinweise für eine zukünftige Entwicklung therapeutisch wirksamer Substanzen. Weiterführende Arbeiten könnten die Beziehungen zwischen Strukturen der Lunge und ihren molekularen Prozessen nach einer IUGR entschlüsseln und translationale Ansätze weiter ausbauen. Denkbare Strategien wären z.B. Substanzen, die den IGF1-Rezeptorsignalweg beeinflussen. Tierexperimentelle Arbeiten haben bereits einen isolierten Effekt von IGF1 auf die Kollagensynthese über eine Aktivierung von Akt über die Phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3 kinase) nachgewiesen. Ein durch die MAP-kinase induzierter Effekt konnte dabei gezielt durch den MAP-Kinase Inhibitor PD 98059 ausgeschlossen werden (118). So wäre es denkbar in Folgeprojekten GH/IGF1 Knockout-Modelle zu etablieren sowie ebenfalls den Einfluss von Inhibitoren des GH- oder IGF1-Signalweges auf pulmonale Fibroblasten nach IUGR zu untersuchen. IGF1-R Antikörper haben sich bereits als wirksam erwiesen und führen zu einer Aufhebung der IGF1 vermittelten Proliferation pulmonaler Fibroblasten (118). Die Identifizierung neuer Targets könnte gezielt das therapeutische Outcome Neugeborener verbessern und bei intrauteriner Applikation womöglich die Inzidenz IUGR-assoziierter Lungenerkrankungen senken.

6. Zusammenfassung

Intrauterine Wachstumsrestriktion (IUGR) ist ein Risikofaktor für die Entstehung chronischer Lungenerkrankungen (CLD), die durch eine reduzierte Alveolenzahl und begleitende Fibrose gekennzeichnet ist. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten zuvor zeigen, dass eine IUGR in der Ratte mit einem postnatalen Aufholwachstum einhergeht. Da die Wachstumshormone Growth Hormone (GH) und der GH regulierte Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF 1) maßgeblich das Wachstum und die Entwicklung regulieren, stellten wir folgende zwei Hypothese auf: (1) IUGR führt zu einer Fehlregulierung der GH / IGF1-Signalgebung in der Lunge und (2) wirkt sich als Folge auf die Entwicklung und Funktion neonataler Lungenfibroblasten aus. In Wistar-Ratten wurde das etablierte Tiermodell der isokalorischen Proteinmangeldiät während der Schwangerschaft, zur IUGR Induktion angewandt. IUGR- und Kontrolltieren wurden am 21. Tag (E21) der Schwangerschaft sowie postnatal am 3. (P3) und 23. Tag (P23) die Lungen entnommen. Murine embryonale Fibroblasten (MEF) und primäre neonatale Fibroblasten der Rattenlunge (pnpF) aus postnatalen IUGR- und Kontrolltieren wurden für Zellkulturversuche verwendet. In der *intrauterinen Phase* (E21) der Lunge nach IUGR, kam es zu einer verminderten Aktivität des GH-Systems (Reduktion des GH-Rezeptors (GH-R), Stat5 Signalkaskade und IGF1 Expression). In der *postnatalen Phase* (P3–P23) kam es hingegen zu einer signifikant gesteigerten Aktivität des Systems (Erhöhung von GH mRNA, GH-R Protein, der proliferativen Stat5/Akt Signalkaskade) sowie der Proliferationsmarker PCNA und Cyclin D1. Die Ergebnisse korrespondieren dabei mit dem zuvor gezeigten postnatalen Aufholwachstum. Dass es sich dabei um einen lungenspezifischen Effekt handelt, konnte durch fehlende Konzentrationsunterschiede systemischen IGF1s in IUGR- und Kontrollseren nachgewiesen werden. Im Hinblick auf die Lungenfunktion, zeigten die Hauptkomponenten der Extrazellulärmatrix in Alveolen (Elastin und Collagen1 α 1) postnatal nach IUGR eine erhöhte mRNA Expression auf. In Zellkulturversuchen konnten diese Effekte reproduziert und ferner der Einfluss von IUGR auf Myofibroblasten nachgewiesen werden. Es zeigte sich äquivalent zu den Ergebnissen der Rattenlunge an E21, dass eine Nährstoffmangelversorgung die GH/IGF1-Signalgebung und Proliferation hemmt. Auch die gesteigerte Stat5 Aktivierung und

Proliferation nach einer Nährstoffmangelversorgung, konnte, entsprechend den Ergebnissen der Rattenlunge an P3 und P23, reproduziert werden. Die Untersuchungen liefern Hinweise für einen neuen, potentiellen Mechanismus in der Entstehung von IUGR assoziierten Lungenerkrankungen durch einen direkten Einfluss der IUGR auf das GH/IGF1 System pulmonaler Myofibroblasten. Weiterführende Arbeiten könnten dabei zur Entwicklung neuer, wirksamer Therapien bei IUGR assoziierten Lungenerkrankungen beitragen.

