

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik  
im Dr. von Haunerschen Kinderspital  
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. Dr. med. Christoph Klein

**Einfluss verschiedener Therapeutika der BPD-Prävention auf  
Wachstum und Phänotyp von mesenchymalen  
Stromazellen der Lunge von extrem kleinen  
Frühgeborenen**

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

vorgelegt von  
Carla Mehaffey, geb. Müller  
aus Augsburg

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	PD Dr. Harald Ehrhardt
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Andreas W. Flemmer Prof. Dr. Josef Rosenecker
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	24.10.2019

*gewidmet meiner lieben großen Familie*

# INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung.....	- 8 -
1.1	Einführung in das Krankheitsbild der bronchopulmonalen Dysplasie	- 8 -
1.1.1	Epidemiologie und Klinik der BPD .....	- 8 -
1.1.2	Definition der BPD und Störung der Lungenentwicklung .....	- 11 -
1.2	Risiken und Einflussfaktoren auf die Pathogenese der BPD .....	- 15 -
1.2.1	Ante- und perinatale Faktoren .....	- 15 -
1.2.2	Postnatale Faktoren.....	- 16 -
1.2.3	Gefäßpathologische Veränderungen im Rahmen der BPD .....	- 17 -
1.2.4	Bedeutung der pulmonalen Inflammationsreaktion für die BPD- Entstehung .....	- 18 -
1.3	Prävention und Therapie der BPD.....	- 24 -
1.3.1	Antenatale Steroide, Surfactant, Coffein, Vitamin A.....	- 24 -
1.3.2	Weitere Behandlungsstrategien der BPD .....	- 25 -
2	Zielsetzung .....	- 28 -
3	Material und Methoden.....	- 29 -
3.1	Material.....	- 29 -
3.1.1	Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen .....	- 29 -
3.1.2	Puffer und andere Lösungen .....	- 30 -
3.1.3	Stimulantien und Inhibitoren .....	- 31 -
3.1.4	Antikörper für Immundetektion .....	- 32 -
3.1.5	Antikörper zur Oberflächenmarkerfärbung.....	- 33 -
3.1.6	Kommerzielle Reagenziensätze.....	- 34 -
3.1.7	Laborgeräte und Software .....	- 34 -
3.1.8	Verbrauchsmaterialien .....	- 34 -
3.2	Methoden .....	- 36 -
3.2.1	Gewinnung und Aufbewahrung der mesenchymalen Stromazellen..	- 36 -

3.2.2	Zellkultur .....	- 38 -
3.2.3	Patientendaten der zu den einzelnen Zelllinien gehörenden Frühgeborenen .....	- 39 -
3.2.4	Konzentration der Stimulanzen in der Klinik und im Experiment .....	- 42 -
3.2.5	Untersuchung von Zellwachstum und Morphologie .....	- 44 -
3.2.6	Untersuchung von Zellzyklus, Proliferation und Apoptose mittels Durchflusszytometrie .....	- 48 -
3.2.7	Analyse von Obeflächenmerkmalen mittels Durchflusszytometrie...	- 54 -
3.2.8	Immunfluoreszenzfärbung .....	- 56 -
3.2.9	Proteinbiochemie .....	- 57 -
3.2.10	DNA-Microarray-Technologie.....	- 60 -
3.2.11	Statistische Methoden.....	- 60 -
4	Ergebnisse .....	- 61 -
4.1	Ermittlung geeigneter Untersuchungsbedingungen.....	- 61 -
4.2	Einfluss der in der BPD-Therapie etablierten Medikamente auf das Wachstum der mesenchymalen Stromazellen .....	- 63 -
4.2.1	Untersuchung des Einflusses der Steroide Dexamethason, Beta-methason, Prednisolon und Hydrocortison auf das Zellwachstum ..	- 63 -
4.2.2	Einfluss der weiteren BPD Therapeutika, Surfactant, Vitamin A und Coffein auf das Wachstum der mesenchymalen Stromazellen .....	- 66 -
4.2.3	Bestätigung der mittels Cellscreen ermittelten Ergebnisse durch den immunhistochemischen Nachweis erfolgter DNA-Synthese.....	- 68 -
4.2.4	Bestätigung der mittels Cellscreen ermittelten Ergebnisse über die Aufnahme konsekutiver lichtmikroskopischer Bilder.....	- 70 -
4.3	Einfluss verschiedener in der BPD-Therapie etablierten Medikamente auf Zellzyklus und Apoptose.....	- 73 -
4.3.1	Untersuchung eines Arrests des Zellzyklus durch Steroide, Surfactant oder Coffein.....	- 73 -
4.3.2	Differenzierung zwischen der G0- und G1-Phase und Ermittlung einer Verschiebung durch BPD-Therapeutika .....	- 74 -

4.3.3	Untersuchung einer Auswirkung verschiedener etablierter BPD-Therapeutika auf die Apoptose.....	- 76 -
4.4	Einfluss der Kortikosteroide auf Morphologie und Differenzierung ..	- 78 -
4.4.1	Lichtmikroskopische Untersuchung der äußeren Zellform .....	- 78 -
4.4.2	Untersuchung von Oberflächenmarkern mittels Durchflusszytometrie .....	- 79 -
4.4.3	Analyse verschiedener Strukturproteine mittels Immun-fluoreszenz und Westernblot .....	- 80 -
4.5	Untersuchung regulierter intrazellulärer Signalwege .....	- 84 -
4.5.1	Statistische Analyse.....	- 84 -
4.5.2	Analyse der Genfunktionen.....	- 85 -
4.5.3	Upstream Regulation .....	- 87 -
5	Diskussion .....	- 88 -
5.1	Einfluss verschiedener BDP-Therapeutika auf Wachstum, Zellzyklus und Differenzierung der mesenchymalen Stromazellen von extremen Frühgeborenen .....	- 90 -
5.1.1	Wirkung von Kortikosteroiden insbesondere Dexamethason.....	- 90 -
5.1.2	Wirkung von Surfactant.....	- 92 -
5.1.3	Wirkung von Vitamin A und Coffein .....	- 93 -
5.2	Ermittlung eines durch Dexamethason induzierten Signalweges in MSC zur Reduktion der Rate an BPD von Frühgeborenen .....	- 96 -
5.2.1	Regulation von FBN2, IGF-1/2 und IRS2 durch Dexamethason.....	- 97 -
5.2.2	Interessante Kandidaten aus der Upstream Regulation.....	- 100 -
5.3	Ausblick .....	- 105 -
6	Zusammenfassung .....	- 107 -
7	Literaturverzeichnis .....	- 108 -
8	Anhang.....	- 122 -
8.1	Ethikvotum.....	- 122 -
8.2	Abkürzungsverzeichnis.....	- 122 -

## Inhaltsverzeichnis

---

8.3	Abbildungsverzeichnis.....	- 125 -
8.4	Tabellenverzeichnis.....	- 127 -
8.5	Danksagung .....	- 128 -

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 EINFÜHRUNG IN DAS KRANKHEITSBILD DER BRONCHOPULMONALEN DYSPLASIE

### 1.1.1 EPIDEMIOLOGIE UND KLINIK DER BPD

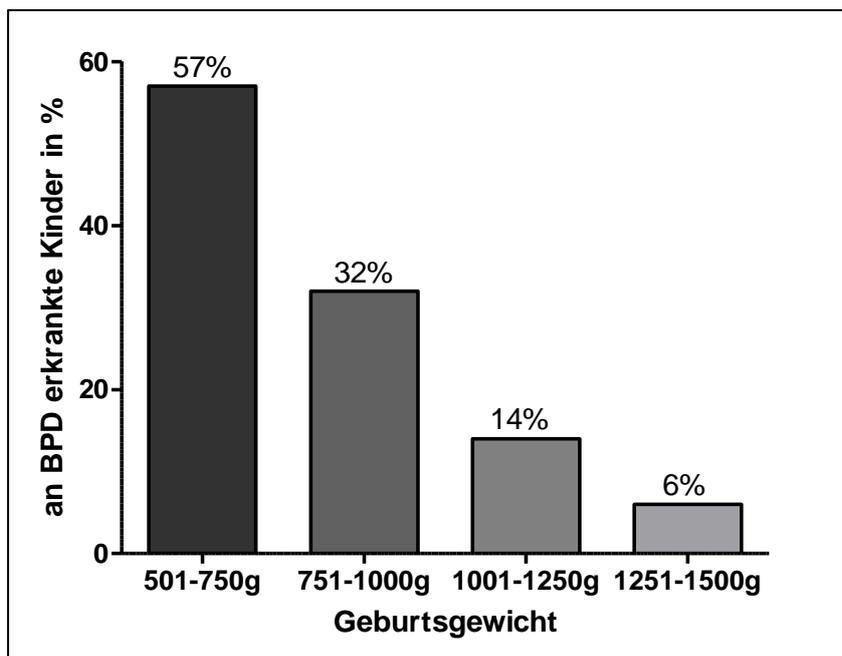
Nach WHO-Definition ist ein Baby ein Frühgeborenes (FG), wenn es vor Vollendung der 37. Schwangerschaftswoche (SSW) lebend geboren wird. Dies wird noch weiter unterteilt in extreme Frühgeborene bis zur 28. SSW und moderate/späte Frühgeborene ab der 32. bis 37. SSW. Weltweit kommen jedes Jahr ca. 15 Millionen Kinder zu früh auf die Welt, das entspricht 5-18% aller Geburten [1]. Die Anzahl an Babys, die vor der 32. SSW geboren werden, ist in den letzten Jahren deutlich angestiegen. Man geht davon aus, dass die steigende Tendenz aufgrund der demographischen Entwicklung, der neuen Möglichkeiten der Reproduktionsmedizin und der stetigen Verbesserung der medizinischen Versorgung anhält [2].

Aufgrund fehlender Organreife treten bei Frühgeborenen häufiger schwere Komplikationen auf. An erster Stelle sind hier Probleme im Respirationstrakt, besonders die bronchopulmonale Dysplasie (BPD) oder auch chronische Lungenerkrankung des Frühgeborenen (nCLD, neonatale chronic lung disease) zu nennen. Sie wird, wie nachfolgend näher erläutert, sowohl durch endogene als auch durch exogene Faktoren beeinflusst und resultiert insbesondere in einer postnatal gestörten Lungenreifung bzw. -entwicklung mit Beeinträchtigung des Gasaustausches.

Über die letzten Jahrzehnte haben sich, durch das immer tiefere Verständnis der Pathophysiologie, das Krankheitsbild und die klinische Präsentation der BPD-Erkrankten gewandelt. Nicht zuletzt aufgrund der verbesserten medizinischen Versorgung von Frühgeborenen, speziell durch die antenatale Steroidgabe, die postnatale Surfactantapplikation, lungenschonendere Beatmungsverfahren sowie durch die Optimierung der Ernährungstherapie, sank in den letzten Jahren die Mortalität von Frühgeborenen [3-5].

Nach der MOSAIC-Studie haben in Europa 16,7% der Frühgeborenen mit einem Gestationsalter zwischen 24 und 32 vollendeten SSW eine BPD. Die Inzidenz der BPD ist jedoch allein in Europa regional sehr unterschiedlich. In Großbritannien ist die BPD-

Rate beispielsweise deutlich höher (Trent, Northern: >20%) als in Italien (Lazio: ca. 10%), dafür aber auch die Überlebensrate der an BPD erkrankten FG (Trent, Northern: 83,3-86,9%; Lazio: 78,5%). Gründe dafür sind neben den medizinischen Versorgungsmöglichkeiten auch genetische Faktoren, wie zum Beispiel Polymorphismen in den Genen für verschiedene Surfactantproteine [6]. Nach Fanaroff et al. sind knapp ein Viertel aller Kinder mit einem Geburtsgewicht unter 1500g betroffen. In Abbildung 1.1-1 ist die Häufigkeitsverteilung in Bezug auf das Geburtsgewicht dargestellt [4].



**Abbildung 1.1-1: Anteil an BPD erkrankter Kinder zwischen 1997 und 2002 nach Geburtsgewicht [4]**

Frühgeborene mit BPD benötigen in der Regel eine Atemunterstützung sowie supplementären Sauerstoff über einen Zeitraum von mehreren Wochen und sind auch nur langsam davon zu entwöhnen. Nach einer vorübergehenden Besserung kommt es häufig zu einer progredienten Verschlechterung der Lungenfunktion. Diese ist Ausdruck der bronchopulmonalen Dysplasie [5]. Klinisch präsentieren sich die Kinder tachydyspnoeisch. Sie weisen gehäuft Apnoen, gefolgt von Sättigungsabfällen auf [7]. Radiologisch zeigt sich die Lunge meist mit streifiger bis hin zu diffuser Verschattung aufgrund des Lungenödems, der Entzündungsreaktion und von Atelektasen [5, 8].

Neben dem Gasaustausch erfüllt die Lunge eine wichtige Funktion der Abwehr von Krankheitserregern. Bei Patienten mit BPD treten zum Teil noch bis ins

Erwachsenenalter im Vergleich zu lungengesunden Menschen gehäuft schwerere Atemwegsinfektionen auf [9].

In der Lungenfunktion von Schulkindern ehemaliger extremer Frühgeborener ist ein verringertes Tidalvolumen bei erhöhter Resistance charakteristisch. Die expiratorische Flussrate ist bis ins junge Erwachsenenalter verringert. Des Weiteren sind Residual- und Totraumvolumen vergrößert. Die geringere Diffusionskapazität ist vermutlich auf die gestörte Entwicklung des Lungengefäßsystems, sowie der zum Teil auftretenden pulmonalen Hypertonie zurückzuführen. Ebenso weisen Kinder mit nCLD unter Belastung eine schlechtere Lungenfunktion auf, meist ohne merkliche Leistungseinschränkung. Im höheren Erwachsenenalter treten jedoch bei ehemals Frühgeborenen früher Probleme auf, ähnlich einer COPD mit Leistungsminderung aufgrund der schlechteren Lungenfunktion [10-14].

Die bronchopulmonale Dysplasie hat nicht nur Auswirkungen auf die Lunge, sondern auch auf andere Organsysteme. Aufgrund der pulmonalen Hypertonie kommt es regelmäßig zur Hypertrophie des rechten Herzens, einem Cor pulmonale. Im Verlauf entwickelt sich die pulmonale Hypertonie oftmals zurück, kann jedoch auch über Jahre persistieren [15-17].

Als besonders empfindliches Organ hat eine Frühgeburtlichkeit auch z.T. schwerwiegende Auswirkungen auf das Gehirn. Selbst bei relativ komplikationslosem postpartalen Verlauf (z.B. keine Hirnblutungen) sind im Schulalter neurologische Auffälligkeiten nachweisbar. Hierzu zählen insbesondere Schulprobleme, ein verminderter IQ im Vergleich zu Gleichaltrigen, kognitive Störungen mit Beeinträchtigung der visuospatialen Wahrnehmung, Lese- und Rechtschreib- oder Rechenschwäche sowie Verhaltensauffälligkeiten (z.B. ADHS, Autismus). Die Kinder sind allgemein eher ängstlicher, introvertierter und haben Bindungsprobleme. Zudem leiden sie häufiger an depressiver Verstimmung. Zerebralpareesen oder Seh- und Hörstörungen treten nur noch selten bei extremen Frühgeborenen auf, gering ausgeprägte neurologische Störungen sind jedoch sehr häufig. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass die neurologischen Entwicklungsstörungen in Zusammenhang mit einem verringerten Gehirnvolumen, insbesondere vermindertem Volumen der weißen Substanz, aber auch der grauen Substanz stehen [18-21].

### 1.1.2 DEFINITION DER BPD UND STÖRUNG DER LUNGENENTWICKLUNG

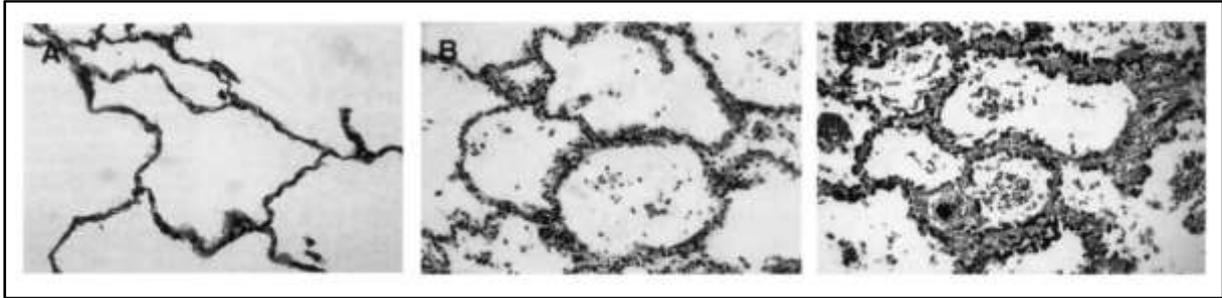
1967 wurde erstmals von Northway et al. [22] das Krankheitsbild der bronchopulmonalen Dysplasie beschrieben („alte BPD“). Als klinisches Kriterium wurde eine Therapie mit Sauerstoff und mechanischer Beatmung über mindestens 150 Stunden bei Frühgeborenen mit RDS angesehen. Als charakteristisch galt eine Entzündung der Lunge mit alveolärem Lungenödem und deutlicher interstitieller Fibrose. Zudem lagen eine Hypertrophie der glatten Muskulatur und eine Verdickung der Pulmonalarterien vor [23, 24].

Durch die Einführung der Therapie mit Surfactant sowie durch die antenatale Steroidgabe, änderte sich das histologische Bild: weniger, dafür aber größere Alveolen mit nur geringer Fibrose und uniformer Entzündung (siehe Abbildung 1.1-2). 2001 wurde von Jobe und Bancalari die Definition der „neuen BPD“ der Surfactant-Ära eingeführt [3]. Hierbei wird neben dem Sauerstoffbedarf auch das Gestationsalter mitberücksichtigt (siehe Tabelle 1.1-1). Es spielt der Arrest der Lungenentwicklung im sakkulären Stadium die entscheidende Rolle in der Pathogenese [5, 9, 25-27].

**Tabelle 1.1-1: Klinische Definition der neuen bronchopulmonalen Dysplasie [3]**

Gestationsalter	<32 SSW	≥32 SSW
Zeitpunkt der Evaluation	36 Wochen PMA oder Entlassung (früherer Zeitpunkt)	28.-56. Lebenstag (LT) oder Entlassung (früherer Zeitpunkt)
Klinische Kriterien:	<b>Therapie mit supplementärem Sauerstoff &gt;21% über mindestens 28 Tage +</b>	
<b>Milde BPD</b>	+ atmen von Raumluft mit 36+0 / 56. LT oder zur Entlassung	
<b>Moderate BPD</b>	+ Bedarf an supplementärem Sauerstoff <30% mit 36+0 / 56. LT oder zur Entlassung	
<b>Schwere BPD</b>	+ Bedarf an supplementärem Sauerstoff ≥ 30% und/oder Beatmung mit positive airway preassure (PPV, NCPAP) mit 36+0 / 56. LT oder zur Entlassung	

PMA: post menstrual age; PPV: positiv pressure ventilation; NCPAP: non-invasive continuous positive airway pressure

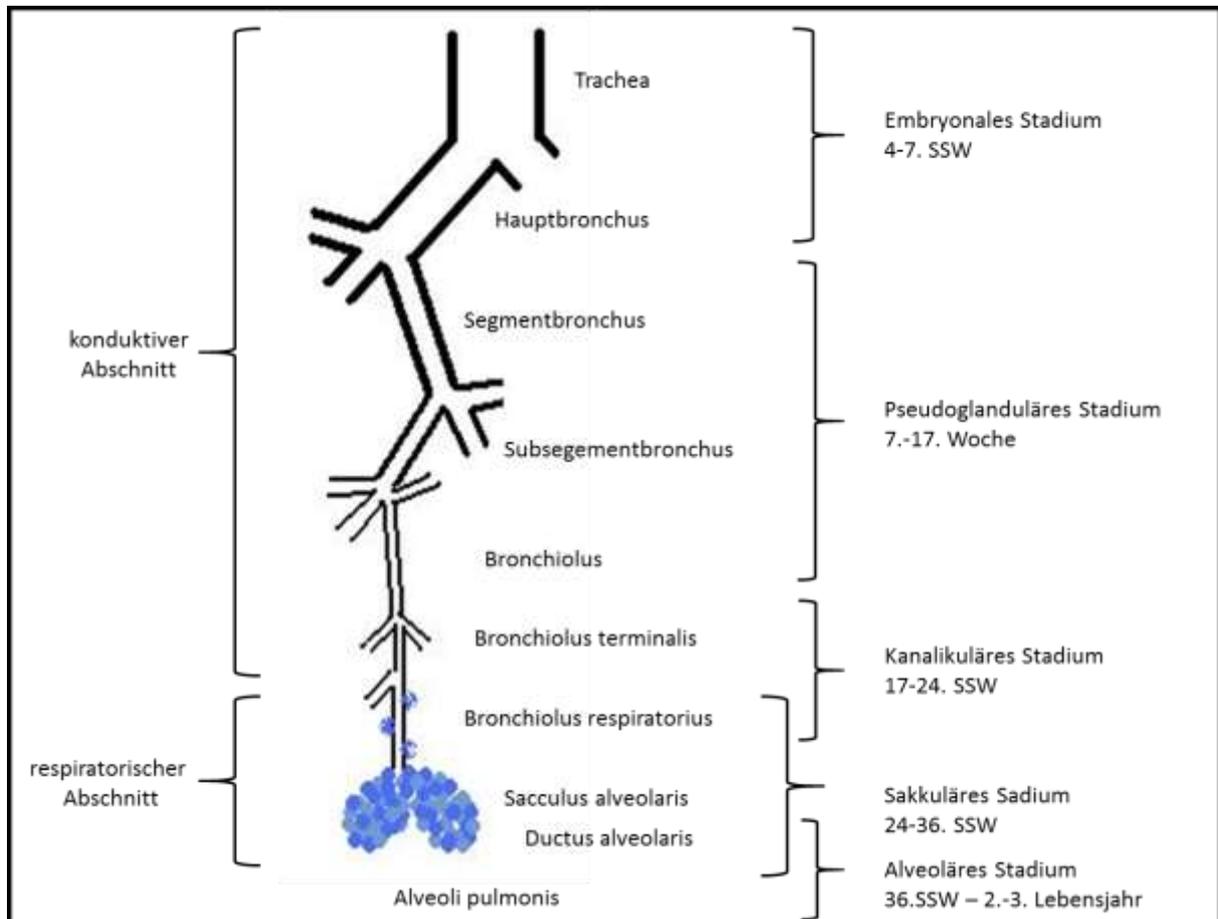


**Abbildung 1.1-2: Alveolarisierung in Abhängigkeit einer Surfactanttherapie der Frühgeborenen (FG) mit BPD.** A: normale gleichmäßig ausgebildete alveoläre Septen nach Surfactanttherapie in ca. 80% der Fälle. B: Geringgradige Fibrose nach Surfactanttherapie, tritt bei ca. 20% der Kinder auf. C: Schwere Fibrose der alveolären Septen ohne Surfactanttherapie (Prä-Surfactant-Ära). [25]

Nach histologischen Kriterien teilt man die Lungenentwicklung in verschiedene Stadien ein. Während der embryonalen Phase (4.-7. SSW) formt sich aus der ventralen Wand des Vorderdarms eine Aussackung, die Laryngotrachealrinne. Durch dichotome Verzweigungen entsteht letztendlich der Bronchialbaum. Erst mit dem kanalikulären Stadium der Lungenentwicklung (17.-24. SSW) beginnt die Bildung des respiratorischen Abschnittes des Bronchialbaumes (siehe Abbildung 1.1-3). Aus den Bronchioli terminales entstehen die Canaliculi mit ihren Bronchioli respiratorii und den Ductus alveolares. Des Weiteren differenziert sich ein Teil der kubischen Pneumozyten Typ II zu flachen Pneumozyten Typ I. Es bilden sich vermehrt Kapillaren, die sich im Verlauf der Entwicklung immer weiter der Wand der Canaliculi annähern. Die beiden letzten Aspekte sind Voraussetzung für die Lebensfähigkeit des Frühgeborenen. Mit dem Übergang zum sakkulären Stadium (ab ca. der 24. SSW) beginnen die Pneumozyten Typ II mit der Bildung von Surfactant (**surface active agent**). Dieser besteht aus verschiedenen Glycerophospholipiden, Proteinen, Neutralfetten sowie Cholesterol und ist notwendig, um postnatal die Oberflächenspannung der Alveolen herabzusetzen und so ein Kollabieren dieser zu verhindern. Die Septen sind jedoch noch dick und zellreich und enthalten nur einen niedrigen Anteil an kollagenen und elastischen Fasern. Die Alveolarisierung dauert noch bis einige Jahre nach Geburt an [28-31].