7. Literaturverzeichnis

1. Saleem T, Sajjad N, Fatima S, Habib N, Ali SR, Qadir M. Intrauterine growth retardation--small events, big consequences. *Ital J Pediatr* [Internet]. 2011 [cited 2016 Sep 12];37:41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21899747>
2. Lapillonne A. [Intrauterine growth retardation and adult outcome]. *Bull l'Académie Natl médecine* [Internet]. 2011 Mar [cited 2016 Sep 12];195(3):477-84; discussion 484-5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22292298>
3. Chatelain P. Children born with intra-uterine growth retardation (IUGR) or small for gestational age (SGA): long term growth and metabolic consequences. *Endocr Regul* [Internet]. 2000 Mar [cited 2016 Sep 12];34(1):33–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10808251>
4. Longo S, Bollani L, Decembrino L, Di Comite A, Angelini M, Stronati M. Short-term and long-term sequelae in intrauterine growth retardation (IUGR). *J Matern Neonatal Med* [Internet]. 2013 Feb 3 [cited 2016 Sep 12];26(3):222–5. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/14767058.2012.715006>
5. Sharma D, Shastri S, Sharma P. Intrauterine Growth Restriction: Antenatal and Postnatal Aspects. *Clin Med Insights Pediatr* [Internet]. 2016 [cited 2016 Sep 12];10:67–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27441006>
6. Rosenberg A, Baum M, Ortiz L, Quan A, Barker DJ, Barker DJ, et al. The IUGR Newborn. *Semin Perinatol* [Internet]. 2008 Jun [cited 2016 Sep 12];32(3):219–24. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0146000507001371>
7. Cosmi E, Fanelli T, Visentin S, Trevisanuto D, Zanardo V. Consequences in infants that were intrauterine growth restricted. *J Pregnancy* [Internet]. 2011 [cited 2017 May 10];2011:364381. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21547088>
8. Woods KA, Camacho-Hübner C, Savage MO, Clark AJL. Intrauterine Growth Retardation and Postnatal Growth Failure Associated with Deletion of the Insulin-Like Growth Factor I Gene. *N Engl J Med* [Internet]. 1996 Oct 31 [cited 2017 May 10];335(18):1363–7. Available from:

- <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199610313351805>
9. Varvarigou AA. Intrauterine growth restriction as a potential risk factor for disease onset in adulthood. *J Pediatr Endocrinol Metab* [Internet]. 2010 Mar [cited 2016 Sep 12];23(3):215–24. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20480719>
 10. Voss W, Neubauer A-P, Wachtendorf M, Verhey JF, Kattner E. Neurodevelopmental outcome in extremely low birth weight infants: what is the minimum age for reliable developmental prognosis? *Acta Paediatr* [Internet]. 2007 Mar [cited 2016 Sep 12];96(3):342–7. Available from:
<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1651-2227.2006.00130.x>
 11. Ong KK, Ahmed ML, Emmett PM, Preece MA, Dunger DB, O'Brien P, et al. Association between postnatal catch-up growth and obesity in childhood: prospective cohort study. *BMJ* [Internet]. 2000 Apr 8 [cited 2016 Sep 12];320(7240):967–71. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10753147>
 12. Barker DJP, Osmond C, Womersley J, Gillis CR. pressure in samples of children and adults in Britain.
 13. Barker DJP, Osmond C. Epidemiology INFANT MORTALITY, CHILDHOOD NUTRITION, AND ISCHAEMIC HEART DISEASE IN ENGLAND AND WALES.
 14. Hales C, Barker D. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis*.
 15. Les CN, PEARKER DJ. PAPERS I- a-Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age.
 16. Hales CN, Barker DJP. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull* [Internet]. 2001 Nov 1 [cited 2016 Sep 13];60(1):5–20. Available from:
<http://bmb.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/bmb/60.1.5>
 17. Woodall SM, Bassett NS, Gluckman PD, Breier BH. Consequences of maternal undernutrition for fetal and postnatal hepatic insulin-like growth factor-I, growth hormone receptor and growth hormone binding protein gene regulation in the rat. *J Mol Endocrinol* [Internet]. 1998 Jun [cited 2016 Aug 21];20(3):313–26.
 18. Kingdom JC, McQueen J, Connell JM, Whittle MJ. Fetal angiotensin II levels and

- vascular (type I) angiotensin receptors in pregnancies complicated by intrauterine growth retardation. *Br J Obstet Gynaecol* [Internet]. 1993 May [cited 2016 Aug 21];100(5):476–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8518250>
19. Economides DL, Nicolaides KH, Linton EA, Perry LA, Chard T. Plasma cortisol and adrenocorticotropin in appropriate and small for gestational age fetuses. *Fetal Ther* [Internet]. 1988 [cited 2016 Aug 21];3(3):158–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2855870>
 20. Setia S, Sridhar MG. Changes in GH/IGF-1 axis in intrauterine growth retardation: consequences of fetal programming? *Horm Metab Res = Horm und Stoffwechselforsch = Horm métabolisme* [Internet]. 2009 Nov [cited 2016 Sep 13];41(11):791–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19623512>
 21. Muaku SM, Thissen J-P, Gerard G, Ketelslegers J-M, Maiter D. Postnatal Catch-Up Growth Induced by Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor-I in Rats with Intrauterine Growth Retardation Caused by Maternal Protein Malnutrition¹. *Pediatr Res* [Internet]. 1997 Sep [cited 2017 May 10];42(3):370–7. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1203/00006450-199709000-00019>
 22. Leger J, Noel M, Limal JM, Czernichow P. Growth Factors and Intrauterine Growth Retardation. II. Serum Growth Hormone, Insulin-Like Growth Factor (IGF) I, and IGF-Binding Protein 3 Levels in Children with Intrauterine Growth Retardation. *Pediatr Res* [Internet]. 1996 Jul 1 [cited 2017 Aug 26];40(1):101–7. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1203/00006450-199607000-00018>
 23. Morsing E, Gustafsson P, Brodzki J. Lung function in children born after foetal growth restriction and very preterm birth. *Acta Paediatr* [Internet]. 2012 Jan [cited 2016 Sep 12];101(1):48–54. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1651-2227.2011.02435.x>
 24. Kotecha SJ, Watkins WJ, Heron J, Henderson J, Dunstan FD, Kotecha S. Spirometric lung function in school-age children: effect of intrauterine growth retardation and catch-up growth. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2010 May 1 [cited 2016 Sep 12];181(9):969–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20093643>