FG die bereits zum Ende des kanalikulären Stadiums (ca. 24. SSW) oder Anfang des sakkulären Stadiums geboren werden, besitzen ein hohes Risiko an der BPD zu erkranken. Die Lunge ist zwar insoweit ausgebildet, dass ein Gasaustausch stattfinden kann, jedoch nur unter sehr erschwerten Bedingungen. Insbesondere die

Austauschfläche ist noch extrem gering und die Diffusionsstrecke groß. Zu diesem Entwicklungszeitpunkt beginnt die Pathogenese der bronchopulmonalen Dysplasie [27]. Letztendlich weisen die Lungen der Kinder mit einer BPD eine Verminderung der Anzahl an Alveolen und Lungenkapillaren mit Vergrößerung der Strukturen und Verdickung der Septen auf [9, 27].



**Abbildung 1.1-3: Schematische Darstellung der Entwicklung des Bronchialbaumes:** Die einzelnen Abschnitte des Bronchialbaumes entstehen durch dichotome Verzweigungen beginnend mit der Trachea. Erst mit der Ausbildung des respiratorischen Abschnittes kann ein FG überleben (ca. 24. SSW). [32]

In jedem Organ/Gewebe sind pluri- bzw. multipotente mesenchymale Vorläuferzellen für die Organogenese und Reparatur bzw. Erneuerung nach einer Schädigung, beispielsweise durch eine Erkrankung, notwendig. Auch in der Lunge spielen mesenchymale Stromazellen (MSC) eine entscheidende Rolle bei der Organentwicklung. Sie gelten insbesondere als Vorläufer für Myofibroblasten, die wiederum wichtige Bestandteile der extrazellulären Matrix (z.B. Elastin) sezernieren oder für Lipofibroblasten, die den Typ II-Pneumozyten Bausteine für die

Surfactantbildung liefern. Im Vergleich zu intrauterinen Bedingungen entsteht durch die Frühgeburt eine relative Hyperoxie. Diese induziert eine Funktions- und Differenzierungsstörung der MSC und ist wichtiger Bestandteil der Pathogenese der BPD. Dies führt zu einer Beeinträchtigung sowohl der Alveolo- als auch der Vaskulogenese [33, 34].

### 1.2 RISIKEN UND EINFLUSSFAKTOREN AUF DIE PATHOGENESE DER BPD

Neben dem Gestationsalter und dem Geburtsgewicht gibt es noch eine Reihe anderer Faktoren, die die Entwicklung einer bronchopulmonalen Dysplasie begünstigen und bei der Pathogenese eine wichtige Rolle spielen. Im Folgenden wird auf die wichtigsten Einflussfaktoren in Bezug auf ihr Auftreten vor, bzw. um den Geburtszeitpunkt eingegangen.

#### 1.2.1 ANTE- UND PERINATALE FAKTOREN

Während der Fetalperiode bis zur Geburt spielen Infektionen, insbesondere im Rahmen einer Chorioamnionitis sowie ein zu geringes Wachstum des Fetus (IUGR, intrauterine growth restriction) eine wichtige Rolle bei der Entstehung der BPD [35]. Eine genetische Prädisposition wird ebenfalls diskutiert [9]. Bisher wurden bereits Gene untersucht, die für die Bildung von Surfactant, die Entwicklung von Gefäßen und für die Inflammationsreaktion von Bedeutung sind. Ein Defekt in einem oder mehreren dieser Gene kann somit ebenfalls prädisponierend für die BPD-Entstehung und auch Schwere der Erkrankung sein. Im Speziellen konnte eine Veränderung im PDGF-R $\alpha$ -Gen als ursächlich für eine gestörte alveoläre und mikrovaskuläre Entwicklung aufgezeigt werden [36-39].

Bei antenatalen Infektionen ist die Datenlage bisher jedoch noch widersprüchlich. Es gibt Meinungen, die Chorioamnionitis, eine der häufigsten Ursachen für Frühgeburtslichkeit, würde ebenfalls zu einer Steigerung der BPD-Rate führen [40]. Insbesondere das Auftreten von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 im Fruchtwasser ist mit der chronischen Lungenerkrankung des Frühgeborenen assoziiert [41]. Andererseits wird postuliert, dass es keinen oder sogar einen protektiven Effekt gebe [42]. Hierbei scheint ein wichtiger Unterscheidungsfaktor zu sein, ob der Fetus ebenfalls intrauterin eine Inflammationsreaktion zeigt oder nicht. Für ersteres wurde schon gezeigt, dass die RDS-Rate niedriger ist als bei Frühgeborenen, die keine fetalen Entzündungsreaktionen zeigen [43, 44]. Ebenso gibt es Studien, dass von Frühgeborenen, die eine intrauterine Reaktion aufwiesen, deutlich weniger Kinder im Verlauf an einer bronchopulmonalen Dysplasie erkrankten [45-47].

Kinder mit bronchopulmonaler Dysplasie hatten nach der Geburt niedrigere APGAR- und pH-Werte sowie eine höhere Asphyxie-Rate [48-50]. Auch Neugeborene mit einem Geburtsgewicht unter der dritten Perzentile (SGA, small for gestational age), beispielsweise im Rahmen einer Plazentainsuffizienz, erkrankten häufiger an der BPD, als Kinder mit höherem Gewicht im Verhältnis zu ihrem Gestationsalter [51, 52]. Wie bereits in der Pathogenese beschrieben, sind der Surfactantmangel und die Lungenunreife die Hauptfaktoren, die zur BPD beitragen. Der Surfactantmangel führt unbehandelt zu einer schwereren Form der BPD, der „alten klassischen BPD“ (siehe Kapitel 1.1.1) mit Destruktion des Epithels und starker Fibrose [3, 26].

### 1.2.2 POSTNATALE FAKTOREN

Infektionen sind auch postnatal ein wichtiger Risikofaktor. Ein Pneumothorax, ein Flüssigkeitsoverload sowie eine lange Beatmungszeit mit zusätzlicher Sauerstoffgabe begünstigen die Entstehung einer chronischen Lungenerkrankung des Frühgeborenen. Sie stören die Weiterentwicklung und Differenzierung der Lunge, da diese speziell in der sakkulären Phase besonders empfindlich ist [53].

Die mechanische Beatmung sowie die Sauerstofftoxizität sind wichtige Trigger der bronchopulmonalen Dysplasie. Es werden verschiedene Entzündungsmediatoren freigesetzt, die die Entwicklung einer nCLD begünstigen [22, 27]. Insbesondere durch zu hohe Tidalvolumina wird die unreife Lunge des Frühgeborenen stark verändert [54]. Hierdurch wird eine Entzündung des Gewebes initiiert, die zur Verdickung der Alveolarsepten mit Zerstörung der Struktur und Zusammensetzung der extrazellulären Matrix führt [55, 56]. Mittlerweile konnte durch die Therapie mit Surfactant eine Verbesserung des Beatmungsregimes und frühe Entwöhnung vom Respirator die Fibrosierung verringert werden. [57-59]. In Studien wurde gezeigt, dass bereits eine kurze Hyperoxie die bronchopulmonale Dysplasie verschlechtert. In Tierversuchen konnte nachgewiesen werden, dass eine Hyperoxie zu einer akuten Entzündung mit Störung von Alveolarisierung und Kapillarisation führt. In der Folge kommt es zudem zur Proliferation von Fibroblasten und Vermehrung der extrazellulären Matrix [60-63].

Bei postnataler Sepsis wurde zwischen verschiedenen Bakterien, z.B. koagulase-negativen Staphylokokken oder einer Candidämie unterschieden. Beide Gruppen weisen eine Assoziation mit der BPD auf, jedoch ist sie bei Candida-Infektionen am

größten [9, 45, 64]. Bereits eine Kolonialisierung mit *Ureaplasma urealyticum* gilt als Risikofaktor für die BPD [65, 66].

Ein persistierender Ductus arteriosus (PDA) gilt ebenfalls als Risikofaktor der BPD. Er führt zu einer Erhöhung des pulmonalarteriellen Drucks und ist assoziiert mit der Entwicklung einer PVD (pulmonal vascular disease, siehe Kapitel 1.2.3) [67]. Außerdem kann es nicht zuletzt durch eine hohe Flüssigkeitszufuhr zu einem interstitiellen Lungenödem kommen. Zum einen aufgrund von Kapillarlecks bei Infektionen, aber auch durch einen erhöhten pulmonalarteriellen Druck bei PDA. Hierbei wird die Compliance der Lunge erniedrigt und die chronische Lungenerkrankung des Frühgeborenen begünstigt [53, 68].

### *1.2.3 GEFÄßPATHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN IM RAHMEN DER BPD*

Nicht nur die Bildung und Differenzierung der Alveolen, sondern auch die der Lungengefäße, insbesondere der Kapillaren, ist gestört (PVD, pulmonary vascular disease). Möglicherweise ist auch die PVD Ursache für die gestörte Alveolarisierung und das Bild der BPD [69].

In einigen Bereichen der Lunge sind die Endothelzellen recht spärlich vorhanden. Die Kapillaren sind kleiner und nicht normal verteilt und vernetzt. In anderen Bereichen sind sie auch dilatiert. In Studien konnte bereits eine Minderung des VEGF (vascular endothelial growth factor) in Zusammenhang mit der Störung der Vaskulogenese bei der BPD nachgewiesen werden. Zudem sind die Kapillaren weiter von den Alveolen entfernt als normal, was zu einer Vergrößerung der Diffusionsstrecke führt [37, 70, 71]. Zusätzlich ist die Fläche für den Gasaustausch zwischen Alveolen und Blut vermindert, mit einem folglich höheren Bedarf an Sauerstoff. Charakteristisch sind dabei ein erhöhter Gefäßtonus sowie eine Störung der Vasoaktivität insbesondere im Rahmen von Entzündungen [72]. Histologisch sind eine Hypertrophie der glatten Muskulatur und eine Einwanderung von Fibroblasten in die Gefäßwand mit konsekutiver Verdickung der Media zu finden. Alle genannten Aspekte resultieren in einer pulmonalen Hypertonie und tragen zu einer erhöhten Morbidität und auch Mortalität der Frühgeborenen bei. Sie tritt bei jedem vierten Kind mit BPD auf [24]. Wie bereits in Kapitel 1.2.2 erwähnt, trägt auch ein persistierender Ductus arteriosus zur Erhöhung des pulmonalarteriellen Drucks bei und unterstützt somit die PVD [67].

### *1.2.4 BEDEUTUNG DER PULMONALEN INFLAMMATIONSREAKTION FÜR DIE BPD-ENTSTEHUNG*

In wieweit die Entzündungsreaktion der Lunge auf verschiedene exo- und endogene Faktoren zur Entwicklung einer BPD bei extremen Frühgeborenen beiträgt, ist wichtiger Gegenstand der aktuellen Forschung, denn sie stellt eine zentrale Ursache der Störung von Alveolo- und Vaskulogenese dar. Die Inflammationsreaktion kann auf verschiedenen Wegen ausgelöst werden. Zu den endogenen Risiken, die zur Inflammation beitragen, gehören insbesondere der Mangel an Surfactant und das noch sehr unreife Abwehrsystem gegenüber Erregern und Noxen. Sowohl prä- als auch postnatale Infektionen lösen eine Entzündungsreaktion in der Lunge aus. Als weitere exogene Faktoren sind v.a. die mechanische Beatmung und die Sauerstofftoxizität zu nennen. Tierstudien haben gezeigt, dass auch rein durch die letzten beiden genannten Aspekte, also ohne eine zusätzliche Infektion, die Pathologie der BPD hervorgerufen werden kann [64, 73-77].

Die Inflammationsreaktion ist charakterisiert durch die Einwanderung von Entzündungszellen und erhöhten Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen. Insbesondere ein erhöhter Anteil an Neutrophilen und Makrophagen konnte bereits in mehreren Studien durch Analyse mittels bronchoalveolärer Lavage nachgewiesen werden. Es herrscht zudem ein Ungleichgewicht zwischen proteolytischen Enzymen und ihren Inhibitoren, vor allem von Elastase und  $\alpha$ 1-Proteinase-Inhibitor sowie Matrixmetalloproteinasen. Letztere haben ebenfalls wichtige Funktionen bei der Lungenentwicklung. All dies führt zu einer erhöhten Permeabilität der Lungengefäße sowie zum Umbau des Lungenparenchyms mit Zerstörung der extrazellulären Matrix. In der Folge kommt es zu einer Störung der normalen Differenzierung von Alveolen und Lungenkapillaren. Die Alveolenstruktur ist vergrößert mit verdickten Septen, die kapillären Strukturen sind ebenfalls vereinfacht und gestört. Es entsteht das typische Bild der bronchopulmonalen Dysplasie [73, 77-82].

#### **1.2.4.1 Pro-inflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren**

Eine Erhöhung proinflammatorischer Zytokine, insbesondere TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8, wurde regelmäßig in Studien im Trachealsekret oder im Blut von Kindern mit BPD

gefunden [83-86]. Bereits im Fruchtwasser wurden aufgrund einer Chorioamnionitis erhöhte Zytokinspiegel ermittelt und sind mit einer höheren BPD-Rate extremer Frühgeborener assoziiert [41]. Die Höhe der Zytokinspiegel korreliert mit der Dauer der mechanischen Beatmung sowie der Therapie mit supplementärem Sauerstoff. Es herrscht ein Ungleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen (z.B. IL-10, Clara cell protein 10 (CC10)) und Wachstumsfaktoren (z.B. VEGF, PDGF-R $\alpha$ ), letztere sind sogar erniedrigt [71, 77, 84, 87, 88].

IL-1 $\beta$  induziert eine Entzündungsreaktion mit Einwanderung von Neutrophilen und Makrophagen. Im Mausmodell führt eine Überexpression postnatal zur gestörten Septierung der Alveolen mit veränderter Zusammensetzung der extrazellulären Matrix. Die Folge ist eine Vergrößerung und Verdickung der alveolären Strukturen mit Fibrose. Des Weiteren beeinträchtigt es auch die Vaskulogenese in der Lunge über die Hemmung von VEGF [83, 89, 90].

Interleukin 8 ist ein Chemokin, das Neutrophile anlockt und aktiviert. Es konnten erhöhte Konzentrationen von IL-8 mit einem stark erhöhten Anteil an Neutrophilen im Trachealaspirat in Verbindung gebracht werden [87]. Auch andere Marker für Neutrophileneinwanderung sind erhöht, z.B. LTB<sub>4</sub> (Leukotriene B<sub>4</sub>), PAF (Plättchenaktivierender Faktor), Komplement C5 und sICAM-1 (Soluble Intercellular Adhesion Molecule 1) [73, 91]. sICAM-1 ist ein wichtiger Rezeptor für CD11b/CD18 positive Zellen und führt ebenfalls zur Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion und Rekrutierung von Neutrophilen [92, 93].

IL-10 als antiinflammatorisches Zytokin unterdrückt die Produktion von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 und wirkt somit protektiv gegenüber der BPD. Es senkt sowohl die Apoptoserate von Lungenfibroblasten sowie deren Zytokinbildung. Bei Kindern mit BPD ist es erniedrigt und sein protektiver Effekt somit vermindert [87, 94, 95].

Das Dominieren der proinflammatorischen Zytokine führt zur Aktivierung des Komplementsystems, zu Kapillarlecks mit Plasmaproteinverlusten und einer zellulären Reaktion mit Einwanderung von Neutrophilen, Makrophagen und Fibroblasten [73, 96, 97].

Das Zusammenspiel verschiedener Wachstumsfaktoren ist ebenfalls entscheidend für eine normale Organentwicklung. Auch hier kommt es zu veränderter Expression einiger Faktoren, die dadurch bei der Entstehung einer nCLD mitwirken. Dazu gehören insbesondere TGF- $\beta$  und der BMP-Signalweg als wichtige Regulatoren der

Lungenentwicklung. In erster Linie stimuliert TGF- $\beta$  postnatal Fibroblasten und sorgt für die vermehrte Bildung extrazellulärer Matrix über Kollagen-, Fibronectin- und Elastinbildung. Es tritt in entzündetem Gewebe auf und führt letztendlich zur Fibrosierung von Organen. Erhöhte Level von TGF- $\beta$  ebenso wie von TGF- $\alpha$  führen postnatal zur Störung der Alveolarisierung. Sie zeigen im Mausmodell vergrößerte Alveolen sowie eine Fibrosierung der Lunge und imitieren somit das Krankheitsbild der BPD [98-102].

VEGF ist der zentrale Wachstumsstimulator in der Lunge über Stimulierung der Proliferation von Epithelzellen. Er ist essenziell für die Ausbildung der Gefäße der distalen Lungenabschnitte und beeinflusst dadurch auch die Alveolarisierung [103, 104]. Bei Kindern, die an der BPD erkrankt sind, ist der VEGF deutlich vermindert im Vergleich zu Lungengesunden [70, 87, 105]. Es existieren noch eine ganze Reihe weiterer Wachstumsfaktoren, die für die Lungenentwicklung relevant sind, deren Funktionen jedoch noch nicht ganz geklärt sind. Eine Störung des PDGF-Signalweges ist in diesem Zusammenhang von besonderer Bedeutung (s. Kapitel 1.2.4.2). Des Weiteren gehören unter anderem der epithelial growth factor, insulin like growth factor, neuregulin und fibroblast growth factor dazu [87, 88].

### ***1.2.4.2 Zelluläre Komponenten der Inflammationsreaktion und besondere Bedeutung der mesenchymalen Stromazellen (MSC) des Trachealspirates***

Die proinflammatorischen Zytokine und Chemokine induzieren eine Einwanderung von Entzündungszellen, insbesondere von Neutrophilen und Makrophagen. Im Vergleich zum RDS konnte nachgewiesen werden, dass bei der BPD über einen Zeitraum von mehreren Wochen und nicht nur über wenige Tage Neutrophile in der Lunge residieren. Die Einwanderung der Neutrophilen geschieht unter anderem als Reaktion auf die mechanische Beatmung der Frühgeborenen [97, 106]. Auch die Anzahl der Alveolarmakrophagen ist bei Kindern, die im Verlauf eine BPD entwickeln, im Vergleich zu denen, die nicht erkranken, erhöht. Durch die Aktivierung von Alveolarmakrophagen und Neutrophilen und der damit verbundenen erhöhten proteolytischen Aktivität, kommt es zur Störung der Lungenentwicklung, des Gewebes sowie zu einer Surfactantinaktivierung [107]. Es herrscht ein Ungleichgewicht zwischen den Kollagenasen, Elastasen, reaktiven Sauerstoffradikalen und ihren Inhibitoren (z.B. Serpin A1, Serpin B1, MMP-9), was zur Schädigung des Interstitiums führt. Im

Mausmodell wurde gezeigt, dass ein Mangel an MMP-9 (Matrix-Metalloproteinase 9) die alveoläre Hypoplasie bei der BPD verstärkt. Die Inflamationsreaktion führt außerdem zur Proliferation von Fibroblasten und Verdickung der Basalmembran [73, 77, 108, 109].

In neueren Studien wurden noch weitere Zellen im Lungengewebe von an der BPD erkrankten Kindern gefunden. Mittels Genomanalyse wurde eine Häufung von Bindegewebs-Mastzellen nachgewiesen, die Bedeutung dieser Zellakkumulation ist jedoch noch nicht weiter erforscht [110]. Außerdem wurden im Tiermodell autoreaktive T-Zellen in der Lunge entdeckt, die aufgrund ihrer Unreife zur Zerstörung des Lungenparenchyms beitragen [111].

Wie bereits in Kapitel 1.1.2 erwähnt, spielen mesenchymale Stromazellen eine wichtige Rolle bei der normalen Entwicklung der Lunge. Bei Frühgeborenen mit BPD konnten im Vergleich zu gesunden Kindern aus dem Trachealspirat vermehrt MSC isoliert werden. Die Anzahl der im Trachealsekret enthaltenen MSC korreliert mit der Beatmungsdauer und dem Schweregrad der BPD der Frühgeborenen. Ihnen wird nach neueren Studien eine besondere Rolle bei der Entstehung der bronchopulmonalen Dysplasie zugeschrieben. Sie gelten als Vorläuferzellen von Fibroblasten (Myo-, Lipofibroblasten), die genaue Herkunft dieser Zellen ist jedoch noch ungeklärt [34].

Hershenson et al. [112] hat die MSC genauer charakterisiert. Die aus dem Trachealspirat von Frühgeborenen (<30. SSW, unter mechanischer Beatmung bei RDS, weniger als 7 Tage alt, keine Sepsis) isolierten fibroblastenähnlichen Zellen entstammten hauptsächlich aus dem Sekret von Kindern, die im Vergleich eine längere mechanische Beatmung oder Sauerstoff benötigten und häufiger eine BPD entwickelten. Zudem enthielt das Aspirat dieser Kinder MCP-1, ein Chemokin, das Fibroblasten anlockt und somit ein Zeichen für deren Migration in die Lunge darstellt. Das Trachealspirat wurde während Routinemaßnahmen abgenommen und in Zellkultur genommen. Die adhären Zellen wurden für die weiteren Analysen verwendet. Die fibroblastenähnlichen Zellen waren spindelförmig und plastikadhärent und exprimierten typische Oberflächenmarker von Fibroblasten (CD90), von mesenchymalen Stammzellen (STRO-1, CD73, CD105, CD166) sowie CD13, CCR-2b (C-C chemokine receptor). Die Marker CD34 (Antigen für hämatopoetische Stammzellen), CD45 (Leukozytenantigen), CD11b (Makrophagenmarker) und CD31

(Marker für Endothelzellen) wurden nicht exprimiert. Zudem exprimierten die Zellen  $\alpha$ -SMA (smooth muscle actin) und PH (prolyl 4-hydroxylase, Schlüsselenzym der Kollagensynthese). Die isolierten fibroblastenähnlichen Zellen weisen somit Charakteristika einer mesenchymalen Stammzelle auf. Es wird vermutet, dass sie dementsprechend auch ein Wachstums- und Differenzierungspotenzial ähnlich wie Stammzellen aufweisen und eine große Bedeutung bei der Pathogenese der BPD haben. Hershenson et al. konnte eine Differenzierung der Zellen zu Adipozyten, Osteozyten und Myofibroblasten nachweisen. Die genaue Herkunft dieser Zellen ist bisher noch spekulativ, für die Herkunft direkt aus der Lunge spricht das lungenspezifische RNA-Profil [112, 113].

Die Charakterisierung der MSC mittels Oberflächenmarker sowie ihr etwas eingeschränktes Differenzierungspotential lassen sie als multipotente mesenchymale Stromazellen, jedoch nicht als Stammzellen einordnen. Die in den Experimenten aus dem Trachealspirat isolierten Zellen zeigten die oben genannten Eigenschaften: sie waren plastikadhärent, wiesen die Oberflächenmarker CD13, CD73, CD90, CD105 auf, jedoch nicht CD11b, CD14, CD15, CD34, CXCR4 und Glycophorin A. Sie zeigten in vitro ein Differenzierungspotential zu Osteoblasten, Adipozyten und Myofibroblasten [114]. Diese Charakteristika unterscheiden MSC von anderen Vorläuferzellen und hämatopoetischen Stammzellen. Sie wurden demnach den mesenchymalen Stromazellen zugeordnet [33].

Unter Einfluss von TGF- $\beta$  differenzierten sich die MSC weiter zu  $\alpha$ -SMA-positiven Myofibroblasten, welche bei Kindern mit BPD vermehrt im Lungengewebe in den Alveolarsepten zu finden sind [34]. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe weisen darauf hin, dass eine pathologische Differenzierung der MSC unter Zytokineinfluss (u.a. TGF- $\beta$ ) einen entscheidenden Faktor in der Pathogenese der BPD spielt. Es zeigte sich, dass Zellen mit starkem Wachstum von Kindern stammen, die an einer schwereren BPD erkrankten. Diese Zellen exprimieren zudem vermehrt NF $\kappa$ B und vermindert  $\alpha$ SMA. Diese Kriterien könnten als prognostische Zeichen helfen die Behandlung der Frühgeborenen rechtzeitig anzupassen und eine zielgerichtete Therapie zu entwickeln. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal der MSC von FG mit BPD zu gesunden Kindern ist die verminderte Expression von PDGF-R $\alpha$ , eine erhöhte Sekretion von TGF- $\beta$ 1 und ein gestörter  $\beta$ -Catenin-Signalweg. Die PDGF-R $\alpha$ -positiven Zellen scheinen für die Bildung der  $\alpha$ SMA-positiven Fibroblasten wichtig zu sein, ohne die die Alveologenese gestört wird [33, 88, 115, 116].

Die Untersuchungen lassen vermuten, dass nicht nur die Präsenz der MSC im Trachealspirat als negativer Prädiktor für die BPD gilt, sondern insbesondere auch die Änderung des Phänotyps, ausgelöst durch die inflammatorischen Zytokine (s. Kapitel 1.2.4.1) entscheidend für die Pathogenese ist [33, 34, 116].

Neuste Therapiestrategien untersuchen die Wirkung von aus dem Nabelschnurblut gewonnenen allogenen MSC auf Frühgeborene, die ein hohes Risiko haben an einer BPD zu erkranken. Sowohl eine intratracheale als auch intravenöse Verabreichung der Zellen zeigt sich in einigen Studien bereits erfolgsversprechend [117].

### 1.3 PRÄVENTION UND THERAPIE DER BPD

#### 1.3.1 ANTENATALE STEROIDE, SURFACTANT, COFFEIN, VITAMIN A

Bei der Prävention der bronchopulmonalen Dysplasie haben sich insbesondere vier Therapeutika herausgestellt, die nachgewiesen einen positiven Einfluss auf Inzidenz und Mortalität haben: pränatale und postnatale Kortikosteroide, Surfactant, Coffein und Vitamin A.

Antenatal werden Kortikosteroide, in erster Linie Betamethason und Dexamethason zur Lungenreifeinduktion eingesetzt. Diese sollten bis mindestens 24 Stunden, im Normalfall mindestens 48h vor der Geburt appliziert werden und sind bis zur 34. SSW empfohlen. Sie senken nachweislich die Mortalität von Frühgeborenen. Außerdem ist dadurch auch die Rate an Kindern mit RDS gesunken, ebenso wie die von Hirnblutungen (IVH) und nekrotisierender Enterokolitis. Die Neugeborenen benötigen zudem kürzere Beatmungszeiten [118-121].

Bei Kindern mit RDS ist ein niedrigerer Surfactant-Spiegel aufgefallen, als bei gesunden Babys, zudem bekommen sie häufiger Infektionen. Eine prophylaktische sowie frühzeitige endotracheale Surfactantgabe verbessert die Lungenfunktion und wirkt auch unterstützend auf das Immunsystem in der Lunge. Es senkt sowohl die BPD-Rate als auch die neonatale Mortalität. Surfactant schützt die Lunge zudem vor einem Beatmungstrauma, die Dauer der mechanischen Beatmung sowie der Sauerstoffbedarf werden gesenkt [122-124].

Zur Unterstützung des eigenen Atemantriebs der Frühgeborenen wird bei symptomatischen Apnoen mit rezidivierenden Entsättigungen Coffein verabreicht. Als positiver Nebeneffekt konnte neben einer Reduktion der Zerebralparenzen und einer Verbesserung des kognitiven Outcomes unter Coffeinthherapie auch eine signifikante Senkung der BPD-Rate ermittelt werden, wie es genau dazu kommt, ist bisher noch unklar [125, 126].

Frühgeborene haben einen niedrigeren Vitamin A-Status als reifgeborene Kinder, was das Risiko für die chronische Lungenerkrankung erhöht. Vitamin A ist für die Regeneration von geschädigtem Gewebe sowie für eine optimale Organentwicklung notwendig. Unter einer Substitutionstherapie ist das Outcome der Babys mit BPD signifikant besser, sie können früher extubiert werden und auch Komplikationen wie eine Frühgeborenenretinopathie treten seltener auf [127-130].

### 1.3.2 WEITERE BEHANDLUNGSSTRATEGIEN DER BPD

Neben den bisher genannten Medikamenten sind weitere wichtige Punkte in der Betreuung von extremen Frühgeborenen die strikte Überwachung des Flüssigkeitshaushaltes, eine ausreichende Kalorienzufuhr, eine Optimierung der Ernährungstherapie sowie eine Infektionsprophylaxe (prophylaktische antibiotische/antimykotische Therapie, STIKO-Impfempfehlungen, RSV-Prophylaxe) [131, 132]. Begleiterkrankungen, wie beispielsweise eine arterielle Hypotension, ein PDA oder andere Komplikationen der Frühgeburtlichkeit, müssen ebenfalls nach den aktuellen Leitlinien therapiert werden [133, 134].

Ein großes Thema im Forschungsbereich der BPD ist die Optimierung der assistierten Beatmung sowie Definition der optimalen Sauerstoffsättigung bei Frühgeborenen. Ist letztere zu niedrig, können eine Wachstumsretardierung, eine nekrotisierende Enterocolitis (NEC) sowie ein erhöhter pulmonaler Gefäßdruck resultieren. Andererseits birgt exogene Sauerstoffzufuhr ein erhöhtes Risiko einer Frühgeborenenretinopathie (ROP, retinopathy of prematurity) sowie der Schädigung des Lungenparenchyms durch freie Radikale. Es ist folglich auch hier eine Gratwanderung zu entscheiden, welcher Sättigungsbereich als optimal gelten soll [134-139].

Viele Studien beschäftigen sich zudem mit der Optimierung des Beatmungsregimes, unter anderem in Bezug auf Tidalvolumen, Beatmungsdruck und Sauerstoffsättigung [140]. Eine frühzeitige prophylaktische Surfactantapplikation und eine frühzeitige Beatmung mit CPAP stehen hierbei im Zentrum der Diskussionen [141-144]. Ein Beatmungsregime, das regelmäßig in der Therapie von Frühgeborenen angewandt wird, ist die Hochfrequenzoszillation (HFO). Im Vergleich zur lungenprotektiven konventionellen Beatmung konnte die BPD-Rate hierbei jedoch nicht gesenkt werden [134, 145].

Eine wichtige und zum Teil auch noch umstrittene Medikamentengruppe zur Behandlung der BPD sind die Kortikosteroide. Sie werden bereits antenatal zur Lungenreifeinduktion eingesetzt, aber auch postnatal insbesondere in schwereren Fällen zur Verbesserung der Beatmungssituation sowie zur schnelleren Entwöhnung vom Respirator. Da bei der BPD die Entzündungsreaktion in der Lunge eine

bedeutende Rolle spielt, ist die antiinflammatorische Wirkung der Steroide sehr willkommen. Zudem vermindern sie Lungenödeme und fördern die Bildung von Surfactant. Sie haben folglich einen akuten positiven Effekt auf den Gasaustausch und die Lungenfunktion, was letztendlich eine frühere Extubation bei mechanischer Beatmung ermöglicht. Ebenfalls ist die Lunge bei Kindern mit einer BPD, die mit Steroiden therapiert wurden, weniger fibrosiert. Somit ist die Lungenfunktion auch später, wenn die Kinder älter werden nicht so stark beeinträchtigt [146-148].

Man unterscheidet eine frühe Kortikosteroidtherapie innerhalb der ersten sieben Lebensstage von einer späten. Eine frühe Gabe reduziert die Inzidenz der BPD, jedoch nicht die Mortalität. Behandlungsrisiken, die beachtet werden müssen, sind gastrointestinale Blutungen oder Perforationen, Hyperglykämien und eine arterielle Hypertonie. Eine späte Kortikosteroidtherapie vermindert neben der BPD-Rate auch Mortalität und Sauerstoffbedarf und wird häufig zur erleichterten Extubation angewandt. Auch hier treten vermehrt Hyperglykämien, eine arterielle Hypertonie oder eine Retinopathie auf [149-151]. Eine inhalative Gabe von Kortikosteroiden ist ebenfalls möglich, jedoch wird dadurch die Inzidenz der BPD nicht gesenkt und auch die Dauer eines supplementären Sauerstoffbedarfs nicht beeinflusst. Es werden aber weniger systemische Kortikosteroidgaben notwendig [152-154].

Leider zieht eine Kortikosteroidtherapie auch das Risiko einiger schwerwiegender langfristiger neurologischer Nebenwirkungen mit sich, insbesondere Zerebralparesen und Entwicklungsverzögerungen. Auch eine steroidinduzierte Kardiomyopathie und Wachstumsverzögerungen können auftreten. Eine postnatale Steroidgabe ist unter anderem auch mit ADHS (Aufmerksamkeitsdefizit-/ Hyperaktivitätsstörung) assoziiert [151, 155-157]. Diese Effekte treten hauptsächlich bei der Verwendung von Dexamethason auf. Hydrocortison ist zwar komplikationsärmer, aber außerhalb von Studien derzeit nicht empfohlen, da es nur zu einer geringen klinischen Verbesserung führt und die Datenlage noch unzureichend ist [158, 159]. Eine Steroidtherapie bei Kindern mit BPD ist nur bei erfolgloser anderweitiger Therapie angeraten, insbesondere wenn sie längere Zeit nicht ohne mechanische Beatmung auskommen. Die Indikation sollte stets streng gestellt werden [146].

Derzeit sind weitere Therapien unter anderem mit Antioxidanzien oder antiinflammatorische Strategien in Erprobung. Mit  $\alpha$ -Proteinase-Inhibitor kann

womöglich eine Reduktion der Protolyse erreicht werden. CC10 (Clara Cell 10kD Protein) soll zu einer Minderung der Neutrophilenzahl in der Lunge führen und so die Entzündungsreaktion eindämmen. Bisher sind die Daten jedoch noch nicht ausreichend für eine reguläre Therapie der bronchopulmonalen Dysplasie [133].

## 2 ZIELSETZUNG

Eines der häufigsten Krankheitsbilder von extremen Frühgeborenen ist die bronchopulmonale Dysplasie aufgrund der Unreife ihrer Lungen bei Geburt. Bisher werden Kortikosteroide, Surfactant, Vitamin A und Coffein effektiv in der Prävention und Therapie der chronischen Lungenerkrankung eingesetzt. Zentral in der Pathogenese ist die Entzündungsreaktion und neueste Studien deuten darauf hin, dass den mesenchymalen Stromazellen (MSC) eine wichtige Bedeutung innerhalb dieser zellulären Reaktion zukommt.

Deshalb werden folgende Ziele untersucht:

- a) Kann eines der vier genannten Medikamente, die bei Kindern mit BPD veränderten phänotypischen Eigenschaften der MSC positiv beeinflussen im Sinne „back to normal“.
- b) Welchen Einfluss haben die Medikamente auf die intrazelluläre Signaltransduktion.
- c) Kann ein Signalweg identifiziert werden, der für eine möglichst selektive und somit hoffentlich nebenwirkungsärmere Therapie moduliert werden könnte.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 MATERIAL

#### 3.1.1 CHEMIKALIEN UND GEBRAUCHSFERTIGE LÖSUNGEN

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe
Acrylamidlösung, 30%	Carl Roth, Karlsruhe
Albumin Fraktion V	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bromphenolblau	BioRad, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe
DMEM, Zellkulturmedium	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
FACS Lysepuffer	BD Bioscience, Heidelberg
Formaldehyd 4%	Merck, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FCS, fetal calf serum)	Biochrom Ag, Berlin
Gel-Transfer-Puffer	Klinikum Großhadern, München
Gentamicin	Ratiopharm, Ulm
Glutamin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Hepes	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe
Luminol	Carl Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Carl Roth, Karlsruhe

Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natronlauge	Carl Roth, Karlsruhe
PageRuler, Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Para-Hydroxycoumarinsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Penicillin / Streptomycinlösung	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Phosphorsäure, p.a.	Merck, Darmstadt
PhosSTOP	Roche, Mannheim
2-Propanol, p.a.	Merck, Darmstadt
Propidiumiodid	Carl Roth, Karlsruhe
Proteinase Inhibitor-Cocktail Set I	Calbiochem, Darmstadt
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin-EDTA-Lösung 0,05%	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Tween-20, Sigma-Aldrich Ultra	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Vectashield (mounting medium)	Vector Laboratories, Burlingane, CA
Wasserstoffperoxid 30%	Carl Roth, Karlsruhe

### 3.1.2 PUFFER UND ANDERE LÖSUNGEN

<i>Kulturmedium (Standardmedium)</i>	DMEM Zellkulturmedium (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) versetzt mit 20% fetalem Kälberserum (FCS), 1% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin, 0,25% Gentamycin
<i>PBS</i>	1,37M NaCl, 27mM KCL, 81mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O, 1,8mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,3)
<i>TBS</i>	20mM Tris, 137mM NaCl, in H <sub>2</sub> O (pH 7,6)
<i>TBST</i>	0,1% Tween-20 in TBS
<i>SDS-Lysepuffer</i>	42,3mM Tris-HCl (pH 6,8), 2% SDS, 9% Glycerol, 4,5% 2-Mercapto-Ethanol, 0,05% Bromphenolblau
<i>Zytosolischer Lysepuffer</i>	10mM HEPES, 1mM KCl, 1,5mM MgCl <sub>2</sub> , 0,5% Triton-X 100 in H <sub>2</sub> O (pH 7,0)

<i>Sammelgel (5%)</i>	5% Acrylamidlösung (Carl Roth, Karlsruhe), 12,5% Sammelgelpuffer, 0,2% SDS, 0,1% APS, 0,1% TEMED, in H <sub>2</sub> O <i>Sammelgelpuffer:</i> 0,5M Tris, Phosphorsäure in H <sub>2</sub> O (pH 6,8)
<i>Trenngel (6/12%)</i>	6/12% Acrylamidlösung (Carl Roth, Karlsruhe), 25% Trenngelpuffer, 0,2% SDS, 0,1% APS, 0,1% TEMED, in H <sub>2</sub> O <i>Trenngelpuffer:</i> 3M Tris, Salzsäure in H <sub>2</sub> O (pH 8,8)
<i>Laufpuffer</i>	25mM Tris, 250mM Glycin, 0,5% SDS in H <sub>2</sub> O
<i>ECL-Reagenz</i>	Lösung A: 0,1M Tris/HCl (pH 8,5), 2,5mM Luminol, 0,4mM Coumarinsäure in H <sub>2</sub> O Lösung B: 0,1M Tris/HCl (pH 8,5), 0,02% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in H <sub>2</sub> O
<i>Nicoletti-Puffer</i>	0,1% Triton-X 100, 0,1% Na-Citrat in H <sub>2</sub> O
<i>FACS-Puffer</i>	2% FCS, 10mM HEPES Puffer, 0,02% Na-Azid, 1g/l Glucose, 1mM EDTA, in PBS

### 3.1.3 STIMULANTIEN UND INHIBITOREN

Dexamethason / Dexamethason® (4mg/1ml)	Ratiopharm, Ulm
Prednisolon / Solu-Decortin® (10mg/1ml)	Merck, Darmstadt
Hydrocortison 100-Rotexmedica (100mg/2ml Aqua)	Rotexmedica GmbH, Trittau
Betamethason / Celestan® Depot (2,7mg/ml)	Essex Pharma, München
Vitamin A / Vitadral®-Tropfen (30,2mg/ml) (1mg entspricht 3.300 I.E.)	Steiner & Co, Berlin
Surfactant / Curosurf® (120mg / 1,5ml)	Chiesi GmbH, Hamburg
Coffein 1% Lösung	Apotheke Klinikum Universität München

3.1.4 ANTIKÖRPER FÜR IMMUNDETEKTION

**Tabelle 3.1-1: Eingesetzte Antikörper in Westernblot und Immunfluoreszenz**

Protein	Verdünnung	Lösungsmittel	Host	Hersteller	Katalognr.	MW/kDa
Anti- $\alpha$ -Actin	1:1000	T	mouse	Calbiochem	113200	42
Anti- $\beta$ Tubulin	1:1000	M	rabbit	Santa Cruz Biotechnology	sc-9104	50
Anti-Collagen Type I	1:1000	M	rabbit	Rockland	600-401-103-0.1	139
Anti-Desmin	1:1000	T	mouse	Santa Cruz Biotechnology	sc-23879	53
Anti-GAPDH	1:10000	T	mouse	Calbiochem	CB1001	37
Anti-Glucocorticoid Receptor $\alpha$	1:1000	T	mouse	BD Biosciences	611226	94
Anti-Histon H1	1:1000	T	rabbit	Santa Cruz Biotechnology	sc-10806	32
Anti-IkBa	1:1000	T	rabbit	Santa Cruz Biotechnology	sc-371	40
Anti-Lamin A/C	1:1000	T	goat	Santa Cruz Biotechnology	sc-6215	65/70
Anti-Myosin Smooth Muscle	IgG, 1:1000	M	rabbit	Biomedical Technologies	BT-562	220
Anti-NfkB p65	1:1000	M	rabbit	Santa Cruz Biotechnology	sc-372	65
Anti-PDGFR- $\alpha$	1:1000	T	rabbit	Santa Cruz	sc-338	170
Anti-Phospho-(Ser/Thr) Akt Substrate	1:1000	M	rabbit	Cell Signaling Technology	9611	60
Anti-Phospho-Glucocorticoid Receptor	1:1000	M	rabbit	Cell Signaling Technology	4161	95
Anti-Phospho-IkBa	1:1000	M	rabbit	Cell Signaling Technology	2859	40
Anti-Phospho-MEK1/2	1:1000	M	rabbit	Cell Signaling Technology	9121	45
Anti-Phospho-p38 MAP Kinase	1:1000	M	rabbit	Cell Signaling Technology	9211	43
Anti-Phospho-p44/42 MAPK	1:1000	M	rabbit	Cell Signaling Technology	9101	42/44
Anti-Phospho-SAPK/JNK	1:1000	T	rabbit	Cell Signaling Technology	9251	46/54
Anti-Phospho-Smad2	1:1000	M	rabbit	Cell Signaling Technology	3108	60
Anti-Phospho-Smad3	1:1000	M	rabbit	Merck Millipore	04-1042	52
Anti-Smad2/3	1:1000	T	rabbit	Cell Signaling Technology	3102	60/52
Anti-Smad3	1:1000	T	rabbit	Merck Millipore	06-920	50

## Material und Methoden

Anti-Smad4	1:1000	T	mouse	Santa Cruz	sc-7966	61
Anti-Smad6	1:1000	T	mouse	Santa Cruz	sc-25321	52
Anti-Smad7	1:1000	T	mouse	Santa Cruz	sc-365846	46
Anti-Vimentin	1:1000	T	mouse	Santa Cruz	sc-32322	57

T: TBST, 1‰ Natriumacid, M: TBST, 5% Milchpulver, 1‰ Natriumacid

**Tabelle 3.1-2: Eingesetzte Sekundärantikörper für Westernblot oder Immunfluoreszenz**

Antikörper	Verdünnung	Methode	Hersteller	Katalognr.
Anti-rabbit IgG, HRP-linked	1:5000	Westernblot	Cell Signaling Technology	7074
Anti-mouse IgG, HRP linked	1:5000	Westernblot	Cell Signaling Technology	7076
Alexa Flour 488 goat Anti-mouse IgG	1:1000	Immunfluoreszenz	Invitrogen Corporation	A11029
Alexa Flour 555 goat anti-rabbit IgG	1:1000	Immunfluoreszenz	Invitrogen Corporation	A21429

Die Sekundärantikörper für Westernblot wurden in 5% Milch in TBST gelöst.

### 3.1.5 ANTIKÖRPER ZUR OBERFLÄCHENMARKERFÄRBUNG

**Tabelle 3.1-3: Antikörper zur Oberflächenmarkerfärbung**

Antigen	Fluorochrom	Hersteller	Katalognr.
CD11b (Mac-1)	PE	Caltag Laboratories	CD11b044
CD13	FITC	Caltag Laboratories	MHCD1301
CD14	APC-Alexa Fluor 750	Caltag Laboratories	MHCD1427
CD16	Alexa Fluor 700	Caltag Laboratories	MHCD1629
CD34	Pe-Cy5.5	Invitrogen	CD34-581-18
CD45	APC-Alexa Fluor 750	Caltag Laboratories	MHCD4527
CD73	PE	BD Biosciences	550257
CD90	APC	BD Biosciences	559869
CD105	PE	Caltag Laboratories	MHCD10504
CD184 (CXCR4)	PE	BD Biosciences	555974

### 3.1.6 KOMMERZIELLE REAGENZIENSÄTZE

Anti-Mouse Ig,k/Negative Control (FBS) Compensation Particles Set	BD Pharmingen, Heidelberg
FITC Mouse Anti-Human Cyclin D1 Antibody Set	BD Pharmingen, Heidelberg
BrdU-kit for Flow Cytometry	Sparta-Labs/ Biocarta

### 3.1.7 LABORGERÄTE UND SOFTWARE

Cellscreen	Roche Innovatis AG, Bielefeld
Inversmikroskop Olympus IX50	Olympus, Hamburg
xCELLigence System	Roche, Mannheim
RTCA Software, Version 1.2.1	ACEA Biosciences Inc., San Diego USA
Gelelektrophorese-Apparatur Protean3	Mini- BioRad, München
EasyPhor Wet Blot System	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Stromgeber Power Supply Basic	Bio-Rad, München
Optimax X-Ray Film Processor	PROTEC GmbH, Oberstenfeld
AIDA Image Analyzer Software, Version 4.06.116	Raytest, Straubenhardt
Durchflusszytometer LSR II	BD Bioscience, Heidelberg
FlowJo Software, Version 8.8.7	Tree Star Inc., Ashland USA
Fluoreszenzmikroskop Axio Imager M.2 AxioVision Rel. 4.8 Software	Carl Zeiss, Jena
Microsoft Office 2013, Version 15.0	Microsoft Corporation, Redmond, USA
GraphPad Prism, Version 5.03	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA

### 3.1.8 VERBRAUCHSMATERIALIEN

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Combitips (1, 2.5, 5, 10ml)	Eppendorf, Hamburg
CultureSlides, 8 Well	BD Bioscience, Heidelberg
Deckgläser 24x50mm	Marienfeld, Lauda-Königshofen

## Material und Methoden

---

Gel-Blotting-Papier (Whatman)	GE Healthcare, München
Immobilon-P Transfermembran (PVDF)	Millipore, Schwalbach
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Medical X-Ray Screen Film blue sensitive	CEA GmbH, Hamburg
Mikrotiterplatten (24, 12, 6 Vertiefungen)	BD Bioscience, Heidelberg
Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen)	Nunc, Wiesbaden
Pasteurpipetten, Glas	Brand, Wertheim
Pipetten (5, 10, 25, 50ml)	BD Bioscience, Heidelberg
Pipettenspitzen mit Filter, 1ml	Star Lab, Hamburg
PP-Röhrchen, 1,3ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Reaktionsgefäße (1,5, 2ml)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Zellkulturflaschen Cellstar (25, 75cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen, 15 und 50ml	BD Bioscience, Heidelberg

### 3.2 METHODEN

#### 3.2.1 GEWINNUNG UND AUFBEWAHRUNG DER MESENCHYMALEN STROMAZELLEN

Die für die Experimente verwendeten MSC wurden aus dem Trachealaspirat von extrem unreifen und innerhalb der ersten beiden Lebenswochen invasiv beatmeten Frühgeborenen gewonnen. Dabei wurde nur solches verwendet, das bei der Absaugroutine anfiel und sonst verworfen worden wäre. Diesbezüglich wurde von der Ethikkommission ethisch-rechtliche Unbedenklichkeit zuerkannt. Die Eltern der Frühgeborenen mussten ihr Einverständnis geben und wurden über die Studie aufgeklärt. Es wurde ihnen zugesichert, dass keine Maßnahmen angewandt werden, die nicht ohnehin notwendig gewesen wären. Der Datenschutz ist stets gewährleistet.