25. Ronkainen E, Dunder T, Kaukola T, Marttila R, Hallman M. Intrauterine growth restriction predicts lower lung function at school age in children born very preterm. *Arch Dis Child - Fetal Neonatal Ed* [Internet]. 2016 Sep [cited 2016 Sep 12];101(5):F412–7. Available from:
<http://fn.bmj.com/lookup/doi/10.1136/archdischild-2015-308922>
26. Rona RJ, Gulliford MC, Chinn S. Effects of prematurity and intrauterine growth on respiratory health and lung function in childhood. *BMJ* [Internet]. 1993 Mar 27 [cited 2016 Sep 12];306(6881):817–20. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8490372>
27. Tennant PWG, Gibson GJ, Parker L, Pearce MS. Childhood Respiratory Illness and Lung Function at Ages 14 and 50 Years. *Chest* [Internet]. 2010 Jan [cited 2016 Sep 12];137(1):146–55. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001236921060027X>
28. Rozance PJ, Seedorf GJ, Brown A, Roe G, O’Meara MC, Gien J, et al. Intrauterine growth restriction decreases pulmonary alveolar and vessel growth and causes pulmonary artery endothelial cell dysfunction in vitro in fetal sheep. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* [Internet]. 2011 Dec [cited 2016 Sep 13];301(6):L860-71. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21873446>
29. Cock ML, Joyce BJ, Hooper SB, Wallace MJ, Gagnon R, Brace RA, et al. PULMONARY ELASTIN SYNTHESIS AND DEPOSITION IN DEVELOPING AND MATURE SHEEP: EFFECTS OF INTRAUTERINE GROWTH RESTRICTION. *Exp Lung Res* [Internet]. 2004 Jan 2 [cited 2016 Sep 13];30(5):405–18. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01902140490451244>
30. Liu X, Lin Y, Tian B, Miao J, Xi C, Liu C. Maternal protein restriction alters VEGF signaling and decreases pulmonary alveolar in fetal rats. *Int J Clin Exp Pathol* [Internet]. 2014 [cited 2016 Sep 13];7(6):3101–11. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25031729>
31. Karadag A, Sakurai R, Wang Y, Guo P, Desai M, Ross MG, et al. Effect of maternal food restriction on fetal rat lung lipid differentiation program. *Pediatr Pulmonol* [Internet]. 2009 Jul [cited 2016 Sep 13];44(7):635–44. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19514059>

32. Eriksson L, Haglund B, Odland V, Altman M, Ewald U, Kieler H. Perinatal conditions related to growth restriction and inflammation are associated with an increased risk of bronchopulmonary dysplasia. *Acta Paediatr* [Internet]. 2015 Mar [cited 2016 Sep 13];104(3):259–63. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/apa.12888>
33. Reiss I, Landmann E, Heckmann M, Misselwitz B, Gortner L. Increased risk of bronchopulmonary dysplasia and increased mortality in very preterm infants being small for gestational age. *Arch Gynecol Obstet* [Internet]. 2003 Nov 1 [cited 2016 Sep 13];269(1):40–4. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00404-003-0486-9>
34. Sahebjami H, MacGee J. Effects of starvation on lung mechanics and biochemistry in young and old rats. *J Appl Physiol* [Internet]. 1985 Mar [cited 2016 Sep 13];58(3):778–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3156843>
35. Kalenga M, Eeckhout Y. Effects of Protein Deprivation from the Neonatal Period on Lung Collagen and Elastin in the Rat. *Pediatr Res* [Internet]. 1989 Aug [cited 2016 Sep 13];26(2):125–7. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1203/00006450-198908000-00011>
36. Alejandre Alcazar MA, Östreicher I, Appel S, Rother E, Vohlen C, Plank C, et al. Developmental regulation of inflammatory cytokine-mediated Stat3 signaling: the missing link between intrauterine growth restriction and pulmonary dysfunction? *J Mol Med* [Internet]. 2012 Aug 21 [cited 2016 Sep 13];90(8):945–57. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00109-012-0860-9>
37. Kikkawa Y, Kaibara M, Motoyama EK, Orzalesi MM, Cook CD. Morphologic development of fetal rabbit lung and its acceleration with cortisol. *Am J Pathol* [Internet]. 1971 Aug [cited 2016 Sep 13];64(2):423–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5142274>
38. Kotas R V, Farrell PM, Ulane RE, Chez RA. Fetal rhesus monkey lung development: lobar differences and discordances between stability and distensibility. *J Appl Physiol* [Internet]. 1977 Jul [cited 2016 Sep 13];43(1):92–8.

- Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/408323>
39. Burri PH. Fetal and postnatal development of the lung. *Annu Rev Physiol* [Internet]. 1984 [cited 2016 Sep 13];46:617–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6370120>
 40. Roth-Kleiner M, Post M. Similarities and dissimilarities of branching and septation during lung development. *Pediatr Pulmonol* [Internet]. 2005 Aug [cited 2016 Sep 13];40(2):113–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15965895>
 41. Alejandro Alcázar MA, Morty RE, Lenzian L, Vohlen C, Oestreicher I, Plank C, et al. Inhibition of TGF- β signaling and decreased apoptosis in IUGR-associated lung disease in rats. *PLoS One* [Internet]. 2011 [cited 2016 Sep 13];6(10):e26371. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22028866>
 42. Smith LJ, McKay KO, van Asperen PP, Selvadurai H, Fitzgerald DA. Normal development of the lung and premature birth. *Paediatr Respir Rev* [Internet]. 2010 Sep [cited 2016 Sep 13];11(3):135–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20692626>
 43. Kim N, Vu TH. Parabronchial smooth muscle cells and alveolar myofibroblasts in lung development. *Birth Defects Res Part C Embryo Today Rev* [Internet]. 2006 Mar [cited 2017 Nov 19];78(1):80–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16622850>
 44. Lanning NJ, Carter-Su C. Recent advances in growth hormone signaling. *Rev Endocr Metab Disord* [Internet]. 2006 Dec [cited 2016 Aug 21];7(4):225–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17308965>
 45. Melmed S. Acromegaly pathogenesis and treatment. *J Clin Invest* [Internet]. 2009 Nov [cited 2016 Aug 21];119(11):3189–202. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19884662>
 46. Bidlingmaier M, Strasburger CJ. Growth hormone. *Handb Exp Pharmacol* [Internet]. 2010 [cited 2016 Aug 21];(195):187–200. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20020365>
 47. Kikuchi K, Bichell DP, Rotwein P. Chromatin changes accompany the developmental activation of insulin-like growth factor I gene transcription. *J Biol Chem* [Internet]. 1992 Oct 25 [cited 2016 Aug 21];267(30):21505–11. Available