Eingeschlossen wurden die Kinder, die auch für die PROTECT-Studie (Progress in the molecular understanding of evolution of chronic lung disease in preterm infants trail) zugelassen wurden. Dabei handelt es sich um Frühgeborene, die bis zur Schwangerschaftswoche 29+0 geboren und in der Neonatologie der Kinderklinik am Perinatalzentrum des Klinikums Großhadern betreut wurden [47, 160]. Das Trachealsekret wurde auf pathologische Veränderungen bezüglich der Inflammationszellen sowie verschiedener Zytokine hin untersucht. Wegen des hohen Einflusses einer Wachstumsrestriktion oder des Traumas und der Inflammation eines operativen Eingriffs wurden Kinder deren Gewicht unter der 10. Perzentile lag und/oder die operiert werden mussten (abgesehen von einer Ductus-Ligatur) wiederum ausgeschlossen.

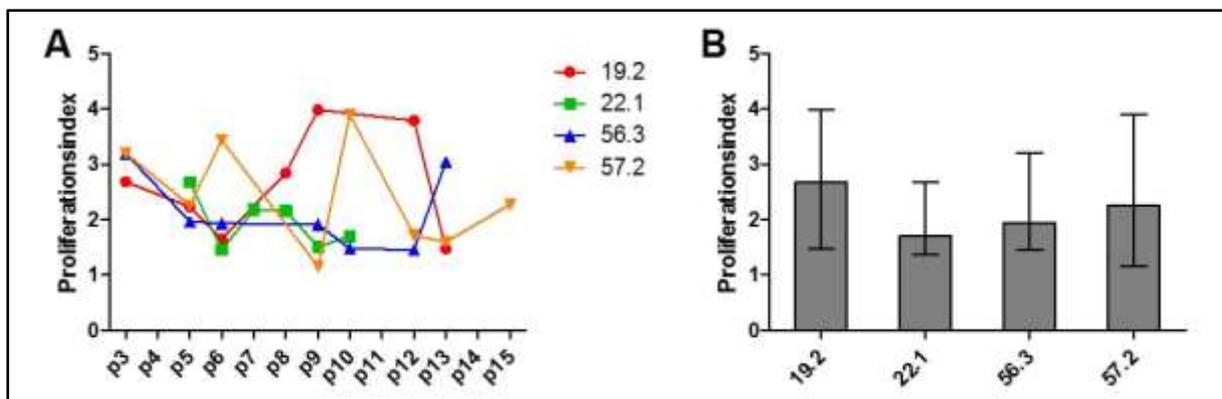
Das Trachealaspirat wurde während der regelmäßigen klinischen Routine über den Trachealtubus unter sterilen Bedingungen abgenommen und in Hygieneröhrchen aufgefangen. Es wurde ab dem ersten Lebenstag alle zwei Tage gewonnen und in Kultur genommen. Für die Forschungsexperimente wurden die Kulturen vom ersten Anwachsen verwendet, also Tag 1-3 der Präsenz der MSC im Aspirat.

Für die Charakterisierung der Zellen als Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften wurde ein erweitertes Protokoll gegenüber der erstbeschreibenden Arbeitsgruppe Hershenson et al. verwendet [112]. Mittels Durchflusszytometrie wurden die Zellen als MSC mit Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD13 (+), CD73 (+), CD90 (+), CD105 (+), CD14 (-), CD16 (-), CD34 (-), CD45 (-), CXCR4 (-) charakterisiert und sortiert. Der Reinheitsgrad der Zellkulturen ab Passage 2 betrug >98%. Dies konnte in

den Vorarbeiten der DoktorandInnen Tobias Reicherzer und Susanne Häffner der Arbeitsgruppe nachgewiesen werden [160].

Nun wurden die nicht immortalisierten Zellen zunächst 96 Wellplatten mit 100  $\mu$ l Medium bis zur Konfluenz angezogen und anschließend in Kulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 25cm<sup>2</sup> mit 4ml Medium (siehe 3.1.2 Standardmedium) überführt. Diese Zellen entsprechen Passage 1 (p1). Die Zellen wurden in exponentiellem Wachstum gehalten und vor Erreichen der kompletten Wellbedeckung wurden sie wie unter 3.2.2 beschrieben geteilt und die Passagezahl (p) um den Wert 1 erhöht.

Ein Teil der MSC wurde für spätere Experimente in möglichst früher Passage (in der Regel p2-p5) tiefgefroren. Da wieder aufgetaute Zellen in der Regel etwas langsamer wuchsen, wurden für die Wachstumsanalysen (Kapitel 0) stets primäre Kulturen der MSC verwendet. Alle weiteren Versuche wurden sowohl mit neuen als auch mit aufgetauten Zelllinien durchgeführt. Die Zelllinien wurden über so viele Passagen verwendet, wie sie in Kultur ein konstantes Proliferationsverhalten innerhalb der Schwankungsbreite zeigten und in regelmäßigen Abständen geteilt werden mussten (Kapitel 3.2.2). Die höchste verwendete Passage betrug p17, in der Literatur wurden über 20 mögliche Passagen ohne Zeichen einer Zellalterung beschrieben [112].



**Abbildung 3.2-1: Baseline Wachstumsgeschwindigkeit verschiedener Zelllinien.** In Diagramm A sind an der X-Achse die einzelnen Passagen (p) aufgetragen, an der Y-Achse der mittels Cellscreen in der Kontrollkultur gemessene Proliferationsindex 72 Stunden nach dem Aussähen. Diagramm B zeigt Mittelwert und Range des Proliferationsindex der einzeln untersuchten Zelllinien während der Experimente.

Abbildung 3.2-1 zeigt in welchem Bereich sich die Wachstumsgeschwindigkeit der einzelnen Zelllinien bewegt. Trotz guten Wachstums in der Kulturflasche mit regelmäßigen Zeitabständen zwischen dem Splitten, schwankt der Proliferationsindex

ein wenig bei den einzelnen Versuchen. Die Baseline-Wachstumsgeschwindigkeit ist aber ähnlich und reicht für die Experimente aus.

Zum Tiefrieren wurden zunächst das Medium abpipettiert und die frisch angezüchteten Zellen mit vorgewärmtem Trypsin/EDTA gelöst. In ein 15ml Falcon gegeben, wurde das Trypsin mit etwas zusätzlichem Medium inaktiviert. Nun wurde 5 Minuten bei 1000rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 750µl FCS aufgenommen und mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) in sterilen 1ml Kryoröhrchen zunächst bei -80°C tiefgefroren. Nach ein bis zwei Tagen wurden sie im Gefrieröhrchen in flüssigen Stickstoff mit einer Temperatur von -196°C überführt.

### 3.2.2 ZELLKULTUR

Die isolierten MSC wurden in Kulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75cm<sup>2</sup> mit 12ml Standardmedium im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C aufbewahrt.

Wurden tiefgefrorene Zellen verwendet, wurden sie zunächst in einem vorgewärmten Wasserbad bei 37°C noch im Kryoröhrchen aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, der DMSO-Überstand abgekippt und die Zellen direkt in Kulturflaschen mit Standardmedium überführt.

Alle 3-4 Tage wurden die Zellen je nach Dichte im Verhältnis 1:3 bis 1:5 gesplittet. Dazu wurde zunächst das Medium abpipettiert und anschließend mit PBS gewaschen. Dann wurden die adhärennten Zellen mit vorgewärmtem Trypsin/EDTA von den Kulturflaschen gelöst, geteilt und wieder in ebenfalls warmem Medium aufgenommen.

Alle Arbeiten mit lebenden MSC wurden steril unter der gentechnischen Sicherheitsstufe S1/BIO I durchgeführt.

3.2.3 PATIENTENDATEN DER ZU DEN EINZELNEN ZELLINIEN GEHÖRENDE FRÜHGEBORENEN

In der folgenden Tabelle sind die wichtigsten klinischen Daten der zu den einzelnen Zelllinien gehörenden Patienten dargestellt. Die erste Zahl der Zelllinien definiert den Patienten. Die zweite Nummer beziffert jeweils die Kultur des Patienten. Meist gab es 2-4 parallel am gleichen Tag etablierte Kulturen, jedoch stets innerhalb von 3 Tagen nach erster Präsenz. 1 heißt erste Kultur.

Tabelle 3.2-1: Patientendaten der zu den Zelllinien gehörenden Probanden.

MSC Kultur	16.1	19.2	22.1	55.1	56.3	57.2	58.1	59.2	60.1	61.2	62.1	63.1	64.1	66.1	67.1	68.3	69.1	70.4
SSW	23+5	25+1	25+1	24+1	25+3	27+3	26+5	25+0	25+5	24+5	26+0	23+0	25+5	26+4	23+6	24+0	24+1	23+4
Sex	m	m	m	w	w	m	m	w	w	m	w	w	w	w	w	m	w	m
GG (g)	560	680	690	600	490	820	640	700	520	410	890	470	970	560	570	540	510	510
GG (%)	39	23	24	25	3	17	8	26	5	<3	45	14	93	3	42	16	11	22
KG (%)	47	60	31	10	x	6	3	5	<3	3	7	70	46	<3.	4.	6	15	6
SSW	39+2	38+1	42+2	35+1	x	39+3	43+6	38+2	40+0	45+5	35+3	42+6	38+1	38+4	36+5	40+4	40+4	38+3
CRIB	10	7	8	7	8	7	8	7	7	7	7	10	2	8	8	8	7	8
SNAP II	27	0	5	14	48	36	14	33	14	12	16	35	14	5	9	17	17	9
SNAPPE II	44	17	22	49	95	46	31	50	31	59	26	70	24	34	26	34	34	26
RDS (°)	2	2	2	2	3-4	4	3-4	1	2	3	4	1	1	1	3	2	4	3
BPD (°)	1	1	3	1	tot	2	2	2	1	3	2	3	1	1	1	2	1	2
Krankenhausaufenthalt (Tage)	110	95	121	80	18	85	111	94	101	148	183	139	88	86	92	158	117	107
Invasive Beatmung (Tage)	39	16	45	31	18	31	8	27	32	39	35	39	7	18	23	41	25	32

## Material und Methoden

<b>MSC Kultur</b>	<b>16.1</b>	<b>19.2</b>	<b>22.1</b>	<b>55.1</b>	<b>56.3</b>	<b>57.2</b>	<b>58.1</b>	<b>59.2</b>	<b>60.1</b>	<b>61.2</b>	<b>62.1</b>	<b>63.1</b>	<b>64.1</b>	<b>66.1</b>	<b>67.1</b>	<b>68.3</b>	<b>69.1</b>	<b>70.4</b>	
allg. Atemunterstützung (Tage)	82	65		74	tot		90	80	70	114				63	73				
PDA/ PGSH/ OP	ja ja ja	ja ja ja	ja ja ja	ja ja ja	ja ja x	ja ja ja	ja ja x	ja ja x	ja ja ja	ja ja x	x x x	x x x	ja ja x	x x x	ja ja x	ja x ja	ja ja x	ja ja ja	
IVH (°)	x	x	2	x	3	x	x	x	1	x	1	x	2	x	2	x	2	2	
ROP (°)	2	3	2	2	x	x	3	3 (+)	3	3+	1	2+	1	1	2	2	2	x	
Neugeborenenkrämpfe	ja	x	ja	x	ja	x	x	ja	x	x	x	x	x	x	x	x	x	ja	
Leukozytenzahl >?	7,7	11,7	13,5	7,7	3,2*	9,7	5,8	12,7	11,6	4,8	14,8	24,9	33,9	8,1	42,0*	11,1	32,5	10,3	
CRP >1mg/dl	x	ja	ja	x	x	x	x	ja	x	x	x	x	ja	ja	x	ja	x	x	
IL-6 >150 pg/ml	x	x	x	ja	x	x	x	x	x	x	ja	x	ja	x	x	x	ja	x	
EOS	ja	ja	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	ja	x	x	ja	ja	x	
Ureapl./ Mycopl./ Chlamyd. (PCR)	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	+ - -	- - -	- - -	- - -	+ + -	+ - -
Secondary sepsis	x	x	x	ja	x	x	ja	x	x	ja	ja	x	x	ja	x	x	ja	ja	
Secondary pneumonia	ja	ja	ja	ja	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
AIS	ja	ja	x	ja	ja		ja	x	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	
Antenatale Steroide, h vor Geburt	<24h	<24h	<24h	<24h	>48h	>48h	<48h	<24h	>48h	>48h	>48h	>48h	>48h	<24h	<48h	<24h	<48h	>48h	<24h
MSC-Entnahme (LT)	3-17	8-12	13-22	3-28	17-19	8-10	7	?	9-20	15-16	34	?	?	5-13	13-22	13-22	4-17	13-17	
DM vor Entnahme	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	möglich	x	x	x	x	x	x	

## Material und Methoden

MSC Kultur	16.1	19.2	22.1	55.1	56.3	57.2	58.1	59.2	60.1	61.2	62.1	63.1	64.1	66.1	67.1	68.3	69.1	70.4
HC bei art. Hypot. vor Entnahme	ja	x	x	x	ja	x	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	x	x	ja	x	x
syst. Steroidgabe nach Entnahme	x	x	ja	ja	x	ja	x	ja	ja	ja	x	ja	x	x	x	x	x	ja
Sonstiges	ASD II			ASDII	Intraparenchymale Blutung, PVL, Hydrozerehalus	PFO, Hypospadie			ASD II	ASD II	Hydrozephalus	Hämangiome, PFO	Hydrozephalus	ASD II	Hydrozephalus, PDA, PFO	Pneumothorax		ASD II, Septum pellucidum Agenesie
kein Kind hatte: pulmonale Hämorrhagie, postnatale Asphyxie, NEC, pathologisches Neugeborenencreening																		

SSW: Schwangerschaftswoche; m: männlich; w: weiblich; GG: Geburtsgewicht; KG: Körpergewicht; CRIB-Score: clinical risk index for babies; SNAP/ SNAPPE II-Score: Score for Neonatal Acute Physiology with Perinatal Extension II; RDS/ANS: respiratory distress syndrome / Atemnotsyndrom; BPD: Bronchopulmonale Dysplasie; PDA: Persistierender Duktus arteriosus; PGSH: Prostaglandinsynthesehemmer; OP: Operation (Duktusligatur); IVH: Intraventrikuläre Hämorrhagie; ROP: Retinopathy of prematurity / Frühgeborenenretinopathie; EOS: Early onset Sepsis; AIS: Amnioninfektionssyndrom; MSC: mesenchymale Stromazellen; LT: Lebenstag; DM: Dexamethason; HC: Hydrocortison; ASD: Atriumseptumdefekt/Vorhofseptumdefekt; PVL: Periventrikuläre Leukomalazie; PFO: persistierendes Foramen ovale; NEC: nekrotisierende Enterocolitis

### 3.2.4 KONZENTRATION DER STIMULANZIEN IN DER KLINIK UND IM EXPERIMENT

Die Konzentrationen der Stimulanzen wurden so gewählt, dass sie den therapeutischen Bedingungen in Neugeborenen bzw. Frühgeborenen möglichst entsprechen.

Pränatal werden insbesondere Dexamethason und Betamethason zur Lungenreifeinduktion eingesetzt. Postnatal wird bei arterieller Hypotonie zur Kreislaufstabilisation Hydrocortison verwendet. Können die Frühgeborenen nicht vom Beatmungsgerät entwöhnt werden oder sind allgemein schwer zu beatmen, kommt sowohl Dexamethason als auch Hydrocortison zum Einsatz [161]. Die in der Klinik angewandten Dosierungen sind in Tabelle 3.2-2 aufgeführt.

Leider wurden bisher kaum die Blutspiegel der einzelnen Steroide bestimmt. In der Studie von Petersen, 2003 [162] wurde lediglich eine Plasmakonzentration von Prednisolon bei Kindern im Bereich von  $10^{-6}$  mol/l bis  $10^{-8}$  mol/l ermittelt.

**Tabelle 3.2-2: Dosierung und Plasmakonzentration verwendeter Steroide**

<b>Kortikosteroid (molare Masse)</b>	<b>relative glukokortikoide Potenz</b>	<b>Dosierungen in der Neonatologie</b>	<b>geschätzte Plasmakonzentration*</b>
Hydrocortison (362,5 g/mol)	1	20mg/m <sup>2</sup> KO	$5,5 \cdot 10^{-6}$ mol/l
Prednisolon (360,4 g/mol)	4	0,25 - 2mg/kgKG	$6,9 \cdot 10^{-7}$ mol/l - $5,5 \cdot 10^{-6}$ mol/l
Betamethason (392,5 g/mol)	25	Pränatal: 2x 12mg	Mutter 60kg: $5,1 \cdot 10^{-10}$ mol/l
Dexamethason (392,5 g/mol)	30	0,1-0,3 mg/kgKG (früher -1mg/kgKG) FG <28 SSW: 0,05 mg/kgKG	$2,5 \cdot 10^{-7}$ mol/l ( $1,3 \cdot 10^{-7}$ mol/l)

\* Abschätzung mit den Formeln: Konzentration (c) = Stoffmenge (n) / Volumen (V), Stoffmenge (n) = Masse (m) / molare Masse (M); Als Volumen wurde bei einem Körpergewicht (KG) von 1 kg, 1 Liter gesetzt.

Surfactant wird zum einen therapeutisch zur Verbesserung der Beatmungssituation oder auch prophylaktisch beim Atemnotsyndrom eingesetzt. Die Dosierungen können zwischen 100mg/kgKG bis maximal 400mg/kgKG intratracheal pro Tag variieren [124]. Die Problematik, die sich zunächst stellt, ist, dass die Konzentrationen dieser Substanzen im Lungengewebe unbekannt sind. Surfactant wird intratracheal (i.t.) appliziert, damit es sich direkt auf der inneren Lungenoberfläche ausbreiten und somit

die Oberflächenspannung senken kann. Wieviel letztendlich davon resorbiert wird und Einfluss auf die MSC haben kann, wurde bisher noch nicht in Studien untersucht. Da Surfactant aufgrund seines hohen Lipidanteils schwer in Kulturmedium löslich ist, wurde es in warmem Medium vorverdünnt und anschließend direkt verrührt. Zudem wurde für die Experimente eine relativ hohe Dosierung verwendet, um sicher zu stellen, dass die MSC ausreichend Surfactant resorbieren. Für die folgenden Experimente wurde für die höchste Konzentration von 80µg/ml, der Surfactant im Medium auf 1% verdünnt. Alle weiteren Konzentrationen entsprechen einer Verdünnungsreihe jeweils um den Faktor 1:10.

Vitamin A ist wichtig für die Bildung und Differenzierung von Lungenepithel. Es wird intramuskulär appliziert, bei zunächst unbekannter Resorption. Für die Experimente wurde ähnlich verfahren wie bei Surfactant. Es wurde eine Verdünnungsreihe beginnend mit einer Konzentration von 3000IE/l  $\cong$  90µg/dl verwendet. Die weiteren Konzentrationen entsprechen auch hier einer Verdünnung um den Faktor 1:10. Ein nach den Experimenten veröffentlichtes Paper ermittelte eine mittlere Konzentration von Retinol im Blut von Frühgeborenen nach Surfactantsubstitution von 20µg/dl [163].

Coffein wird zur Therapie und Prophylaxe von Apnoen eingesetzt. Initial wird mit einer Dosis von 20mg/kgKG i.v. begonnen. Je nach klinischer Situation können täglich 5-10mg/kgKG i.v. Coffeinzitrat zur Erhaltungstherapie gegeben werden [126]. In einer Studie wurden daraufhin Blutspiegel der Frühgeborenen zwischen 3 und 23,8mg/l gemessen [164]. In den Experimenten wurden Konzentrationen von 10mg/l und 1mg/l verwendet.

**Tabelle 3.2-3: Dosierung und geschätzte Konzentration im interstitiellen Lungengewebe der verwendeten Therapeutika**

Medikament	Dosierung in der Neonatologie	geschätzte Konzentration im Lungengewebe
Surfactant	100-400mg/kgKG (intratracheal)	Keine Daten vorhanden.
Coffeinzitrat	Initial: 20mg/kgKG i.v. Erhaltung: 5-10mg/kgKG i.v.	3-24mg/l
Vitamin A (Retinol)	FG: 500µg/kgKG, 700-1600IE/kg	20µg/dl $\cong$ 6,7IE/l (10-40µg/dl $\cong$ 3,3-13,3IE/l)

In folgender Tabelle sind die im Experiment verwendeten Konzentrationen dargestellt. Es wurden zunächst mehrere Stockkonzentrationen hergestellt, um durch die Verdünnung im Medium die optimale Endkonzentration zu erreichen.

**Tabelle 3.2-4: Stimulanzen mit verwendeten Konzentrationen**

Stimulanz	verwendete Stockkonzentrationen → Endkonzentration im Well
Dexamethason	$10^{-2}$ M → $10^{-4}$ M, $10^{-4}$ M → $10^{-6}$ M, $10^{-6}$ M → $10^{-8}$ M
Prednisolon	$10^{-2}$ M → $10^{-4}$ M, $10^{-4}$ M → $10^{-6}$ M
Hydrocortison	$10^{-2}$ M → $10^{-4}$ M, $10^{-4}$ M → $10^{-6}$ M
Betamethason	$10^{-2}$ M → $10^{-4}$ M, $10^{-4}$ M → $10^{-6}$ M
Surfactant	8 mg/ml → 80 µg/ml
Vitamin A	5,5 µl/ml → 30000 I.E./l
Coffein	1 g/l → 10 mg/l

Die Stimulanzen wurden in PBS gelöst und bei Raumtemperatur verwendet.

### 3.2.5 UNTERSUCHUNG VON ZELLWACHSTUM UND MORPHOLOGIE

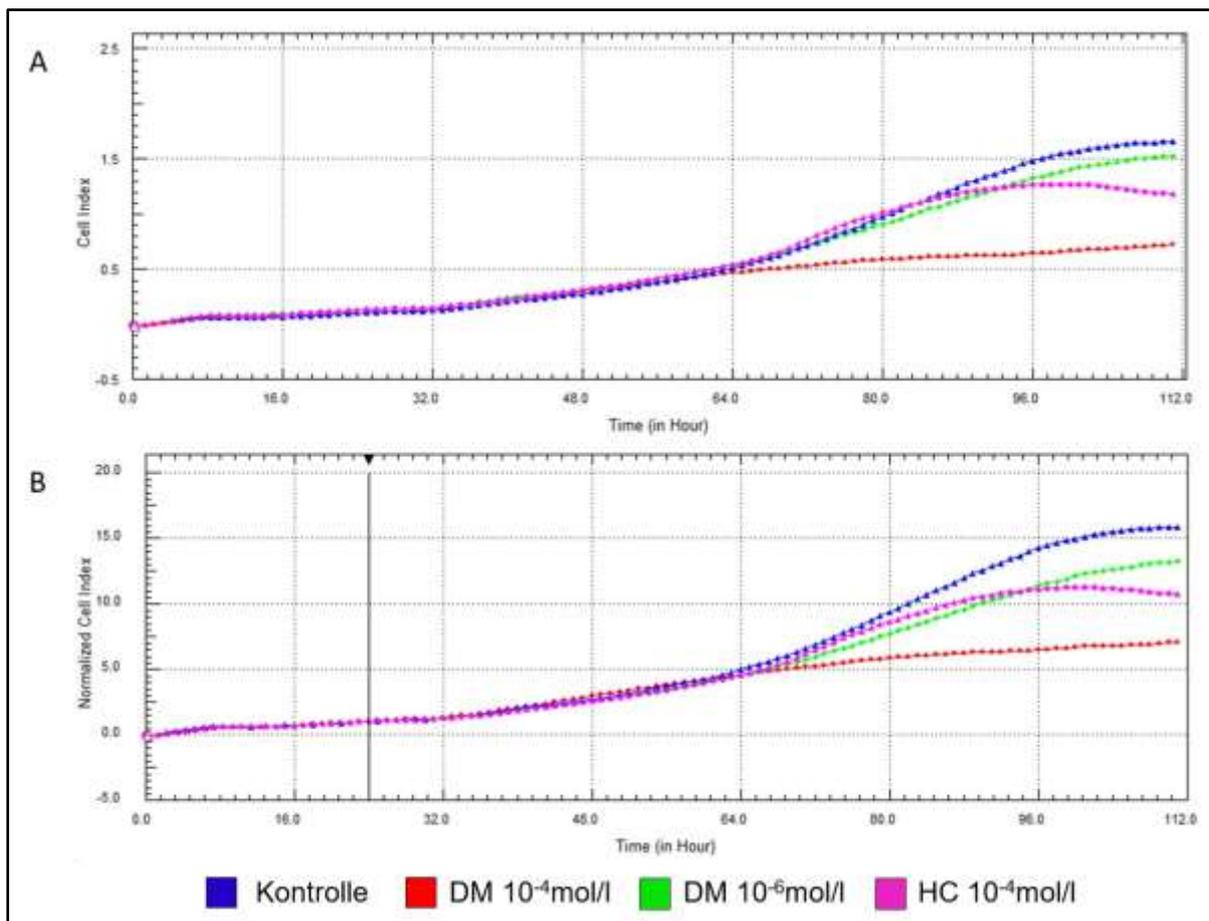
#### 3.2.5.1 Überprüfung der proliferativen Kapazität über kontinuierliche Messung der elektrischen Impedanz

Mit dem xCELLigence System (Roche) kann durch Ermittlung der elektrischen Impedanz in Echtzeit über einen längeren Zeitraum das Wachstumsverhalten von Zellen bestimmt werden. Es besteht aus E-Plates, das sind Mikrotiterplatten an deren Boden sich goldbeschichtete Mikroelektroden befinden. Um für die Zellen optimale Bedingungen zu schaffen, steht die Messstation im Inkubator. Die kontinuierlich oder in selbstbestimmten Zeitintervallen gemessenen Werte können mithilfe der zugehörigen RTCA Software 1.2.1 (siehe 3.1.7) analysiert werden. In diesem Fall wurde im Stundentakt automatisch der Zellindex ermittelt, der das Wachstumsverhalten der Zellen widerspiegelt.

Zu Beginn wurde in jedes der 16 Wells der E-Plates 100µl Medium mit 20%FCS gegeben, um die Background-Messung durchzuführen. Anschließend wurden 100µl einer Zellsuspension aus Standardmedium (mit 20%FCS) und Zellen in einer Konzentration von 20000 Zellen/ml zugegeben. Dazu wurden die MSC zuvor mit PBS gewaschen, in vorgewärmtem Trypsin/EDTA gelöst und mit ein paar ml erwärmtem Medium in ein 50ml Falcon überführt. Wie auch bei den folgenden Methoden wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer die aktuelle Konzentration bestimmt (Mittelwert der vier Quadranten x 10000/ml), so dass daraufhin mit Standardmedium auf die hier gewünschte Endkonzentration von 20000 Zellen/ml verdünnt werden konnte.

Um eine zu schnelle Austrocknung der Wells zu verhindern, wurden die Zwischenräume mit PBS gefüllt. Nach spätestens 24 Stunden sind die Zellen an den Wells der E-Plates und den Elektroden adhärirt. Nun wurde mit verschiedenen

Steroiden, Surfactant, Coffein oder Vitamin A wie in Tabelle 3.2-4 stimuliert, indem jeweils 2µl der Stocklösung pro Well zugegeben wurden. Mit Zeitintervallen von einer Stunde hat das xCELLigence System eine Datenreihe aufgenommen. Die Experimente liefen ab der Stimulation über einen Zeitraum von 48-72h. Zum besseren Vergleich wurden die Wachstumskurven mit Hilfe der Software auf einen geeigneten Startzeitpunkt, zu dem mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit alle Zellen adhärirt sind, normalisiert. Anschließend wurden die Werte manuell ausgelesen und mit Microsoft Excel analysiert.



**Abbildung 3.2-2: Auswertung einer xCELLigence-Messung mittels RTCA-Software.** Nach Ausschluss einzelner Wells aufgrund fehlerhafter Messungen, wurde der Zellindex der übrigen zu den einzelnen Versuchsgruppen gehörenden Wells gemittelt und in Abbildung A dargestellt. Abbildung B zeigt die Daten normalisiert. 24 Stunden nach dem Aussähen wurde mit den Messungen begonnen, da zu diesem Zeitpunkt alle Zellen auf den Elektroden im Well angewachsen waren. DM: Dexamethason ( $c=10^{-4}$  mol/l,  $c=10^{-6}$  mol/l), HC: Hydrocortison ( $c=10^{-4}$  mol/l)

### **3.2.5.2 Kontrolle des Zellwachstums mittels Cellscreen**

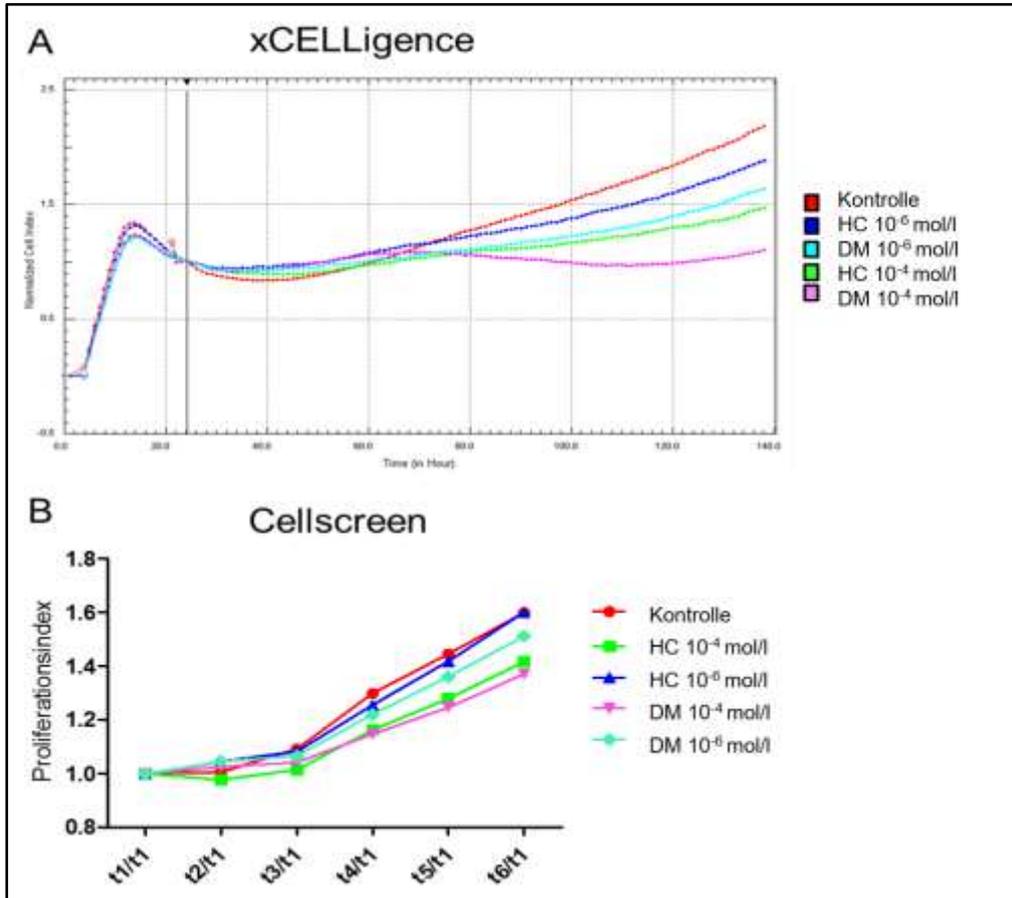
Mit dem Cellscreen System (Roche Innovatis AG) kann automatisch das Wachstumsverhalten von Zellen bestimmt werden. Es besteht aus einem inversen Autofokus-Phasenkontrast-Lichtmikroskop mit einem motorisierten Kreuztisch. Über die zugehörige Software kann nun eine eingespannte 96-Well-Mikrotiterplatte genau angesteuert werden, so dass immer exakt die gleichen Ausschnitte der Wellböden dokumentiert werden.

Die Aufnahme erfolgt über eine Digitalkamera, die mit dem Mikroskop verbunden ist. Pro Vertiefung wurden in der 96-well-Platte vier Aufnahmen unter Ausklammerung des Wellrandes wegen der Unebenheit der Platten gemacht, die anschließend in einer Datenbank gespeichert werden. Die Software erkennt die adhärennten Zellen und berechnet die prozentuale Flächenbedeckung dieser in den einzelnen Wells.

Während der Arbeit im Labor kam es zu einem technischen Defekt der Software bzw. der Datenbank des Cellscreen Gerätes, welcher ein weiteres Arbeiten mit dem System nicht mehr ermöglichte. Da der Support von Roche zu diesem Zeitpunkt geendet hatte, musste auf das xCELLigence System, ebenfalls von Roche gewechselt werden (siehe 3.2.5.1). Dabei wird das Zellwachstum statt über automatisierte Messung der Flächenbedeckung über die kontinuierliche Messung der elektrischen Impedanz analysiert. Die erzielten Ergebnisse waren vergleichbar und sind beispielhaft in Abbildung 3.2-3 dargestellt.

Für die Experimente wurden die MSC nach Abnahme des Mediums und Waschen mit PBS, mit vorgewärmtem Trypsin/EDTA aus den Kulturflaschen gelöst. Mittels einer Neubauer-Zählkammer wurde eine Suspension mit ebenfalls warmem Standardmedium (20% FCS) und einer Konzentration von 20000 Zellen/ml hergestellt. Davon wurden pro Vertiefung 100µl in eine 96-Well-Platte pipettiert. Bei allen Experimenten wurden für jeden Datensatz stets vier Wells gleichbehandelt und die Ergebnisse gemittelt. Die äußerste Reihe wurde mit 200µl PBS befüllt, da sie aufgrund verstärkter Verdunstungseffekte für die Versuche ausgeschlossen waren. Zwischen den Messungen wurden die Platten stets im Inkubator gelagert. Am nächsten Tag waren die Zellen adhäriert, und es wurde die erste Messung mittels Cellscreen durchgeführt (Zeitpunkt 0h). Dazu wurde das 4x-Objektiv im Modul für adhärennte Zellen (AC, adherent cell) ausgewählt. Direkt im Anschluss wurde mit verschiedenen Steroiden, Surfactant, Coffein und Vitamin A wie in Tabelle 3.2-4 stimuliert, indem

jeweils 1µl der Stocklösung pro Vertiefung zugegeben wurde. Alle 24 Stunden wurde die Flächenbedeckung über einen Zeitraum von 72 bis 96 Stunden gemessen.



**Abbildung 3.2-3: Qualitativer Vergleich eines xCELLigence- und eines Cellscreen-Experiments.** In Abbildung A wurde das Zellwachstum mittels xCELLigence-Messung bestimmt. 24 Stunden nach dem Aussähen wurden die Daten normalisiert. Zeitgleich wurde aus der gleichen Zellkultur (22.1p11) eine Analyse über die Cellscreen-Technik durchgeführt (B). DM: Dexamethason ( $c=10^{-4}$ mol/l,  $c=10^{-6}$ mol/l), HC: Hydrocortison ( $c=10^{-4}$ mol/l,  $c=10^{-6}$ mol/l).

Nach der letzten Messung wurden die Daten in Excel (Microsoft Corporation) importiert und analysiert. Dadurch, dass pro Well mehrere Aufnahmen gemacht wurden, konnten einzelne Bilder mit Luftblasen, anderen Verunreinigungen oder unscharfe Bilder ausgeschlossen werden. Anschließend wurden die Vierfachwerte gemittelt und der Proliferationsindex mit der Formel  $\frac{\text{Flächenbedeckung Zeitpunkt } t_x}{\text{Flächenbedeckung Zeitpunkt } t_0}$  berechnet. Dieser wurde dann in Relation zum Proliferationsindex der unstimulierten Kontrolle gesetzt.

### **3.2.5.3 Beurteilung des Zellwachstums und der Morphologie mittels Lichtmikroskopie**

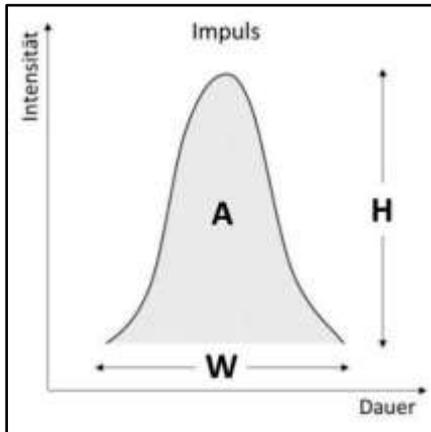
Das Medium wurde aus den Kulturflaschen abpipettiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit vorgewärmtem Trypsin/EDTA gelöst. Sie wurden in warmem Medium resuspendiert und zu einer Konzentration von 20000 Zellen/ml mit 100µl pro Well in 96-Well-Platten ausgesät und inkubiert. Nach 24 Stunden wurde mit verschiedenen Steroiden, Surfactant, Coffein oder Vitamin A wie in Tabelle 3.2-4 mit 1µl der Stocklösung stimuliert. Direkt im Anschluss und nach weiteren 24, 48 und 72 Stunden wurden unter dem Lichtmikroskop unter zehnfacher Vergrößerung das Wachstum und die Morphologie der MSC beurteilt. Zur Dokumentation wurde täglich mit einer Digitalkamera der mittigste Ausschnitt der Wells durch das Mikroskop fotografiert.

### **3.2.6 UNTERSUCHUNG VON ZELLYKLUS, PROLIFERATION UND APOPTOSE MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE**

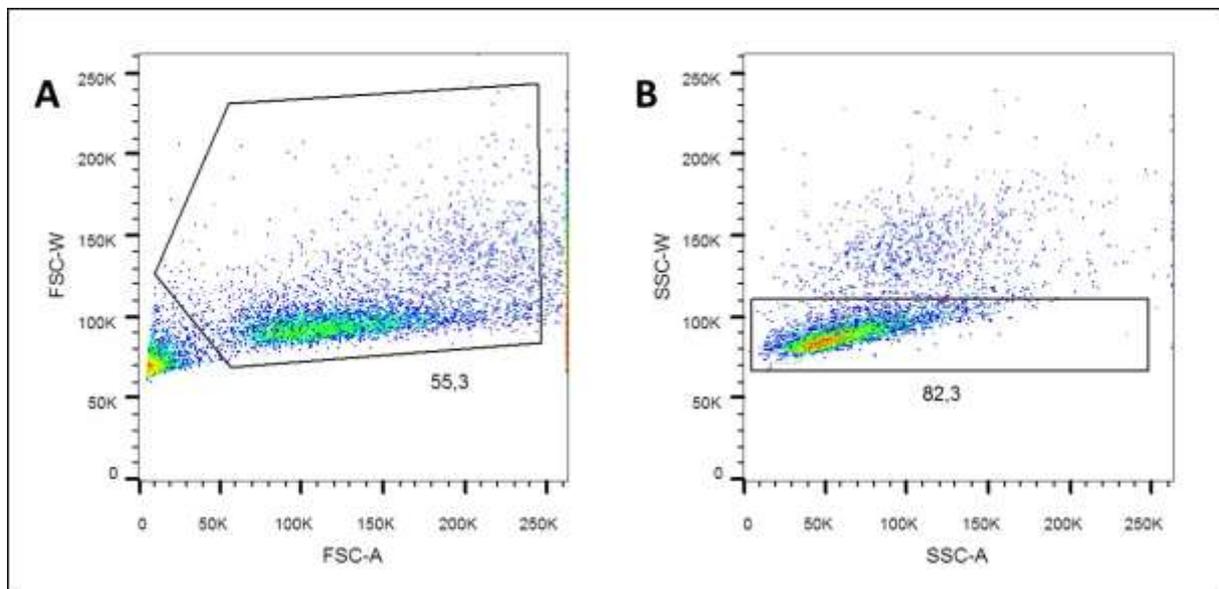
Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen durch Mikrokanäle geleitet, so dass sie einzeln einen Laserstrahl passieren. An dieser Stelle emittieren sie nun optische Signale in Form von Streulicht oder durch Fluoreszenz, die von ihrer Größe und Struktur abhängig sind. Es wird zum einen das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter) in Form von einzelnen Lichtimpulsen detektiert, welches durch Beugung des Laserstrahls entsteht und vom Zellvolumen abhängt. Zum anderen wird das Seitwärtsstreulicht (SSC = Side Scatter) gemessen, welches durch Lichtbrechung zustande kommt und mit der Granularität der Zelle und mit der Größe und Struktur des Zellkerns korreliert. Zudem können die Zellen mit verschiedenen Farbstoffen (siehe 3.2.6.1) oder durch mit Fluorochromen konjugierten Antikörpern (siehe 3.2.7) gefärbt werden, um so spezielle Eigenschaften der Zelle untersuchen zu können.

Der aufgezeichnete Lichtimpuls kann, wie in Abbildung 3.2-4 dargestellt, über seine Höhe (H), seine Breite (W) sowie über sein Integral (A) verglichen werden. Auf diese Weise kann zwischen einzelnen Zellen (engl. singles) oder zusammenheftenden Zellen (engl. doubles, clumps) unterschieden werden (siehe Abbildung 3.2-5). Für die Auswertungen aller folgenden Durchflusszytometrie-Experimente sind nur die Singles

relevant und werden, ausschließlich zur Bestimmung der Apoptoserate, wie in Abbildung 3.2-5 ermittelt.



**Abbildung 3.2-4: Schematische Darstellung eines vom Durchflusszytometer erfassten Lichtimpulses.** A: Fläche, engl. area, H: Höhe, engl. Height, W: Breite, engl. width.



**Abbildung 3.2-5: Auswertung einer Durchflusszytometrie-Analyse mittels FlowJo Software.** In Abbildung A befindet sich noch der komplette Datensatz. Zunächst wurden mit Hilfe des Vorwärtsstreuung (FSC) über das Zellvolumen alle ganzen, lebenden Zellen ausgewählt. Der ausgeschlossene Anteil enthält Schmutzpartikel aus dem Wasser sowie Zellschrott. In Abbildung B wurde aus der in A erhobenen Population, mit Hilfe des Seitwärtsstreuung (SSC) über die Granularität zwischen einzelstehenden Zellen (singles; innerhalb des Gates) und zusammenhängenden Zellen (doubles, clumps; oberhalb des Gates) differenziert. Angegeben wird der prozentuale Anteil der im Gate befindlichen Zellen.

### 3.2.6.1 Analyse des Zellzyklus mittels Propidiumiodid-Färbung

Propidiumiodid (PI) ist ein Farbstoff, der in die DNA interkaliert. Da in den verschiedenen Zellzyklusphasen die DNA-Menge variiert, kann in der Durchflusszytometrie anhand der Signalstärke von PI bestimmt werden, in welcher Phase sich diese Zelle befindet. Eine genaue Differenzierung zwischen G0- und G1-

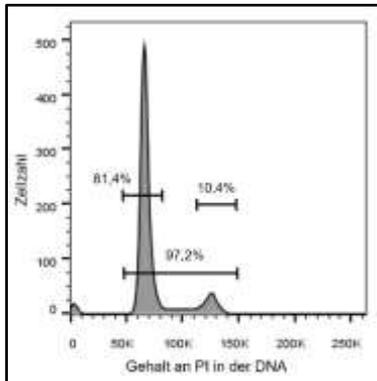
Phase bzw. zwischen G2- und M-Phase ist allerdings mit dieser Methode nicht möglich. Hierzu sind weitere Untersuchungen wie in Kapitel 3.2.6.2 notwendig.

Für die Versuche wurde wieder das Medium aus der Kulturflasche abpipettiert und die Zellen mit PBS gewaschen. Die MSC wurden mit vorgewärmtem Trypsin/EDTA gelöst und es wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer eine Zellsuspension mit einer Konzentration von 55000 Zellen/ml in warmem Standardmedium (20% FCS) erstellt. Pro Vertiefung einer 6-Well-Platte wurden 2ml dieser Suspension gegeben. Auf diese Weise entsprach die Wellbedeckung der, der anderen Versuche mit 96-Well-Platten. Die Platten wurden im Inkubator gelagert. Über Nacht waren die Zellen adhärirt, so dass nun nach 24 Stunden ein Teil der Vertiefungen mit verschiedenen Steroiden, Surfactant, Coffein oder Vitamin A wie in Tabelle 3.2-4 mit 20µl der Stocklösung stimuliert werden konnte. Nach 48 und 72 Stunden wurden ebenfalls bisher noch unbehandelte Zellen stimuliert, so dass es 96 Stunden nach dem Aussäen Proben gab, die seit 24, 48 oder 72 Stunden mit den Medikamenten versetzt worden sind. Für die unbehandelten Kontrollen wurde jeweils zu den Stimulationszeitpunkten in einer Vertiefung wie oben beschrieben neu ausgesät.

96 Stunden nach dem Aussäen wurde nun das Medium aus den Wellplatten in Eppendorf Reaktionsgefäße (Eppis) gegeben. Die noch adhärierenden MSC wurden mit vorgewärmtem Trypsin/EDTA gelöst und anschließend ebenfalls zu dem Medium in die Eppis gegeben. Daraufhin wurden die Zellen bei 500g für drei Minuten abzentrifugiert und anschließend einmal mit 1ml eiskaltem PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 300µl PBS resuspendiert und 700µl eiskaltes Ethanol (100%) auf dem Vortexer zugegeben. Die Zellen wurden für eine Stunde bei -20°C fixiert. Nach fünf Minuten zentrifugieren bei 2000g wurden die Zellen einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert. Daraufhin wurde das Pellet in 500µl PBS mit 0,25% Triton X-100 wiederaufgenommen und 15 Minuten für die Permeabilisierung auf Eis gestellt. Das Triton X-100 macht die Zellmembran für PI durchlässig, so dass der Farbstoff auch in lebende bzw. nicht apoptotische Zellen eindringen kann. Anschließend wurde die Suspension wieder bei 2000g abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und noch einmal zentrifugiert. Danach wurden die Zellen 20 Minuten in 50µl PBS mit 1% BSA bei Raumtemperatur inkubiert. Noch einmal wurde abzentrifugiert und nun das Pellet in 200µl PBS, dem in einer Konzentration von 100µg/ml RNase A zugefügt wurde, für 20-30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die RNase A baut die in den Zellen vorhandene einzelsträngige RNA ab, so dass das PI lediglich

in die DNA interkaliert. Zuletzt wurde das Propidiumiodid zu einer Konzentration von 10µg/ml zugegeben.

Es folgte die Analyse mittels Durchflusszytometrie, ausgewertet wurde mit der Flow Jo Software (Tree Star, Inc., Ashland).



**Abbildung 3.2-6: Histogramm zur Darstellung des Zellzyklus.** An der x-Achse wird der Gehalt an PI in der DNA der Zellen gewertet, die y-Achse stellt die Anzahl Zellen zu einer bestimmten Menge PI dar. Markiert wurden alle lebenden Zellen, die sich in verschiedenen Phasen des Zellzyklus befinden (97,2%). Die erste Spitze (81,4%) beinhaltet alle Zellen, die sich in der G<sub>0</sub>- oder G<sub>1</sub>-Phase befinden, die zweite (10,4%) diejenigen in der G<sub>2</sub>- oder M-Phase. Dazwischenliegende Zellen befinden sich in der S-Phase des Zellzyklus.