- from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1400462>
48. Chao W, D'Amore PA. IGF2: epigenetic regulation and role in development and disease. *Cytokine Growth Factor Rev* [Internet]. 2008 Apr [cited 2017 Feb 11];19(2):111–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18308616>
 49. Lui JC, Finkielstain GP, Barnes KM, Baron J. An imprinted gene network that controls mammalian somatic growth is down-regulated during postnatal growth deceleration in multiple organs. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 2008;295(1).
 50. Rajpathak SN, Gunter MJ, Wylie-Rosett J, Ho GYF, Kaplan RC, Muzumdar R, et al. The role of insulin-like growth factor-I and its binding proteins in glucose homeostasis and type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* [Internet]. 2009 Jan [cited 2016 Aug 21];25(1):3–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19145587>
 51. Melmed S, Yamashita S, Yamasaki H, Fagin J, Namba H, Yamamoto H, et al. IGF-I receptor signalling: lessons from the somatotroph. *Recent Prog Horm Res* [Internet]. 1996 [cited 2016 Aug 21];51:189-215; discussion 215-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8701079>
 52. Clemmons DR. Use of mutagenesis to probe IGF-binding protein structure/function relationships. *Endocr Rev* [Internet]. 2001 Dec [cited 2016 Aug 21];22(6):800–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11739334>
 53. Himpe E, Kooijman R. Insulin-like growth factor-I receptor signal transduction and the Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK-STAT) pathway. *Biofactors* [Internet]. [cited 2016 Aug 21];35(1):76–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19319849>
 54. Peruzzi F, Prisco M, Dews M, Salomoni P, Grassilli E, Romano G, et al. Multiple signaling pathways of the insulin-like growth factor 1 receptor in protection from apoptosis. *Mol Cell Biol* [Internet]. 1999 Oct [cited 2016 Aug 21];19(10):7203–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10490655>
 55. Mendoza MC, Er EE, Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2011 Jun [cited 2016 Aug 21];36(6):320–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21531565>

56. de Zegher F, Francois I, van Helvoirt M, Van den Berghe G. Clinical review 89: Small as fetus and short as child: from endogenous to exogenous growth hormone. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 1997 Jul [cited 2016 Aug 21];82(7):2021–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9215266>
57. Giudice LC, de Zegher F, Gargosky SE, Dsupin BA, de las Fuentes L, Crystal RA, 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* [Internet]. 1995 May [cited 2016 Aug 21];80(5):1548–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7538146>
58. Walenkamp MJE, van der Kamp HJ, Pereira AM, Kant SG, van Duyvenvoorde HA, Kruithof MF, et al. A variable degree of intrauterine and postnatal growth retardation in a family with a missense mutation in the insulin-like growth factor I receptor. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2006 Aug [cited 2016 Aug 21];91(8):3062–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16757531>
59. Woods KA, Camacho-Hübner C, Savage MO, Clark AJ. Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N Engl J Med* [Internet]. 1996 Oct 31 [cited 2016 Aug 21];335(18):1363–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8857020>
60. Fu Q, McKnight RA, Callaway CW, Yu X, Lane RH, Majnik A V. Intrauterine growth restriction disrupts developmental epigenetics around distal growth hormone response elements on the rat hepatic IGF-1 gene. *FASEB J* [Internet]. 2015 Apr [cited 2016 Dec 20];29(4):1176–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25466885>
61. Eremia SC, de Boo HA, Bloomfield FH, Oliver MH, Harding JE. Fetal and amniotic insulin-like growth factor-I supplements improve growth rate in intrauterine growth restriction fetal sheep. *Endocrinology* [Internet]. 2007 Jun [cited 2016 Aug 21];148(6):2963–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17347307>
62. de Boo HA, Eremia SC, Bloomfield FH, Oliver MH, Harding JE. Treatment of