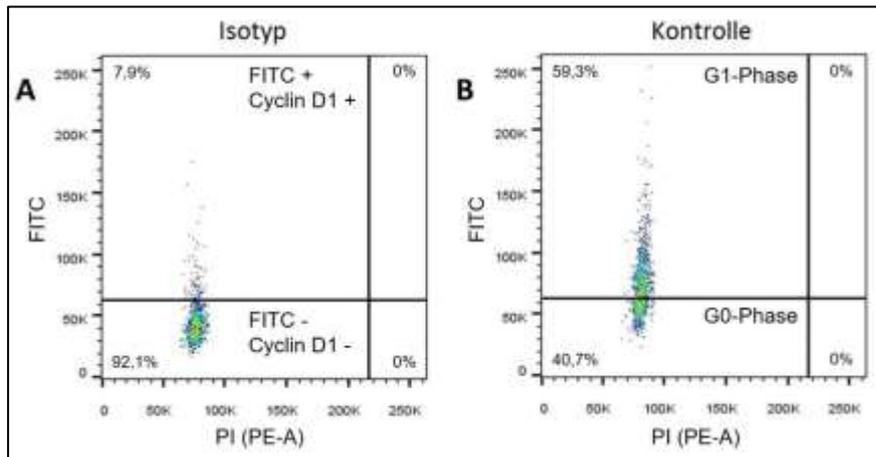
### 3.2.6.2 Unterscheidung der G<sub>0</sub>- und G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus

Cycline sind Proteine, die bei der Regulation des Zellzyklus eine zentrale Rolle spielen. In den verschiedenen Zyklusphasen werden sie unterschiedlich exprimiert. Cyclin D tritt von der G<sub>1</sub>-Phase bis zur M-Phase auf, in der G<sub>0</sub>-Phase ist es jedoch nicht in den Zellen aufzuweisen. Cyclin D1 ist notwendig für die Progression des Zellzyklus nach der G<sub>1</sub>-Phase [165]. Diese Eigenschaft macht man sich bei der Unterscheidung zwischen G<sub>0</sub>- und G<sub>1</sub>-Phase zunutze.

Zunächst wurde wie unter 3.2.6.1 verfahren und die MSC in 6-Well-Platten ausgesät und bis zu 72 Stunden mit den verschiedenen Medikamenten inkubiert. Auch die folgenden Schritte entsprechen den oben genannten, die Zellen wurden in 70% Ethanol fixiert und die Zellmembranen mit Triton X-100 permeabilisiert. Anschließend wurde noch einmal mit 1ml eiskaltem PBS gewaschen und bei 2000g für fünf Minuten zentrifugiert.

Nun wurde das Zellpellet über Nacht bei Raumtemperatur in 50µl PBS mit 1% BSA und 10µl Cyclin D1-Antikörper-Lösung bzw. einem Isotyp zur Kontrolle inkubiert. Der Cyclin-D1-Antikörper ist mit einem Farbstoff (in diesem Fall FITC) gekoppelt, wodurch er bei der Analyse sichtbar wird. Am folgenden Tag wurde erneut in PBS gewaschen und zentrifugiert. Danach wurde weiter wie bei 3.2.6.1 verfahren, mit RNase A inkubiert und mit PI gefärbt. Anschließend wurden die Proben mittels

Durchflusszytometrie analysiert. Die Auswertung erfolgte mit der Flow Jo Software (Tree Star, Inc., Ashland; siehe Abbildung 3.2-7).



**Abbildung 3.2-7: Unterscheidung zwischen G0- und G1-Phase über den Gehalt an Cyclin D1.** Für die Analyse wurde lediglich die Subpopulation der G0- und G1 Phase verwendet, diese wurde wie in Abbildung 3.2-6 ermittelt. An der x-Achse ist der Gehalt einer Zelle an PI aufgetragen, an der y-Achse wurde die Intensität des an den Cyclin D1-Antikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffes FITC (Fluoresceinisothiocyanat) gemessen. In Bild A wurde mit Hilfe des Isotyps festgelegt, welcher Bereich als FITC positiv bzw. als FITC negativ gilt. Schema B zeigt die Auswertung einer unstimulierten Kontrollgruppe. Die Zellen im FITC-positiven Bereich sind aufgrund des vorhandenen Cyclin D1 der G1-Phase zuzuordnen (hier 59,3%), die im FITC-negativen Bereich der G0-Phase (hier 40,7%).

### 3.2.6.3 Vergleich der Zellproliferation mittels BrdU

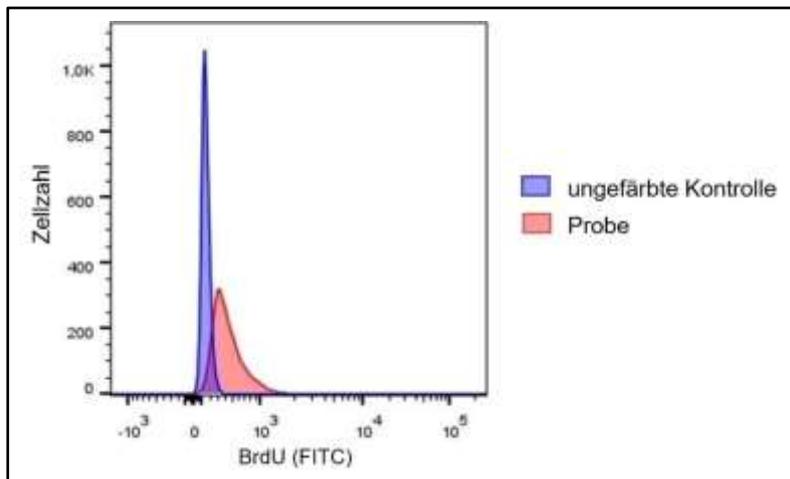
Bromdesoxyuridin (BrdU) ist ein chemisches Thymidin-Analogon. Gibt man es mit in die Zellkultur, bauen proliferierende Zellen anstatt des Nukleosids Thymidin auch BrdU in ihrer DNA ein. Die Menge des eingebauten BrdU korreliert folglich mit dem Zellwachstum. Mit speziell gegen das Nukleosidanalogon gerichteten und mit Fluorochromen kombinierten Antikörpern kann dieses im Durchflusszytometer quantifiziert werden.

Mit dem Aussäen und Stimulieren der Zellen wurde wie unter 3.2.6.1 verfahren. 48h nach dem Aussäen wurde BrdU zu einer Endkonzentration von 10µM ins Medium gegeben. Nach weiteren 48h erfolgte die Auswertung mittels Durchflusszytometrie.

Für das Zellpellet wurde das Medium abzentrifugiert und die adhären Zellen mit Trypsin vom Wellboden gelöst. Zusammen wurde das Pellet einmal mit PBS gewaschen und anschließend erneut in 300µl PBS resuspendiert. Mit einer UV-Lampe, die Licht der Wellenlänge 365nm aussendet, wurden die MSC für fünf Minuten beleuchtet. Dadurch wird die DNA denaturiert, so dass später die Antikörper an das

BrdU binden können. Nach dem fünfminütigen Zentrifugieren bei 2000 rpm wurde der Überschuss abpipettiert und das Pellet in 1ml des SpartaLabs-Fixation-Buffer ebenfalls für fünf Minuten fixiert. Dabei werden die Proben auf Eis gestellt. Nach einem erneuten Waschdurchgang mit PBS werden die MSC mit einer Lösung aus 1000µl destilliertem Wasser, 50µl FACS-Puffer, 20µl Anti-BrdU-Antikörperlösung sowie 20µl DNA-stain (7-AAD) für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Mittels Durchflusszytometrie wurden die Proben analysiert. Die Auswertung erfolgte mit der Flow Jo Software (Tree Star, Inc., Ashland). Wie in Abbildung 3.2-5 dargestellt, wurden zunächst die einzelnen Zellen herausgefiltert und anschließend wie in Abbildung 3.2-8 die Proliferation der verschiedenen Proben verglichen.

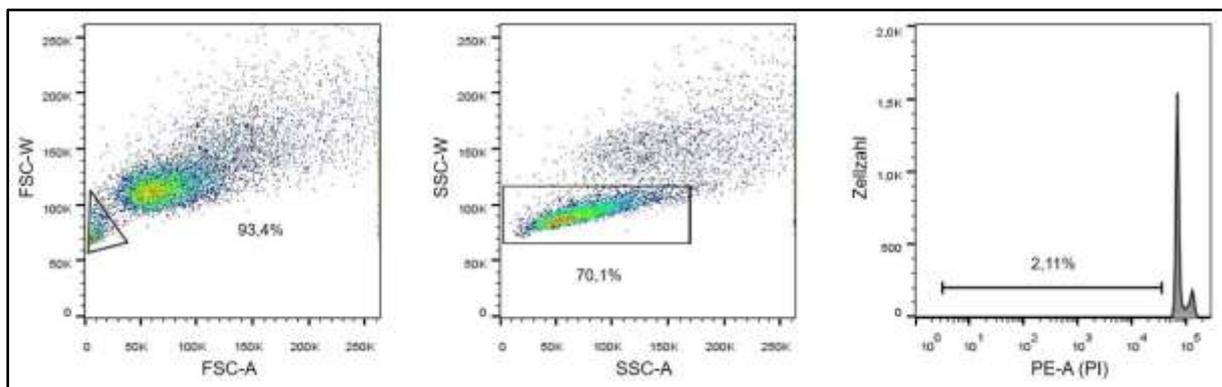


**Abbildung 3.2-8: Vergleich des Zellwachstums mittels BrdU.** Der an das in die DNA eingebaute BrdU bindende Antikörper ist mit dem Farbstoff FITC kombiniert. Die Intensität dieses Farbstoffes wurde an der x-Achse angetragen. Je weiter rechts sich eine Zellpopulation aufhält, desto höher ist ihr Gehalt an BrdU und somit ihre Wachstumsgeschwindigkeit. Über den Mittelwert der FITC-Intensität können die einzelnen Proben statistisch verglichen werden. In der Abbildung ist zu erkennen, dass die Zellen, deren Medium mit BrdU versetzt wurde im Vergleich zu den nicht behandelten MSC einen deutlichen Shift nach rechts aufweisen und somit das Nukleosidanalogon in ihre DNA eingebaut haben.

### 3.2.6.4 Apoptosefärbung nach Nicoletti

Dem apoptotischen Zelltod geht eine Fragmentierung der DNA voraus. Eine Spätform der Apoptose kann durch Färbung mit Propidiumiodid und Messung im Durchflusszytometer nachgewiesen werden. Es kann gut zwischen den kurzen DNA-Stücken der spät-apoptotischen Zellkerne und den lebenden Zellen mit einem deutlich höheren DNA-Gehalt unterschieden werden. Diese Methode beruht auf der Färbung nach Nicoletti [166].

Auch hier wurden die MSC in 6-Well-Platten wie unter 3.2.6.1 ausgesät und über bis zu 72 Stunden mit den Medikamenten wie in Tabelle 3.2-4 stimuliert. Für die Messung der Apoptoserate wurde wieder sowohl das Medium aus den Wellplatten, in dem die bereits abgestorbenen nicht mehr adhärierenden Zellen schwimmen, als auch die trypsinisierten Zellen verwendet. Sie wurden bei 500g für drei Minuten abzentrifugiert und anschließend einmal mit 1ml eiskaltem PBS gewaschen. Daraufhin wurde das Pellet in 400µl Nicoletti-Puffer, in dem Triton X-100 für die Permeabilisierung enthalten ist, resuspendiert und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 20µl Propidiumiodidlösung (1mg/ml) wurde die Apoptoserate im Durchflusszytometer analysiert.



**Abbildung 3.2-9: Ermittlung der Apoptoserate mittels Durchflusszytometrie.** Zunächst wurde wie in Diagramm A dargestellt über das Vorwärtsstreulicht Schmutzpartikel und Zellschrott ausgeschlossen. Im Gegensatz zum Gaten nach Abbildung 3.2-5 sind hier apoptotische Zellen für die weitere Auswertung vorhanden. In Diagramm B werden erneut die einzelnen Zellen (Singles) mit Hilfe des Seitwärtsstreulichts herausgefiltert. Über die logarithmische Darstellung des PI-Gehalts der einzelnen Zellen in Diagramm C, kann der Anteil Zellen mit weniger PI als in der G0/G1-Phase ermittelt werden. Dieser entspricht dem Prozentsatz der apoptotischen Zellen im Vergleich zu allen gemessenen Singles.

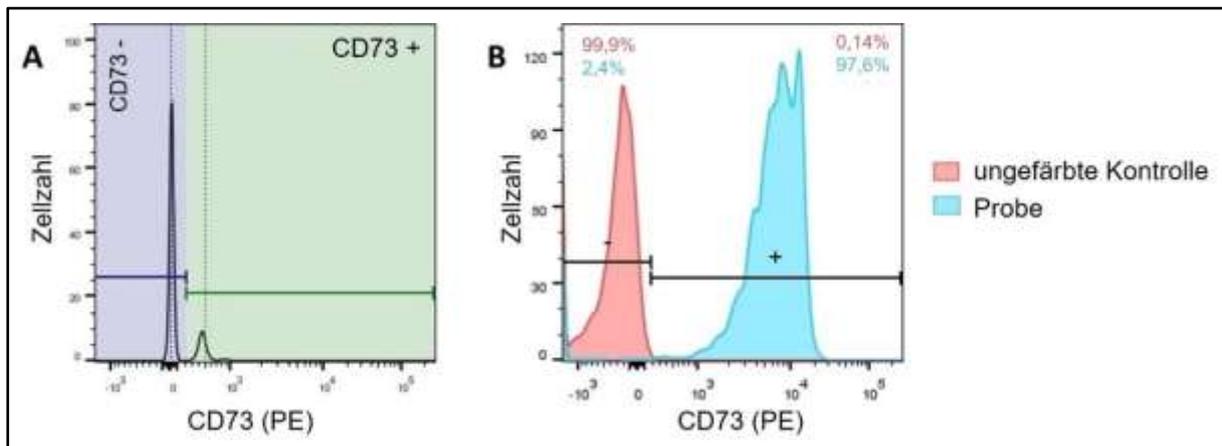
### 3.2.7 ANALYSE VON OBEFLÄCHENMERKMALEN MITTELS DURCHFLUSSZYTO-METRIE

Zellen exprimieren an ihrer Oberfläche verschiedene Proteine, die zum Beispiel als Rezeptoren oder als Enzyme fungieren. Zum Teil sind sie spezifisch für bestimmte Zelllinien, so dass man anhand der Oberflächenmerkmale Zellen klassifizieren kann. Durch Färbung mit Antikörpern, die mit fluoreszierenden Farbstoffen konjugiert sind, kann man mittels Durchflusszytometrie diese Proteine analysieren.

Zunächst wurde aus behandelten und inkubierten Zellen wie in 3.2.6.1 ein Zellpellet hergestellt. Dieses wurde in 50µl FACS-Puffer resuspendiert und mit 1µl Maus IgG2a (100µg/ml) für 20 Minuten auf Eis geblockt. Der zum Blocken verwendete Maus-Antikörper IgG2a gegen Prionantigen wurde im dem Labor von E. Kremmer (Helmholtz Zentrum München) hergestellt. [167] Anschließend wurde für weitere 30 Minuten im Dunkeln mit Antikörpern gegen verschiedene Oberflächenproteine inkubiert. Danach wurden 1ml FACS-Puffer und Propidiumiodid zu einer Konzentration von 1µg/ml zugegeben. Das PI dient in diesem Fall nur zur Diskriminierung der Zellviabilität. Nach fünf Minuten Zentrifugieren bei 500g wurde das Pellet in 250µl FACS-Puffer resuspendiert.

Zur Kompensation von Streulicht in der Auswertung wurden Kontrollproben angefertigt. Dazu wurden 5µl negative und 5µl  $\alpha$ -mouse Igk Beads in 20µl FACS-Puffer mit den gleichen Antikörpern wie oben gefärbt.

Es folgte die Analyse mittels Durchflusszytometrie, ausgewertet wurde mit der Flow Jo Software (Tree Star, Inc., Ashland).



**Abbildung 3.2-10: Histogramme zur Bestimmung der Oberflächenmarker mittels Durchflusszytometrie.** In diesem Beispiel wurden die Beads sowie die Zellen mit einem mit PE konjugierten Antikörper gegen CD73 versetzt. Für die Auswertung wurde zunächst mittels der Beads eine Kompensations-Matrix erstellt. Es wurden wie in Grafik A der positive (grün) sowie der negative (blau) Bereich eines jeweiligen Farbstoffes (hier: PE) festgelegt. Nach Kompensation der einzelnen Proben wurde die ermittelte Grenze übernommen und auf diese Weise der Anteil mit und ohne Oberflächenmarker bestimmt (Grafik B). Die ungefärbte Probe dient in diesem Fall erneut zur Kontrolle der Abgrenzung zwischen positiv und negativ. Angegeben ist der Prozentsatz der jeweiligen Probe mit bzw. ohne Oberflächenmarker (hier: CD 73).

### 3.2.8 IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG

Die Immunfluoreszenz beruht darauf, dass mit einem fluoreszierenden Farbstoff konjugierte Antikörper spezifisch an Proteine binden. Unter einem speziellen Mikroskop wird die Probe mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeleuchtet, was bewirkt, dass durch den Farbstoff ebenfalls Licht emittiert wird und so die Proteine sichtbar gemacht werden.

Hierzu wurde zunächst auf 8-Well-CulturSlides (BD Falcon™) pro Well 350µl einer Zellsuspension mit 20000 Zellen/ml ausgesät. Nach 24 Stunden wurde mit Steroiden, Coffein, Surfactant oder Vitamin A stimuliert. Weitere 72 Stunden später begann die Färbung. Der Überstand wurde abgekippt, anschließend dreimal mit einer Lösung aus 0,1% BSA in PBS gewaschen. Zwischen jedem folgenden Arbeitsschritt wurde ebenfalls immer mit dieser Lösung gewaschen. Als nächstes wurde 20 Minuten mit 200µl einer eiskalten 1:1 Mischung aus Aceton und Methanol fixiert. Anschließend wurde mit 5% BSA in PBS für 20-30 Minuten geblockt. Daraufhin folgte eine Inkubation für ein bis zwei Stunden mit dem proteinspezifischen Primärantikörper. Danach wurde mit dem zweiten, an einen Fluoreszenzfarbstoff konjugierten Spezies-spezifischen Antikörper für eine Stunde inkubiert, der an den ersten bindet. Von dem Zeitpunkt an fanden alle weiteren Schritte im Dunkeln statt. Beide Antikörper wurden in einer Lösung aus 0,1% BSA in PBS gelöst. Nun wurde zehn Minuten mit 4%igem Paraformaldehyd fixiert. Nach den letzten Waschdurchgängen wurde der Rahmen für die Wells vom Objektträger entfernt. Anschließend wurden die Zellen in Mountingmedium eingebettet und gleichzeitig mit der darin enthaltenen Dapi-Lösung die Zellkerne gefärbt. Danach wurde mit Deckgläsern abgedeckt und ringsum mit Nagellack luftdicht versiegelt. Nach dem Trocknen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop unter 10-facher und 40-facher Vergrößerung und mittels der zugehörigen AxioVision Software (Carl Zeiss, Jena) Bilder aufgenommen und ausgewertet. Alle Arbeitsschritte fanden bei Raumtemperatur statt.

### 3.2.9 *PROTEINBIOCHEMIE*

#### **3.2.9.1 *Lysieren von Zelle und Zellkern***

Um mittels Westernblot die intrazellulären Proteine nachzuweisen, muss zunächst ein Zelllysate hergestellt werden. Hierzu wurde das Medium abpipettiert und die adhären den Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit Trypsin gelöst und fünf Minuten bei 2000rpm abzentrifugiert. Danach wurde erneut mit PBS gewaschen. Nach Abkippen des Überstandes wurde das Zellpellet in SDS-Lysepuffer aufgenommen. Zuvor wurden einem Milliliter Pufferlösung 100µl Phosstop-Lösung (Roche, nach Angaben des Herstellers gelöst) zur Hemmung der Phosphatasen und 10µl Proteinaseinhibitor zugefügt. Durch die DNA ist das Lysat noch sehr viskös, weshalb diese mittels Ultraschall fraktioniert wurde. Dazu wurde beim Ultraschallgerät die Amplitude auf 10% eingestellt und je nach Menge des Lysats 10-20 Mal für 0,2 Sekunden beschallt. Anschließend wurden die Proben fünf Minuten bei 95°C gekocht, um die Proteine zu denaturieren. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Proben auf Eis gelagert. Nun wurden sie entweder direkt mittels SDS-Page aufgetrennt oder bei -80°C eingefroren.

#### **3.2.9.2 *SDS-PAGE***

Mit der Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden die Proteine nach ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt und können anschließend mittels Western Blot nachgewiesen und quantifiziert werden. Das SDS bindet an die Proteine und überdeckt so ihre Eigenladung. Dadurch sind anschließend alle Proteine negativ geladen und wandern zur Anode. So wird nur nach Größe und nicht nach Ladung aufgetrennt.

Zunächst mussten Sammelgel und Trenngel wie in 3.1.2 hergestellt werden. Als Sammelgel wurde ein Anteil an Acrylamid von 5% gewählt, für das Trenngel 12% Acrylamid. Für Proteine mit einem Molekulargewicht über 150kDa wurde ein 6% Trenngel verwendet. Die Glasplatten zwischen denen das Gel gegossen wurde, hatten einen Abstand von 1,5mm. Zur Aussparung der Taschen wurden 10er oder 15er Käbme verwendet.

Nach dem Erhärten der Gele wurde zunächst in die äußerste Tasche 2-4µl eines Markers als Größenstandard aufgetragen. Dann wurden je nach Bedarf weitere Taschen mit bis zu 20µg Zelllysate befüllt. Die Gele wurden mit Laufpuffer umspült. Das gesamte System stand auf Eis, um ein Zerfließen der Gele zu verhindern. Zu Beginn wurde für 20 Minuten eine Spannung von 80V zum Sammeln der Proben im Sammelgel angelegt, anschließend für 1-1,5 Stunden eine Spannung von 140V.

### **3.2.9.3 Semi-dry Western Blot**

Nach Auftrennung der Proteine mittels Gelelektrophorese werden die Proteine nach Western Blot-Technik auf eine Polyvinylidenfluorid(PVDF)-Transfermembran übertragen.

In der Vorbereitung wurde hierzu die PVDF-Membran zunächst zwei Minuten in Methanol vorbehandelt und anschließend nochmal 20 Minuten in ddH<sub>2</sub>O geschwenkt. Die später benötigten Schwämme und Whatman-Papiere wurden mindestens fünf Minuten in Transferpuffer im Kühlschrank getränkt.

Nun wurden nach dem Sandwich-Prinzip ein Schwamm, dann drei Whatman-Papiere, die PVDF-Membran, das Gel, wieder drei Whatman-Papiere und zuletzt nochmal ein Schwamm zwischen zwei Lochplatten in eine Blotzelle in Transferpuffer geklemmt. Je nach Anzahl Gele wurde die Stromstärke zwischen 100mA und 400mA (100mA pro Gel) gewählt und für drei Stunden belassen. Auch hier stand das ganze System auf Eis.

Nach dem Auseinanderbauen wurden die PVDF-Membranen 30 Minuten in 5% Milch zum Blocken geschwenkt und anschließend noch dreimal für zehn Minuten in jeweils frischem TBST.