- intrauterine growth restriction with maternal growth hormone supplementation in sheep. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2008 Nov [cited 2016 Aug 21];199(5):559.e1-9. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18599015>
63. Beyea JA, Sawicki G, Olson DM, List E, Kopchick JJ, Harvey S. Growth hormone (GH) receptor knockout mice reveal actions of GH in lung development. *Proteomics* [Internet]. 2006 Jan [cited 2016 Sep 13];6(1):341–8. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16287172>
 64. Beyea JA, Olson DM, Harvey S. Growth hormone (GH) action in the developing lung: Changes in lung proteins after adenoviral GH overexpression. *Dev Dyn* [Internet]. 2005 Oct [cited 2016 Dec 15];234(2):404–12. Available from:
<http://doi.wiley.com/10.1002/dvdy.20538>
 65. Beyea JA, Olson DM, Vandergriend RA, Harvey S. Expression of growth hormone and its receptor in the lungs of embryonic chicks. *Cell Tissue Res* [Internet]. 2005 Dec [cited 2016 Sep 13];322(3):379–92. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16047159>
 66. Mouhieddine OB, Cazals V, Maitre B, Le Bouc Y, Chadelat K. Insulin-Like Growth Factor-II (IGF-II), Type 2 IGF Receptor, and IGF-Binding Protein-2 Gene Expression in Rat Lung Alveolar Epithelial Cells: Relation to Proliferation. *Endocrinology* [Internet]. 1994 [cited 2017 May 10];135(1):83–91. Available from:
https://oup.silverchair-cdn.com/oup/backfile/Content_public/Journal/endo/135/1/10.1210_endo.135.1.7516870/2/endo0083.pdf?Expires=1494534925&Signature=FisfJIViemkpbgvhGFe7iOLu~aeqZ4mHT8xj84x2V4ftUsf4NbImDqpFBnLx247aXKdaFsu9piahU0EqdD24c rcJmwNWgP35LgTFE6TOQ
 67. Beyea JA, Olson DM, Harvey S. Growth hormone expression in the perinatal and postnatal rat lung. *Dev Dyn* [Internet]. 2005 Apr [cited 2016 Sep 13];232(4):1037–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15736201>
 68. Silva D, Venihaki M, Guo W-H, Lopez MF. Igf2 deficiency results in delayed lung development at the end of gestation. *Endocrinology* [Internet]. 2006 Dec [cited 2016 Sep 13];147(12):5584–91. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16959842>
69. Gläser S, Friedrich N, Ewert R, Schäper C, Nauck M, Dörr M, et al. Association between serum insulin-like growth factor (IGF) I and IGF binding protein-3 and lung function. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2009 Jul [cited 2016 Sep 13];94(7):2452–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19401363>
 70. Plank C, Ostreicher I, Hartner A, Marek I, Struwe FG, Amann K, et al. Intrauterine growth retardation aggravates the course of acute mesangioproliferative glomerulonephritis in the rat. *Kidney Int* [Internet]. 2006 Dec [cited 2016 Sep 13];70(11):1974–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17051140>
 71. Woodall SM, Breier BH, Johnston BM, Gluckman PD. A model of intrauterine growth retardation caused by chronic maternal undernutrition in the rat: effects on the somatotrophic axis and postnatal growth. *J Endocrinol* [Internet]. 1996 Aug [cited 2016 Sep 13];150(2):231–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8869590>
 72. Ueda K, Cho K, Matsuda T, Okajima S, Uchida M, Kobayashi Y, et al. A Rat Model for Arrest of Alveolarization Induced by Antenatal Endotoxin Administration. *Pediatr Res* [Internet]. 2006 Mar [cited 2016 Dec 15];59(3):396–400. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1203/01.pdr.0000200796.86858.ca>
 73. Effects of insulin on cellular growth and proliferation. *Life Sci* [Internet]. 1981 Nov 23 [cited 2017 Nov 18];29(21):2131–9. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0024320581904823>
 74. Liang L, Guo WH, Esquiliano DR, Asai M, Rodriguez S, Giraud J, et al. Insulin-like growth factor 2 and the insulin receptor, but not insulin, regulate fetal hepatic glycogen synthesis. *Endocrinology* [Internet]. 2010 Feb [cited 2017 Feb 11];151(2):741–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20032056>
 75. Beyea JA, Olson DM, Harvey S. Growth hormone (GH) action in the developing lung: changes in lung proteins after adenoviral GH overexpression. *Dev Dyn* [Internet]. 2005 Oct [cited 2016 Sep 13];234(2):404–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16127721>
 76. Beyea JA, Olson DM, Harvey S. Growth hormone-dependent changes in the rat

- lung proteome during alveorization. *Mol Cell Biochem* [Internet]. 2009 Jan [cited 2016 Sep 13];321(1–2):197–204. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18985281>
77. Fazeli PK, Klibanski A. Determinants of GH resistance in malnutrition. *J Endocrinol* [Internet]. 2014 Mar [cited 2017 Mar 1];220(3):R57-65. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24363451>
 78. Baik M, Yu JH, Hennighausen L. Growth hormone-STAT5 regulation of growth, hepatocellular carcinoma, and liver metabolism. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2011 Jul [cited 2016 Dec 15];1229:29–37. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21793836>
 79. Hornick J., Van Eenaeme C, Gérard O, Dufrasne I, Istasse L. Mechanisms of reduced and compensatory growth. *Domest Anim Endocrinol*. 2000;19(2):121–32.
 80. Clemmons DR. Insulin-like growth factor binding proteins and their role in controlling IGF actions. *Cytokine Growth Factor Rev* [Internet]. 1997 Mar [cited 2016 Sep 13];8(1):45–62. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9174662>
 81. Batchelor DC, Hutchins AM, Klempt M, Skinner SJ. 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* [Internet]. 1995 Oct [cited 2016 Sep 13];15(2):105–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8800636>
 82. Moats-Staats BM1, Price WA, Xu L, Jarvis HW SA. Regulation of the insulin-like growth factor system during normal rat lung development. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1995;12(1):56–64.
 83. Li R, Pourpak A, Morris SW. Inhibition of the insulin-like growth factor-1 receptor (IGF1R) tyrosine kinase as a novel cancer therapy approach. *J Med Chem* [Internet]. 2009 Aug 27 [cited 2016 Dec 14];52(16):4981–5004. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19610618>
 84. Pirkmajer S, Chibalin A V. Serum starvation: caveat emptor. *AJP Cell Physiol* [Internet]. 2011 Aug 1 [cited 2016 Dec 14];301(2):C272–9. Available from:
<http://ajpcell.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpcell.00091.2011>
 85. De Meyts P, Whittaker J. Structural biology of insulin and IGF1 receptors:

- implications for drug design. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2002 Oct [cited 2016 Dec 15];1(10):769–83. Available from:
<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrd917>
86. El-Shewy HM, Lee M-H, Obeid LM, Jaffa AA, Luttrell LM. The insulin-like growth factor type 1 and insulin-like growth factor type 2/mannose-6-phosphate receptors independently regulate ERK1/2 activity in HEK293 cells. *J Biol Chem* [Internet]. 2007 Sep 7 [cited 2016 Dec 15];282(36):26150–7. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17620336>
 87. Werner H, LeRoith D. Insulin and insulin-like growth factor receptors in the brain: Physiological and pathological aspects. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2014;24(12):1947–53.
 88. Li S, Resnicoff M, Baserga R. Effect of Mutations at Serines 1280-1283 on the Mitogenic and Transforming Activities of the Insulin-like Growth Factor I Receptor. *J Biol Chem* [Internet]. 1996 May 24 [cited 2016 Dec 21];271(21):12254–60. Available from: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.271.21.12254>
 89. Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal*. 2002;14(5):381–95.
 90. Rössig L, Jadidi AS, Urbich C, Badorff C, Zeiher AM, Dimmeler S. Akt-dependent phosphorylation of p21(Cip1) regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2001 Aug [cited 2016 Nov 2];21(16):5644–57. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11463845>
 91. Zhou H, Li X-M, Meinkoth J, Pittman RN. Akt Regulates Cell Survival and Apoptosis at a Postmitochondrial Level. *J Cell Biol* [Internet]. 2000 [cited 2016 Dec 14];151(3):483–94. Available from:
<http://www.jcb.org/cgi/content/full/151/3/483>
 92. Alao JP, Kato J, Matsushima H, Hiebert S, Ewen M, Sherr C, et al. The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. *Mol Cancer* [Internet]. 2007 [cited 2016 Nov 2];6(1):24. Available from: <http://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-4598-6-24>

93. Florian Horn. *Biochemie des Menschen - Das Lehrbuch für das Medizinstudium*. 4th ed. Stuttgart, New York: Goerg Thieme Verlag; 2009. 258-259 p.
94. Bartek J, Lukas J. Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS Lett* [Internet]. 2001 Feb 16 [cited 2016 Dec 14];490(3):117–22. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1016/S0014-5793%2801%2902114-7>
95. Grimberg A. Mechanisms by which IGF-I may promote cancer. *Cancer Biol Ther* [Internet]. 2003 [cited 2016 Dec 16];2(6):630–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14688466>
96. Leonardi E, Girlando S, Serio G, Mauri FA, Perrone G, Scampini S, et al. PCNA and Ki67 expression in breast carcinoma: correlations with clinical and biological variables. *J Clin Pathol* [Internet]. 1992 May [cited 2016 Nov 2];45(5):416–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1350788>
97. Warsito D, Sjöström S, Andersson S, Larsson O, Sehat B. Nuclear IGF1R is a transcriptional co-activator of LEF1/TCF. *EMBO Rep* [Internet]. 2012 Mar 1 [cited 2016 Dec 16];13(3):244–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22261717>
98. Steyn FJ, Tolle V, Chen C, Epelbaum J. Neuroendocrine Regulation of Growth Hormone Secretion. *Compr Physiol* [Internet]. 2016 Mar 15 [cited 2016 Nov 3];6(2):687–735. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27065166>
99. Mižíková I, Ruiz-Camp J, Steenbock H, Madurga A, Vadász I, Herold S, et al. Collagen and elastin cross-linking is altered during aberrant late lung development associated with hyperoxia. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2015;308(11).
100. Bourbon J, Boucherat O, Chailley-Heu B, Delacourt C. Control Mechanisms of Lung Alveolar Development and Their Disorders in Bronchopulmonary Dysplasia. *Pediatr Res* [Internet]. 2005 May [cited 2016 Nov 3];57(5 Part 2):38R–46R. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1203/01.PDR.0000159630.35883.BE>
101. Berg RA, Kerr JS. NUTRITIONAL ASPECTS OF COLLAGEN METABOLISM. *Annu Rev Nutr*. 1992;12:369–90.
102. Mariani TJ, Sandefur S, Pierce RA. Experimental Lung Research Elastin in Lung

- Development ELASTIN IN LUNG DEVELOPMENT. *Exp Lung Res* [Internet]. 1997 [cited 2016 Nov 3];23(2):131–45. Available from: <http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=ielu20>
103. Wendel DP, Taylor DG, Albertine KH, Keating MT, Li DY. Impaired distal airway development in mice lacking elastin. *Am J Respir Cell Mol Biol* [Internet]. 2000 Sep [cited 2016 Nov 3];23(3):320–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10970822>
 104. Nardell EA, Brody JS. Determinants of mechanical properties of rat lung during postnatal development. *J Appl Physiol* [Internet]. 1982 Jul [cited 2016 Nov 3];53(1):140–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7118627>
 105. Pierce RA, Mariencheck WI, Sandefur S, Crouch EC, Parks WC. Glucocorticoids upregulate tropoelastin expression during late stages of fetal lung development. *Am J Physiol* [Internet]. 1995 Mar [cited 2016 Nov 3];268(3 Pt 1):L491-500. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7900831>
 106. Shibahara SU, Davidson JM, Smith K, Crystal RG. Modulation of tropoelastin production and elastin messenger ribonucleic acid activity in developing sheep lung. *Biochemistry* [Internet]. 1981 Nov 10 [cited 2016 Nov 3];20(23):6577–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7306525>
 107. Kielty CM, Sherratt MJ, Shuttleworth CA. Elastic fibres. *J Cell Sci*. 2002;115(14).
 108. Joss-Moore LA, Wang Y, Yu X, Campbell MS, Callaway CW, McKnight RA, et al. IUGR decreases elastin mRNA expression in the developing rat lung and alters elastin content and lung compliance in the mature rat lung. *Physiol Genomics* [Internet]. 2011 May 13 [cited 2016 Nov 3];43(9):499–505. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21363967>
 109. Foster JA, Curtiss SW. The regulation of lung elastin synthesis. *Am J Physiol* [Internet]. 1990 Aug [cited 2016 Oct 26];259(2 Pt 1):L13-23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2200280>
 110. Chen L, Acciani T, Le Cras T, Lutzko C, Perl A-KT. Dynamic regulation of platelet-derived growth factor receptor α expression in alveolar fibroblasts during realveolarization. *Am J Respir Cell Mol Biol* [Internet]. 2012 Oct [cited 2017 Mar 2];47(4):517–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22652199>

111. Bruce MC, Honaker CE, Cross RJ. Lung Fibroblasts Undergo Apoptosis Following Alveolarization. *Am J Respir Cell Mol Biol* [Internet]. 1999 Feb [cited 2017 Mar 2];20(2):228–36. Available from: <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1165/ajrcmb.20.2.3150>
112. Sucre JMS, Wilkinson D, Vijayaraj P, Paul M, Dunn B, Alva-Ornelas JA, et al. A three-dimensional human model of the fibroblast activation that accompanies bronchopulmonary dysplasia identifies Notch-mediated pathophysiology. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2016;310(10).
113. Chetty A, Andersson S, Lassus P, Nielsen HC. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and IGF-1 receptor (IGF-1R) expression in human lung in RDS and BPD. *Pediatr Pulmonol* [Internet]. 2004 Feb [cited 2016 Dec 21];37(2):128–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14730658>
114. Han RNN, Buch S, Tseu I, Young J, Christie NA, Frndova H, et al. Changes in Structure, Mechanics, and Insulin-Like Growth Factor-Related Gene Expression in the Lungs of Newborn Rats Exposed to Air or 60% Oxygen. *Pediatr Res* [Internet]. 1996 Jun [cited 2016 Dec 23];39(6):921–9.
115. Hung CF, Rohani MG, Lee S-S, Chen P, Schnapp LM. Role of IGF-1 pathway in lung fibroblast activation. *Respir Res* [Internet]. 2013 [cited 2016 Dec 18];14(1):102. Available from: <http://respiratory-research.com/content/14/1/102>
116. Twigg SM, Baxter RC. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein 5 forms an alternative ternary complex with IGFs and the acid-labile subunit. *J Biol Chem* [Internet]. 1998 Mar 13 [cited 2017 Nov 18];273(11):6074–9.
117. Mairet-Coello G, Tury A, DiCicco-Bloom E. Insulin-like growth factor-1 promotes G(1)/S cell cycle progression through bidirectional regulation of cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in developing rat cerebral cortex. *J Neurosci* [Internet]. 2009 Jan 21 [cited 2016 Dec 16];29(3):775–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19158303>
118. Chetty A, Cao G-J, Nielsen HC. Insulin-like Growth Factor-I Signaling Mechanisms, Type I Collagen and Alpha Smooth Muscle Actin in Human Fetal Lung Fibroblasts. *Pediatr Res* [Internet]. 2006 Oct [cited 2016 Dec 22];60(4):389–94.

8. Vorabveröffentlichung von Ergebnissen

Nawabi J, Vohlen C, Dinger K, Thangaratnarajah C, Klautdt C, Lopez Garcia E, et al. **Novel functional role of GH/IGF1 in neonatal lung myofibroblasts and in rat lung growth after intrauterine growth restriction.** Am J Physiol Cell Mol Physiol [Internet]. 2018 Jul 26 [cited 2018 Aug 8];ajplung.00413.2017. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajplung.00413.2017>

9. Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ursachen der Intrauterinen Wachstumsrestriktion (IUGR).....	10
Abbildung 2: Phasen der Lungenentwicklung beim Menschen.	16
Abbildung 3: Schematische Darstellung der systemischen und der pulmonal intrinsischen Growth Hormone/Insulin-Like Growth Factor-Achse.	17
Abbildung 4: Schematische Darstellung des intrazellulären Signalweges von GH.	18
Abbildung 5: Schematische Darstellung des intrazellulären Signalweges von Insulin-Like Growth Factor 1 über Akt.....	19
Abbildung 6: Schema zur möglichen Bedeutung des pulmonal intrinsischen Growth Hormone / Insulin Like Growth Factor GH/IGF-Systems der Lunge in der Pathogenese der Intrauterinen Wachstumsrestriktion assoziierten Lungenerkrankung.	23
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Tierversuchsmodells zur Induktion einer Intrauterinen Wachstumsrestriktion durch Proteinmangeldiät in Ratten	33
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Zellkulturversuche zur Analyse pulmonaler Fibroblasten nach intrauteriner Wachstumsrestriktion.	40
Abbildung 9: Phänotypisierung der Tiere nach IUGR.	47
Abbildung 10: mRNA Expressionprofil der Wachstumsfaktoren Growth Hormone sowie des Rezeptors GH-Rezeptor in der Lunge nach IUGR.....	49
Abbildung 11: Proteinexpressionprofil für Stat5 und aktiviertes Stat5 in der Lunge nach IUGR.	50
Abbildung 12: mRNA Expressionprofil der Wachstumsfaktoren Insulin-Like Growth Factor 1, Insulin-Like Growth Factor 2 sowie des IGF1-Rezeptor sowie des Rezeptors für Insulin in der Lunge nach IUGR.	52
Abbildung 13: Proteinexpressionprofil für Akt und aktiviertes Akt in der Lunge nach IUGR. ...	53
Abbildung 14: Serumkonzentration von IGF 1 in der Lunge nach IUGR.....	54
Abbildung 15: Proteinexpressionprofil für Caspase3 und aktivierte Caspase3 in der Lunge nach IUGR.	55
Abbildung 16: Proteinexpressionprofil für Cyclin D1 in der Lunge nach IUGR.	56
Abbildung 17: Proteinexpressionprofil für Proliferating cell nuclear antigen in der Lunge nach IUGR.	57