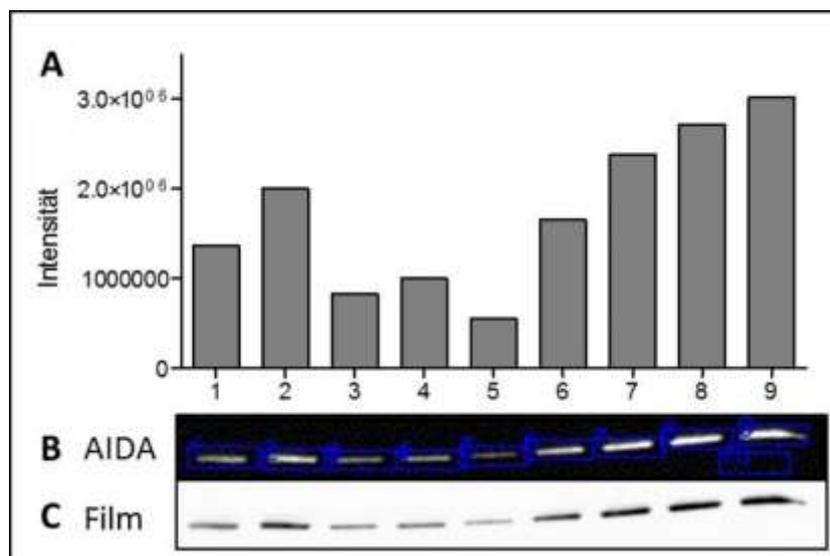
### **3.2.9.4 Immundetektion**

Nach dem Übertragen der Proteine auf die Membran müssen diese nun noch sichtbar gemacht werden. Dies erfolgt mit proteinspezifischen Antikörpern einer bestimmten Spezies. An diese bindet ein zweiter Spezies-spezifischer Antikörper, der mit einer Peroxidase (HRP, engl. horseradish peroxidase) konjugiert ist. Gibt man nun in der Dunkelkammer die ECL Entwicklungsreagenz hinzu, katalysiert die Peroxidase eine

Reaktion mit Luminol, so dass Licht emittiert wird. Mit einem aufgelegten Röntgenfilm kann man das schwache Leuchten sichtbar machen.

Die geblockten und gewaschenen PVDF-Membranen wurden über Nacht mit dem Primärantikörper bei 4°C inkubiert. Dieser wurde in 5ml 5%-iger Milch oder TBST und mit 500µl Natriumacid (10%) wie in Tabelle 3.1-1 gelöst. Nach dreimaligem Waschen in TBST wurde wieder bei 4°C für mindestens drei Stunden oder auch über Nacht die Membran mit dem zweiten Spezies-spezifischen Antikörper inkubiert. Dieser wurde ebenfalls entweder in 5% Milch oder in TBST gelöst. Zuletzt wurde erneut dreimal mit TBST gewaschen.

Zur Visualisierung wurden die Membranen auf eine Folie gelegt und leicht angetrocknet. Nun wurde die ECL Entwicklungsreagenz aufgetragen und ein Röntgenfilm bis zu 15 Minuten aufgelegt. So konnten die Proteinbanden sichtbar gemacht werden. Der Film wurde eingescannt und die Schwärzung mit der AIDA Image Analyzer Software (Raytest, Straubenhardt) quantifiziert (siehe Abbildung 3.2-11).



**Abbildung 3.2-11: Quantifizierung von Proteinbanden nach Western Blotting mittels AIDA Image Analyzer Software.** Der eingescannte Röntgenfilm, auf dem die Proteinbanden eines Westernblot-Experiments sichtbar gemacht wurden, ist in Bild C dargestellt. Jede Bande entspricht der mit Antikörpern markierten Proteinmenge der Probe einer Geltasche. Mit Hilfe der AIDA-Software wurden die einzelnen Banden ausgewählt und die Intensitäten gemessen (B). Diese wurde mit Hilfe von GraphPad Prism verglichen (A).

### 3.2.10 *DNA-MICROARRAY-TECHNOLOGIE*

Mittels Microarray-Technologie können relative Änderungen der Genexpression zweier verschiedener Proben nachgewiesen werden. Es wird aufgereinigte und gegebenenfalls vermehrte mRNA mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und anschließend mit einem Laser ausgelesen.

Für die Untersuchung wurden Zellen vier verschiedener Zelllinien (67, 68, 69, 70) früher Passage (p2-p3) mit Surfactant (80µg/ml) oder Dexamethason in zwei unterschiedlichen Konzentrationen ( $10^{-4}$ M,  $10^{-6}$ M) versetzt. Die Analyse erfolgte im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe der vier Zelllinien.

Der DNA-Microarray wurde im BFS der Justus-Liebig-Universität Gießen im Institut für Medizinische Mikrobiologie (Leiter Prof. Chakraborty, Arbeitsgruppenleiter Dr. Hossain) durchgeführt. An der Auswertung und statistischen Analyse des DNA-Microarrays war Fr. Dr. M. Markmann, Mikrobiologin (Bioinformatik) an der Justus-Liebig-Universität in Gießen maßgeblich beteiligt.

### 3.2.11 *STATISTISCHE METHODEN*

Die statistischen Berechnungen sowie die Erstellung der Diagramme erfolgte mit Microsoft Office Excel 2013, Version 15.0 sowie GraphPad Prism, Version 5.03. bzw. Sigma Plot, Version 12.3.

Für Wachstumsanalysen wurden vergleichende Varianzanalysen (two-way ANOVA) sowie die Bonferroni-Korrektur zur Adjustierung für multiples Testen durchgeführt. Es wurde in den Diagrammen zu verschiedenen Zeitpunkten der Mittelwert mit Standardfehler (+/-) dargestellt.

Bei den Analysen des Zellzyklus und der Apoptose wurden jeweils die Kontrollgruppen und behandelten Zellen mit dem unpaired t-Test (Welch-Test) verglichen. Aufgrund der geringen Fallzahlen wurde auf eine Adjustierung für multiples Testen verzichtet. Die Ergebnisse wurden somit als explorativ betrachtet.

Als Signifikanzniveau wurde für alle getesteten Hypothesen  $p < 0,05$  gewertet.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 ERMITTLUNG GEEIGNETER UNTERSUCHUNGSBEDINGUNGEN

Wie bereits in Kapitel 3.2.2 beschrieben, wurden die MSC im Brutschrank in Medium mit 20% FCS kultiviert. Für die folgenden Experimente wurde zunächst ermittelt, ab welcher Konzentration an FCS ein ausreichender Proliferationsindex gewährleistet ist. Zugleich wurden die dosisabhängigen Effekte verschiedener klinisch relevanter Steroide auf das Wachstum untersucht.

Es wurden Versuchsreihen mit 0%, 5%, 10% und 20% FCS im Medium angelegt. Nach Messung der Wellbedeckung mittels Cellscreen wurde der Proliferationsindex berechnet und verglichen. Abbildung 4.1-1 zeigt, dass die spontane Wachstumskinetik ohne FCS (Diagramm A) sehr eingeschränkt war und nicht der, der primären Kultur entsprach. Unter 5% und 10% FCS (Diagramme B und C) lag die Wachstumsgeschwindigkeit schon nahezu so hoch wie bei 20% FCS, deren Wachstumsgeschwindigkeit am besten der spontan wachsenden Kultur in der Kulturflasche entsprochen hat (Diagramm D).

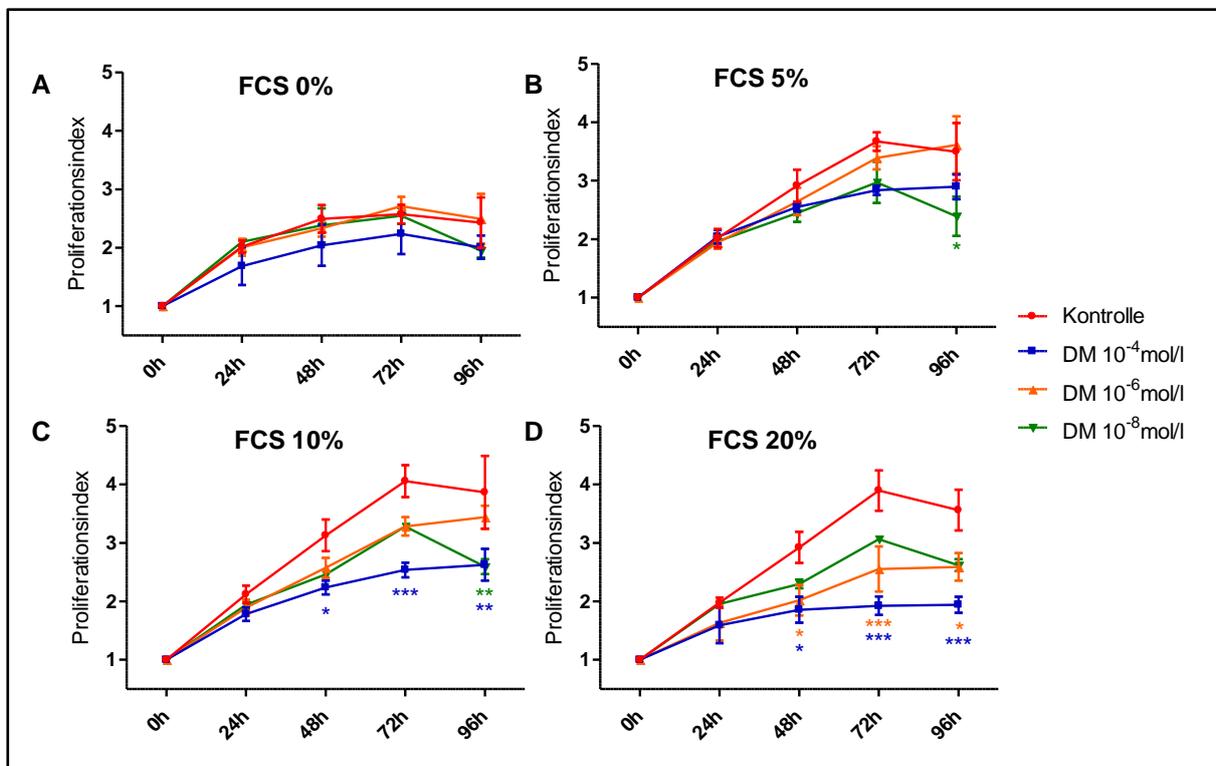
Aufgrund der ermittelten Ergebnisse und der ansonsten zu geringen und damit nicht aussagekräftigen Proliferationsraten, wurde für die folgenden Experimente stets eine Konzentration von 20% FCS im Kulturmedium verwendet. Nur hierbei konnten die gleichen spontanen Wachstumsraten wie in der primären Kultur erzielt werden.

Zugleich wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Dexamethason versetzt ( $10^{-4}$ mol/l,  $10^{-6}$ mol/l,  $10^{-8}$ mol/l). Die Konzentrationen wurden so gewählt, dass sie denen im Blut von Neugeborenen nach Steroidgabe möglichst entsprachen (siehe 3.1.3). In Abbildung 4.1-1 ist bereits eine deutliche Hemmung des Wachstums durch Steroide sichtbar. Bei einer Konzentration von 10% FCS wirkt sich die Substitution von Dexamethason mit  $10^{-4}$ mol/l signifikant auf eine Minderung des Zellwachstums aus (Diagramm C). Bei einer Konzentration von 20% FCS im Medium ist sowohl die Kultur mit  $10^{-4}$ mol/l als auch die mit  $10^{-6}$ mol/l Dexamethason signifikant im Wachstum gehemmt (Diagramm D).

In Zusammenschau der Ergebnisse aus FCS-Konzentration im Medium und Steroidkonzentration wurden für die folgenden Experimente für standardisierte Versuchsbedingungen für Dexamethason, sowie auch für die anderen relevanten

## Ergebnisse

Kortikosteroide Konzentrationen von  $10^{-4}$ mol/l und teilweise auch  $10^{-6}$ mol/l verwendet, da in hohen Dosen stets bei gutem Spontanwachstum mit 20%-FCS eine signifikante Wachstumsreduktion erzielt werden konnte und somit ein stabiles experimentelles Setting für die primären Zellkulturuntersuchungen bestand.

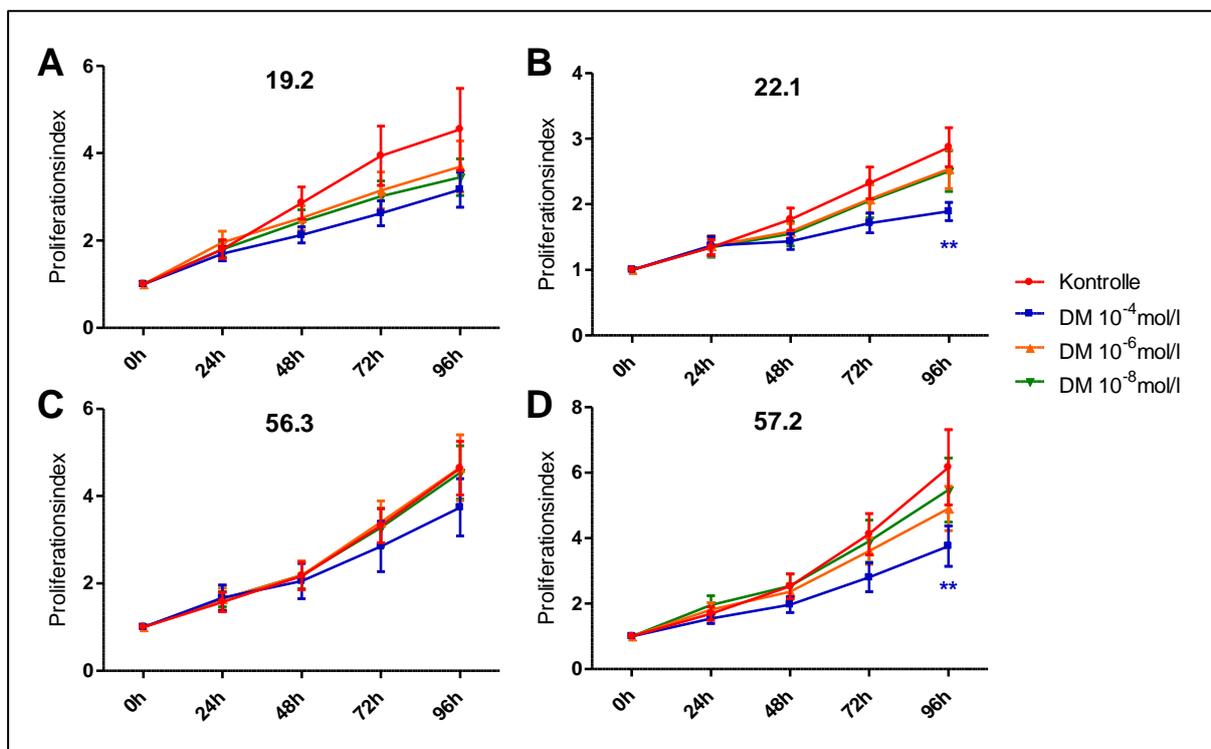


**Abbildung 4.1-1: Vergleich des Effekts unterschiedlicher Konzentrationen von Dexamethason (DM) auf das Zellwachstum bei verschiedenen Konzentrationen von FCS im Kulturmedium.** Untersucht wurden die Zelllinien 19.2 und 22.1 in je zwei unterschiedlichen Passagen (n=4 Experimente). 24 Stunden nach dem Aussäen in Kulturmedium mit unterschiedlichem Zusatz von FCS (siehe A bis D) wurden sie mit DM in den angegebenen Konzentrationen stimuliert. Die Analysen erfolgten durch Messung der Wellbodenbedeckung mittels Cellscreen alle 24h über einen Zeitraum von fünf Tagen. Dabei entspricht die Messung 0h auf der x-Achse dem Zeitpunkt der Stimulation mit DM. Der Proliferationsindex errechnet sich aus der Wellbodenbedeckung zu den einzelnen Zeitpunkten im Verhältnis zur Wellbedeckung zum Zeitpunkt 0h. Mittels two-way ANOVA und Bonferroni-post-Test wurde die Signifikanz überprüft, Mittelwert und Standardfehler (SEM) wurden graphisch dargestellt. Alle signifikanten Unterschiede zwischen den Wachstumskurven wurden markiert, sonst nicht signifikant. (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ )

## 4.2 EINFLUSS DER IN DER BPD-THERAPIE ETABLIERTEN MEDIKAMENTE AUF DAS WACHSTUM DER MESENCHYMALEN STROMAZELLEN

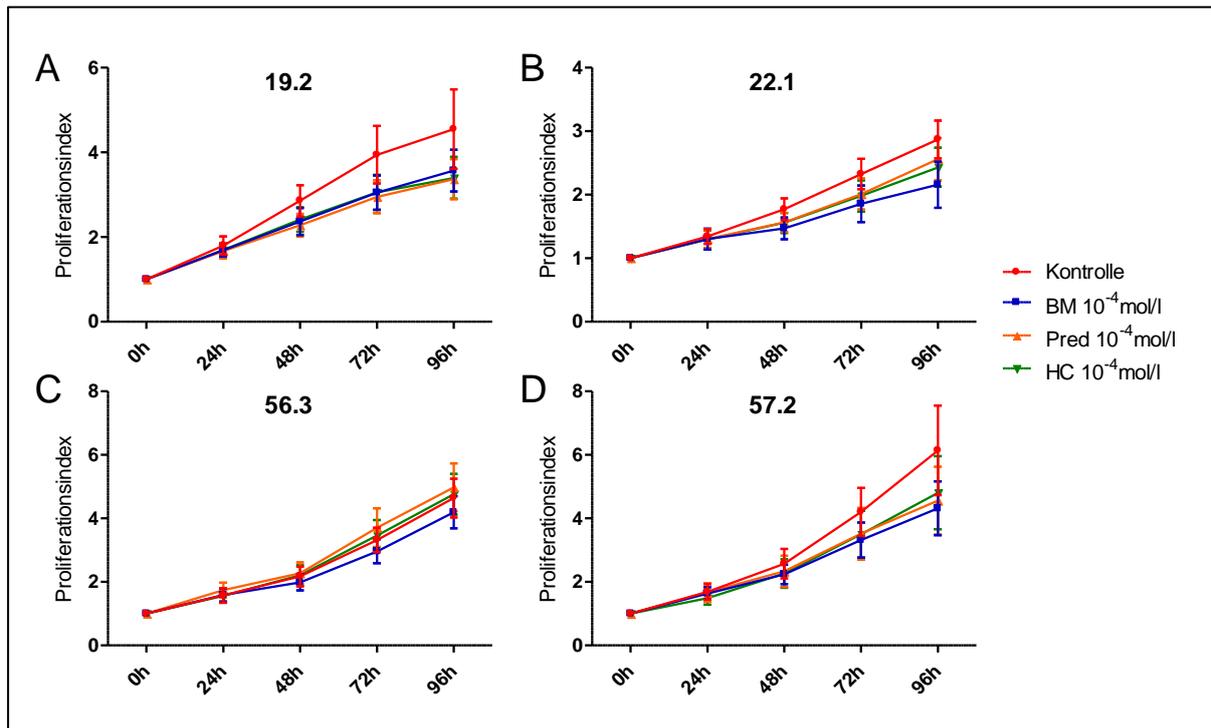
### 4.2.1 UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES DER STEROIDE DEXAMETHASON, BETAMETHASON, PREDNISOLON UND HYDROCORTISON AUF DAS ZELLWACHSTUM

Untersucht wurde zunächst der Einfluss klinisch prä- und postnatal eingesetzter Steroide Dexamethason, Betamethason, Prednisolon und Hydrocortison auf die Proliferation verschiedener MSC-Zelllinien. Es wurde über einen Zeitraum von bis zu 72 Stunden nach Medikamentenzugabe mittels Cellscreen sowie zur Bestätigung ebenfalls mittels xCELLigence der Proliferationsindex ermittelt und verglichen.



**Abbildung 4.2-1: Ermittlung der Auswirkung von Dexamethason (DM) in verschiedenen Konzentrationen auf das Zellwachstum einzelner MSC-Zelllinien mittels Cellscreen.** Es wurden Kulturen der Zelllinien 19.2 (A; n=6 Experimente), 22.1 (B; n=5 Experimente), 56.3 (C; n=6 Experimente) und 57.2 (D; n=6 Experimente) in bis zu sechs aufeinanderfolgenden Passagen 24 Stunden nach dem Aussähen mit DM in den angegebenen Konzentrationen versetzt. Zeitpunkt 0h auf der x-Achse entspricht der Zugabe von DM. Anschließend wurde im 24-Stundentakt mittels Cellscreen über einen Zeitraum von fünf Tagen die Wellbodenbedeckung gemessen. Der Proliferationsindex errechnet sich aus der Wellbodenbedeckung zu den einzelnen Zeitpunkten im Verhältnis zur Wellbedeckung zum Zeitpunkt 0h. Mittels two-way ANOVA und Bonferroni-post-Test wurde die Signifikanz überprüft, Mittelwert und Standardfehler wurden graphisch dargestellt. Alle signifikanten Unterschiede zwischen den Wachstumskurven wurden markiert, sonst nicht signifikant. (\*\* p<0,01)

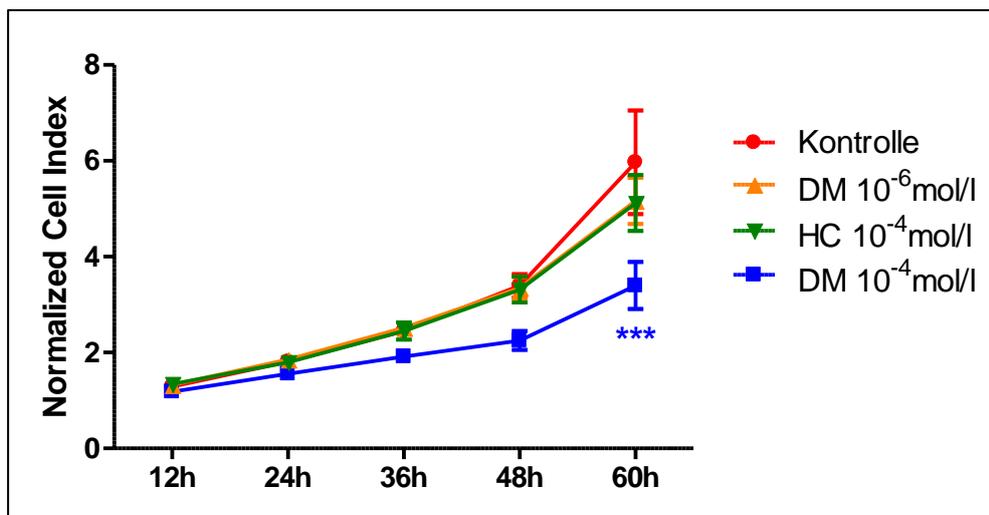
Für Dexamethason wurden Messreihen in verschiedenen Konzentrationen angelegt. Dabei zeigte sich eine sichtbare Abnahme des Zellwachstums bei allen Konzentrationen und allen vier untersuchten Zelllinien (siehe Abbildung 4.2-1). Bei der höchsten Konzentration mit  $10^{-4}$  mol/l Dexamethason im Medium wiesen die Zelllinien 22.1 und 57.2 eine signifikante Wachstumshemmung auf ( $p < 0,01$ ). Bei den Zelllinien 19.2 und 56.3 zeigt sich das Wachstum ebenfalls reduziert, jedoch nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).



**Abbildung 4.2-2: Ermittlung der Auswirkung von Betamethason (BM), Prednisolon (Pred) oder Hydrocortison (HC) auf das Zellwachstum einzelner MSC-Zelllinien mittels Cellscreen.** Zum Zeitpunkt 0h auf der x-Achse, entsprechend 24 Stunden nach dem Aussäen, wurden die genannten Steroide jeweils in bis zu sechs unterschiedlichen Passagen in das Kulturmedium der Zelllinien 19.2 (A; n=6 Experimente), 22.1 (B; n=5 Experimente), 56.3 (C; n=6 Experimente) und 57.2 (D; n=5 Experimente) gegeben. Im Abstand von 24 Stunden und über einen Zeitraum von fünf Tagen wurde mittels Cellscreen die Wellbodenbedeckung analysiert und über das Verhältnis der Wellbedeckung zu den einzelnen Zeitpunkten zur Wellbedeckung zum Zeitpunkt 0h der Proliferationsindex ermittelt. Mittels two-way ANOVA und Bonferroni-post-Test wurde die Signifikanz überprüft, Mittelwert und Standardfehler wurden graphisch dargestellt. Alle Unterschiede zwischen den Wachstumskurven waren nicht signifikant mit  $p > 0,05$ .