Abbildung 18: mRNA Expressionprofil für Komponenten der Extrazelulärmatrix der Lunge nach IUGR.	58
Abbildung 19: Proteinexpressionprofil des Rezeptors für GH in mouse embryonic fibroblasts nach FBS-Restriktion.	60
Abbildung 20: Proteinexpressionprofil für Stat 5 und aktiviertes Stat5 in mouse embryonic fibroblasts nach FBS-Restriktion.	61
Abbildung 21: Proteinexpressionsprofil des Rezeptors für IGF1 in mouse embryonic fibroblasts nach IUGR.	62
Abbildung 22: Proteinexpressionprofil für totales Proliferating cell nuclear antigen in mouse embryonic fibroblasts nach IUGR.	63
Abbildung 23: Proteinexpressionprofil für Caspase3 und aktivierte Caspase3 in mouse embryonic fibroblasts nach FBS-Reduktion.	64
Abbildung 24: Proteinexpressionprofil der Marker für Apoptose und Zellproliferation in mouse embryonic fibroblasts nach FBS-Reduktion und Stimulation mit IGF1 nach 24h und 48h und Vehikel Stimulierung der Kontrolle	66
Abbildung 25: Proteinexpressionprofil der Marker für Apoptose und Zellproliferation in mouse embryonic fibroblasts nach FBS-Reduktion und Stimulation mit GH nach 24h und 48h und Vehikel Stimulierung der Kontrolle.	67
Abbildung 26: Proteinexpressionprofil des Rezeptors für GH in primären neonatalen pulmonalen Fibroblasten nach IUGR.	68
Abbildung 27: Proteinexpressionprofil des Rezeptors Insulin Like Growth Factor 1-Rezeptor (IGF1-R) in primären neonatalen pulmonalen Fibroblasten nach IUGR.	69
Abbildung 28: Proteinexpressionprofil für Stat5 und aktiviertes Stat5 in primären neonatalen pulmonalen Fibroblasten nach IUGR.	70
Abbildung 29: Proteinexpressionprofil für PCNA in primären neonatalen pulmonalen Fibroblasten nach IUGR.	71
Abbildung 30: Proteinexpressionprofil für Cyclin D1 in primären neonatalen pulmonalen Fibroblasten nach IUGR.	72
Abbildung 31: Schematische Darstellung als mögliches Arbeitsmodell zur Wirkung von Insulin Like Growth Factor auf Proliferation und Apoptose über den intrazellulären Signalweg von Akt in der Lunge.	79
Abbildung 32: Schema zur Bedeutung des pulmonal intrinsischen GH/IGF-Systems der Lunge in der Pathogenese der IUGR assoziierten Lungenerkrankung.	86

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte.....	24
Tabelle 2: Arbeits- und Verbrauchsmaterialien	25
Tabelle 3: Chemikalien, Medien und Reagenzien	26
Tabelle 4: Puffer und Stammlösungen.....	28
Tabelle 5: Die zur TaqMan real-time PCR verwendeten Primer und Sonden.....	30
Tabelle 6: Die zur real-time PCR verwendeten Primer.....	30
Tabelle 7: Verwendete Antikörper für das Western Blot Verfahren.	31

Lebenslauf

Persönliche Daten

Adresse Kegelhofstr. 52, 20251 Hamburg
E-Mail nawabi.jawed@gmail.com
Geburtstag 15.03.1989 in Frankfurt am Main
Staatsangehörigkeit Deutsch

Schulbildung

09/1999 – 06/2008 Gymnasium Tilemannschule, Limburg an der Lahn
09/1995 – 09/1999 Grundschule MPS Goldener Grund, Selters Taunus

Akademische Ausbildung

04/2011 – 05/2016 **Studium der Humanmedizin**, Universität zu Köln
05/2016 3. Staatsexamen
04/2015 2. Staatsexamen
07/2012-02/2013 Forschungssemester
03/2012 1. Staatsexamen
10/2010 – 04/2011 **Studium der Humanmedizin**, Georg-August-Universität, Göttingen
04/2009 – 10/2010 **Studium der Zahnmedizin**, Justus-Liebig-Universität, Gießen

Praktisches Jahr

11/2015 – 04/2016 **3. Wahlfach**
Neurochirurgie, Uniklinik Köln
09 – 11/2015 **2. Innere Medizin**
Onkologie, Hillman Cancer Center, University of Pittsburgh USA,
Onkologie, Hämatologie und Infektiologie, Uniklinik Köln
05 – 09/2015 **1. Chirurgie**
Neurochirurgie, Keio University Hospital, Tokio, Japan,
Allgemeine Chirurgie, Krankenhaus Porz am Rhein, Köln

Berufserfahrung

05/2017 – jetzt **Assistenzarzt für Neuroradiologie**
Klinik und Poliklinik für Neuroradiologische Diagnostik und Intervention, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
07/2016 – 03/2017 **Arzt für Reise- und Tropenmedizin**
Reisemedizinische Beratung und Impfung, WHO-zertifizierte Gelbfieberimpfstelle. Praxis für Reise- und Tropenmedizin, Köln
02/2014 – 10/2016 **Werkstudent, Schlaflabor**
Patientenaufnahme, Vorbereitung und nächtliche Polysomnographien für Schlafstörungs-Screenings und -therapien. St. Elisabeth-Krankenhaus, Köln
02/2012 – 07/2015 **Studentische Hilfskraft,**
Klinisches Studienzentrum für Hämatologie und Onkologie.
Klinik I für Innere Medizin, Uniklinik Köln

Forschung

07/2012 – 01/2017

Promotionsarbeit in der Arbeitsgruppe “Experimentelle Pneumologie” Leitung: Jun. Prof. Dr. Dr. Alejandro Alcázar
Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Uniklinik Köln

Auszeichnungen und Förderungen

09 – 11/2015

Reisestipendium der Medizinischen Fakultät Köln für Pittsburgh, USA

05 – 07/2015

Reisestipendium der Medizinischen Fakultät Köln Tokio, Japan

07/2012 – 07/2013

Promotionsstipendium Köln Fortune der Medizinischen Fakultät Köln

Publikationen

Nawabi J, Vohlen C, Dinger K, Thangaratnarajah C, Klaudt C, Lopez Garcia E, et al. **Novel functional role of GH/IGF1 in neonatal lung myofibroblasts and in rat lung growth after intrauterine growth restriction.** Am J Physiol Cell Mol Physiol. 2018 July

Thangaratnarajah C, Dinger K, Vohlen C, Klaudt C, Nawabi J, Lopez Garcia E, Kwapiszewska G, Dobner J, Nüsken KD, van Koningsbruggen. **Novel role of NPY in neuroimmune interaction and lung growth after intrauterine growth restriction.** Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2017 September