In Abbildung 4.2-2 wird der Effekt von Betamethason, Prednisolon und Hydrocortison auf das Zellwachstum der MSC vergleichsweise dargestellt. Hierbei zeigte sich im Gegensatz zu Dexamethason keine signifikante Wachstumshemmung. Bei den Zelllinien 19.2, 22.1 und 57.2 ist eine Reduktion des Wachstums sichtbar, diese war

jedoch nicht signifikant ( $p > 0,05$ ). Insbesondere die Wachstumskurven der mit Betamethason versetzten Kulturen, einem Steroid mit 25-facher glukokortikoider Potenz (siehe Tabelle 3.2-4), wichen bei den Zelllinien 22.1 und 57.2 am deutlichsten von der Kontrolle ab. Die mit Prednisolon behandelten Zellen zeigen bei nur viermal so hoher glukokortikoider Potenz im Vergleich zu Hydrocortison ein sehr ähnliches Wachstumsverhalten wie die mit Hydrocortison versetzten Zellen. Nur mit Dexamethason wurde somit als stärkstes bei den Experimenten verwendete Kortikosteroid eine signifikante Wachstumsreduktion erzielt (siehe Abbildung 4.2-2).



**Abbildung 4.2-3: Darstellung der mittels xCELLigence ermittelten Proliferation unter dem Einfluss verschiedener Kortikosteroide aller gemessenen MSC-Zelllinien.** Bei DM wurden insgesamt  $n = 22$  Experimente und bei HC  $n = 20$  Experimente der Zelllinien 19.2, 22.1, 59.2, 60.1, 61.2, 62.1, 66.1, 67.1, 68.3, 69.1 und 70.4 in verschiedenen Passagen analysiert. 24 Stunden nach dem Aussäen wurden die MSC mit den Steroiden zu den angegebenen Konzentrationen versetzt und das Zellwachstum über mindestens 96 Stunden aufgezeichnet. Mit Hilfe der zugehörigen Software wurde zum Zeitpunkt der Stimulation der Zellindex normalisiert. Mittels two-way ANOVA und Bonferroni-post-Test wurde die Signifikanz überprüft, dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) in Stunden nach der Stimulation. Alle signifikanten Unterschiede zwischen den behandelten MSC und den Kontrollzellen wurden in der Abbildung markiert, sonst nicht signifikant. (\*\*\*)  $p < 0,001$

Aufgrund der geringeren Anzahl verfügbarer Wells bei einer Analyse mittels xCELLigence konnte nur ein Teil der Stimulanzen getestet werden. Auch bei der Untersuchung der Proliferation über die Messung der elektrischen Impedanz mittels xCELLigence konnte eine Wachstumsreduktion durch Dexamethason in hoher Konzentration festgestellt werden. Abbildung 4.2-3 zeigt die gemittelten Wachstumskurven von zehn verschiedenen unbehandelten (Kontrolle) Zelllinien, sowie unter dem Einfluss von Dexamethason oder Hydrocortison. Bei der höchsten getesteten Konzentration von Dexamethason von  $c = 10^{-4}$  mol/l konnte eine signifikante

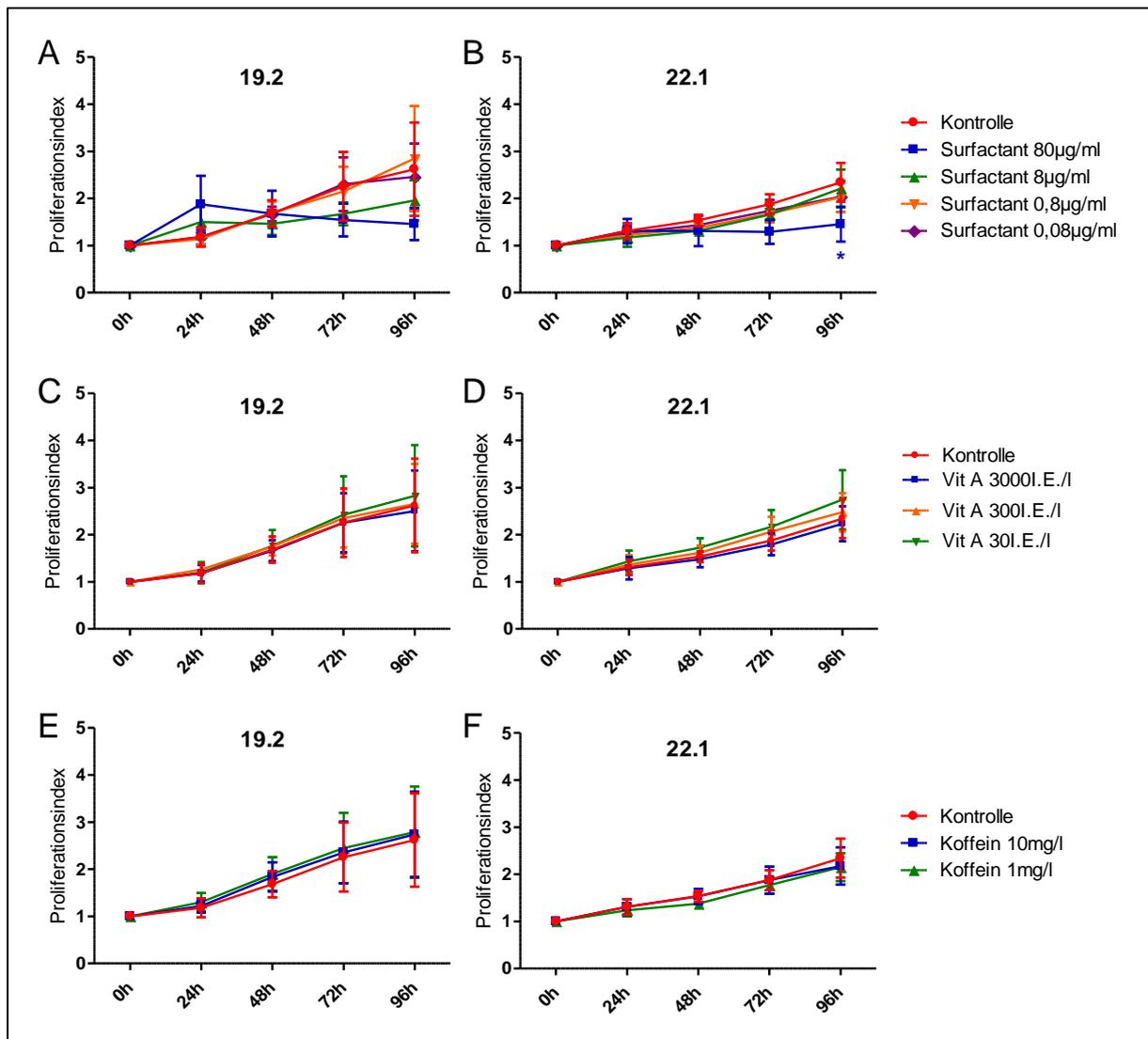
Hemmung der Zellproliferation nachgewiesen werden. Bei niedrigerer Dosierung von  $c=10^{-6}$ mol/l sowie bei Hydrocortison mit  $c=10^{-4}$ mol/l war das Wachstum der MSC-Zelllinien im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert, jedoch nicht signifikant.

Zusammengefasst zeigte sich sowohl bei der Auswertung einzelner als auch in der Gesamtschau verschiedener MSC-Zelllinien eine Abnahme des Zellwachstums bei den mit Steroiden behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Zusätzlich ist die Wirkung der Steroide mit höherer glukokortikoider Potenz wie Dexamethason und Betamethason stärker. Das bedeutet, sie verringern die Wachstumsgeschwindigkeit der MSC mehr als Prednisolon und Hydrocortison.

### *4.2.2 EINFLUSS DER WEITEREN BPD THERAPEUTIKA, SURFACTANT, VITAMIN A UND COFFEIN AUF DAS WACHSTUM DER MESENCHYMALEN STROMAZELLEN*

Neben den Steroiden wurde auch die Auswirkung von Surfactant, Vitamin A und Coffein auf das Zellwachstum der MSC bestimmt. Die Stimulanzen wurden nach der in Kapitel 3.2.4 ermittelten Konzentration dem Kulturmedium zugefügt und das Wachstumsverhalten über einen Verlauf von fünf Tagen beobachtet (siehe Abbildung 4.2-4).

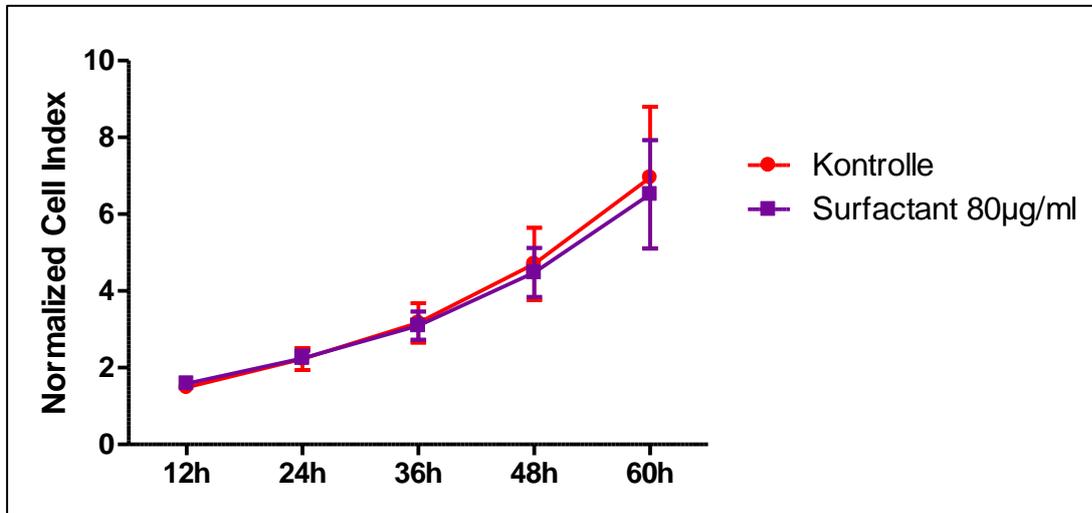
Bei der Zelllinie 22.1 zeigte sich in Abbildung 4.2-4 bei sehr hoher Konzentration von Surfactant mit 80 $\mu$ g/ml eine signifikante Hemmung des Wachstums (Diagramm B,  $p<0,05$ ). Ebenso ist bei der Zelllinie 19.2 und bei der höchsten Konzentration ein reduziertes Wachstum sichtbar, dieses war jedoch nicht signifikant (Diagramm A). Niedrigere Konzentrationen von Surfactant haben keinen Einfluss auf das Zellwachstum der MSC. Durch Vitamin A und durch Coffein wurde das Wachstum der MSC nicht beeinflusst (Diagramme C-F). Die Kurven der mit den Stimulanzen behandelten Zelllinien verlaufen annähernd parallel zur Kontrolle.



**Abbildung 4.2-4: Wirkung von Surfactant, Vitamin A oder Coffein auf das Wachstum der MSC.** In das Kulturmedium der Zelllinien 19.2 (linke Spalte; n=3 Experimente) und 22.1 (rechte Spalte; n=3 Experimente) wurde 24 Stunden nach dem Aussähen in drei jeweils unterschiedlichen Passagen Surfactant, Vitamin A oder Coffein in den angegebenen Konzentrationen zugegeben. Zum Zeitpunkt 0h erfolgt die Stimulation. Die Messungen der Wellbodenbedeckung mittels Cellscreen erfolgte alle 24h über fünf Tage. Der Proliferationsindex errechnet sich aus der Wellbedeckung zu den einzelnen Zeitpunkten im Verhältnis zur Wellbedeckung zum Zeitpunkt 0h. Die Signifikanz wurde mittels two-way ANOVA und Bonferroni-post-Test überprüft, Mittelwert und Standardfehler wurden graphisch dargestellt. Alle signifikanten Unterschiede zwischen den Wachstumskurven wurden markiert, sonst nicht signifikant. (\* p<0,05)

Aufgrund der begrenzten Möglichkeiten der xCELLigence-Analyse bezüglich der Anzahl auswertbarer Wells, wurde nur der Einfluss von Surfactant auf die MSC mit der alternativen Messmethode untersucht. Auch hier zeigte sich ein mit den Cellscreen-Experimenten vergleichbares Ergebnis (siehe Abbildung 4.2-5). Es konnten keine signifikanten Wachstumsunterschiede nachgewiesen werden. Lediglich eine minimale

Verminderung der Proliferation, der mit Surfactant behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle ist ebenso wie bei der Cellscreen-Analyse sichtbar, allerdings nicht signifikant reduziert (vgl. Abbildung 4.2-4).



**Abbildung 4.2-5: Darstellung des mit dem xCELLigence ermittelten Einflusses von Surfactant auf die Proliferation von MSC.** Es wurden insgesamt n= 15 Experimente mit Kulturen der Zelllinien 59.2, 66.1, 67.1, 68.3, 69.1 und 70.4 in verschiedenen Passagen durchgeführt. 24 Stunden nach dem Aussähen wurden die MSC mit Surfactant stimuliert und anschließend das Wachstum über mindestens 96 Stunden aufgezeichnet. Mittels der zugehörigen Software wurden die Wachstumskurven analysiert und zum Zeitpunkt der Stimulation der Zellindex normalisiert. Mittels two-way ANOVA und Bonferroni-post-Test wurde die Signifikanz überprüft, es wurden Mittelwerte und Standardfehler (SEM) in Stunden nach der Stimulation mit Surfactant in der Abbildung dargestellt. Die Unterschiede zwischen den Proliferationskurven waren stets nicht signifikant mit  $p > 0,05$ .

### 4.2.3 BESTÄTIGUNG DER MITTELS CELLSCREEN ERMITTELTEN ERGEBNISSE DURCH DEN IMMUNHISTOCHEMISCHEN NACHWEIS ERFOLGTER DNA-SYNTHESE

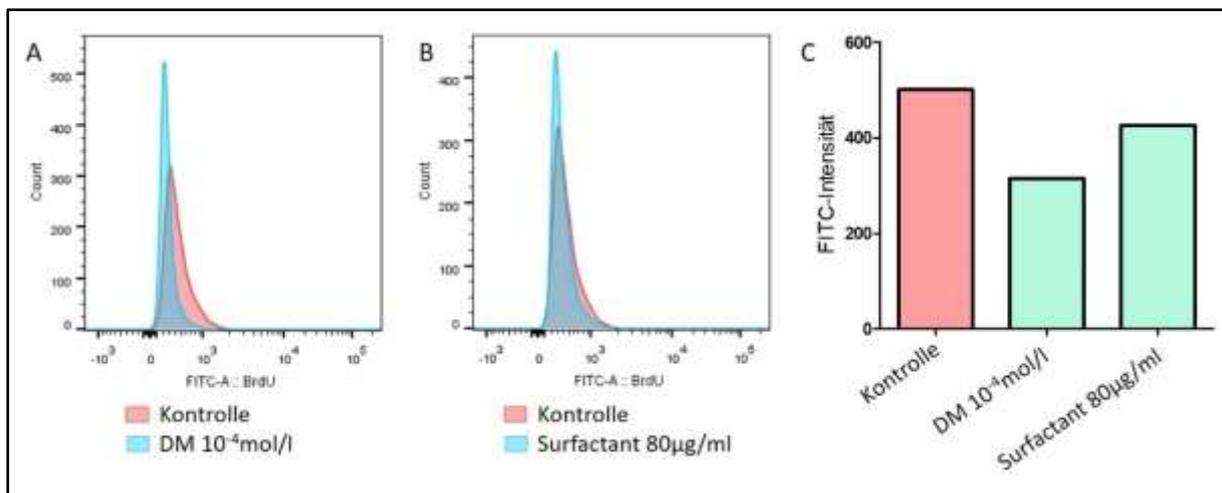
Über das Einschleusen von BrdU, einem Thymidin-Analogon, in die DNA und anschließendem Markieren desselben über einen mit einem Fluorochrom konjugierten Antikörper, kann die erfolgte DNA-Synthese quantifiziert werden (siehe Kapitel 3.2.6.3).

Da diese bestätigenden Experimente für eine Veränderung des Zellwachstums nur mit zwei Zelllinien (59.2, 60.1) durchgeführt wurden, kann keine aussagekräftige Statistik erhoben werden. Abbildung 4.2-6, A zeigt jedoch, dass die mit Dexamethason in hoher Dosis ( $c=10^{-4}$ mol/l) behandelten Zellen im Mittel weiter links, also im Bereich

niedrigeren BrdU-Gehalts, liegen als die Kontrollzellen. Im Balkendiagramm (C) ist ebenfalls ein erheblicher Unterschied der Mittelwerte sichtbar.

Im gleichen Zeitraum wurde folglich nach Zuführen von hohen Dexamethasonkonzentrationen weniger DNA synthetisiert als bei den unstimulierten MSC, was in Analogie zu den Ergebnissen der Cellscreen- und xCELLigence-Messungen auf eine Wachstumsreduktion durch Dexamethason schließen lässt.

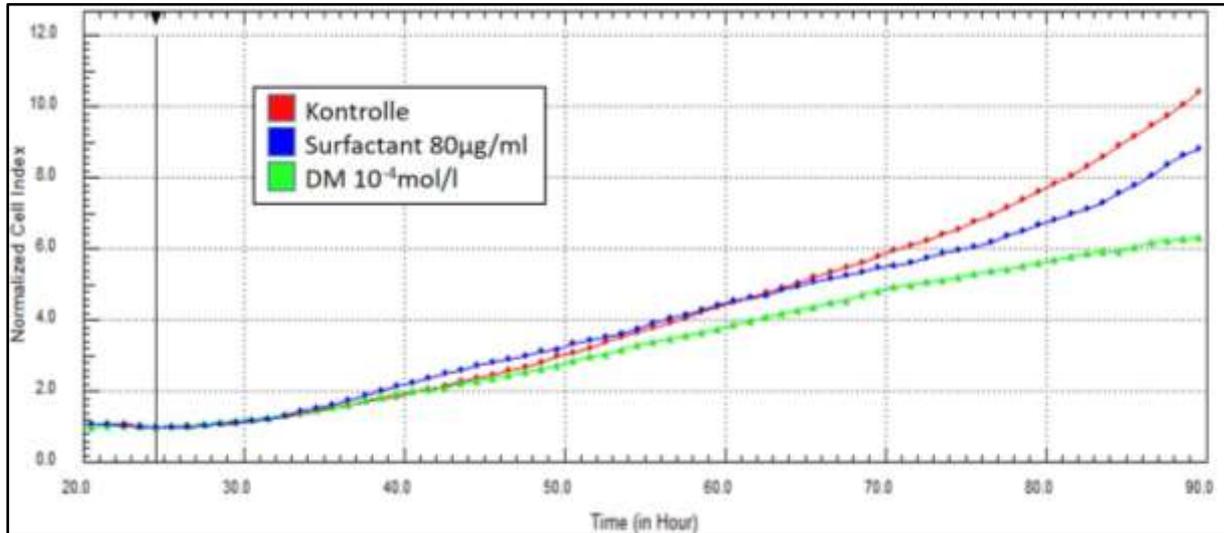
Die mit Surfactant behandelten Zellen liegen nahezu im gleichen Bereich wie die Kontrollgruppe (Abbildung 4.2-6, B). Auch die Mittelwerte (C) differieren nur wenig im Vergleich zu Dexamethason und der Kontrolle.



**Abbildung 4.2-6: Vergleich der Proliferation durch Einbau und Quantifizierung von BrdU in der DNA.** 24 Stunden nach dem Aussäen (dargestellt Zelllinie 59.2) wurde mit Dexamethason oder Surfactant stimuliert. Nach weiteren 24 Stunden wurde BrdU in das Kulturmedium zugegeben. Dieses wurde in den folgenden 48 Stunden während der DNA-Synthese von den MSC mit eingebaut. Mit Hilfe eines Anti-BrdU-Antikörpers konnte anschließend in der Durchflusszytometrie der BrdU-Gehalt quantifiziert werden. In den Abbildungen A und B wurde die Intensität des an den Anti-BrdU-Antikörper konjugierten Farbstoffes FITC gemessen und an der x-Achse aufgetragen. In Abbildung C wurde der Mittelwert der FITC-Intensität der jeweiligen Gruppe verglichen.

Zur Objektivierung und Bestätigung der durch die BrdU-Färbung ermittelten Ergebnisse wurde zeitgleich eine Auswertung der Zellproliferation über die Messung der elektrischen Impedanz durchgeführt (siehe Abbildung 4.2-7). Die Wachstumskurve der mit Dexamethason behandelten Zellen verläuft dabei deutlich unter dem Graphen der Kontrolle. Dies ist gut mit der Verschiebung nach links der zeitgleich stimulierten MSC in Richtung geringerer FITC-Intensität und somit niedrigeren DNA-Gehalts wie in Abbildung 4.2-6, A und C vereinbar. Ebenso liegt die Kurve der mit Surfactant versetzten Zellen leicht unterhalb der Kontrolle, was sich ebenfalls mit einer nur

geringen Verschiebung bzw. Minderung der mittleren FITC-Intensität deckt (siehe Abbildung 4.2-6, A und C).

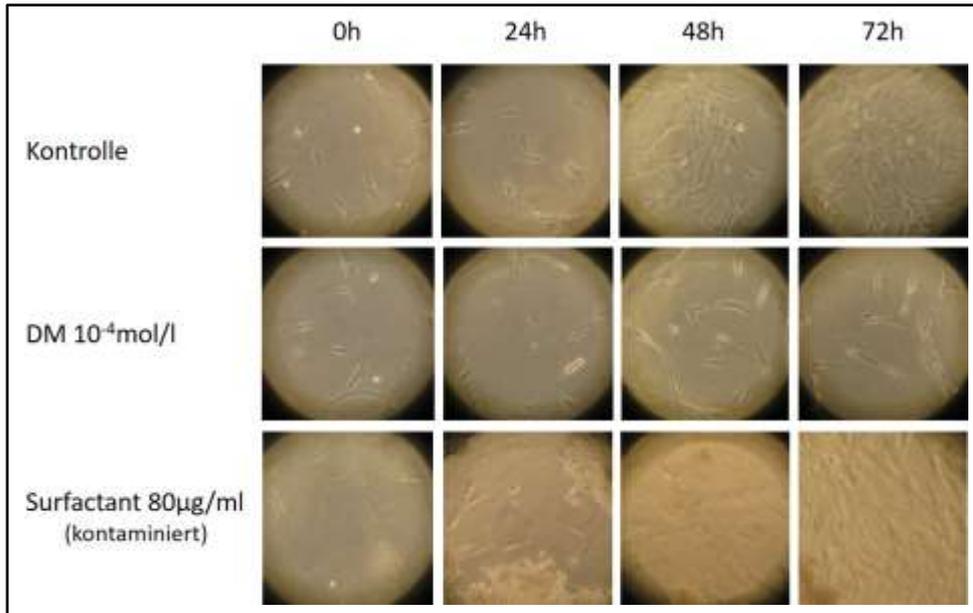


**Abbildung 4.2-7: Zeitlich parallele Proliferationsmessung mittels xCELLigence zur BrdU-Analyse.** 24 Stunden nach dem Aussähen der Zelllinie 59.2 wurde dem Kulturmedium Dexamethason (DM) oder Surfactant in den angegebenen Konzentrationen zugeführt. Nach 90 Stunden automatisierter Datenaufnahme wurden mittels der zugehörigen Software der Zellindex ermittelt und zum Zeitpunkt der Stimulation bei 24h normalisiert (senkrechte Markierung mit Pfeilspitze).

Letztendlich bestätigt die Analyse der neu synthetisierten DNA-Menge in den MSC die Ergebnisse der Cellscreen- und xCELLigence-Experimente. Dexamethason führt in hoher Dosierung zu einer Minderung der Wachstumsrate der MSC. Surfactant hat keinen oder nur einen minimalen Einfluss.

#### *4.2.4 BESTÄTIGUNG DER MITTELS CELLSCREEN ERMITTELTEN ERGEBNISSE ÜBER DIE AUFNAHME KONSEKUTIVER LICHTMIKROSKOPISCHER BILDER*

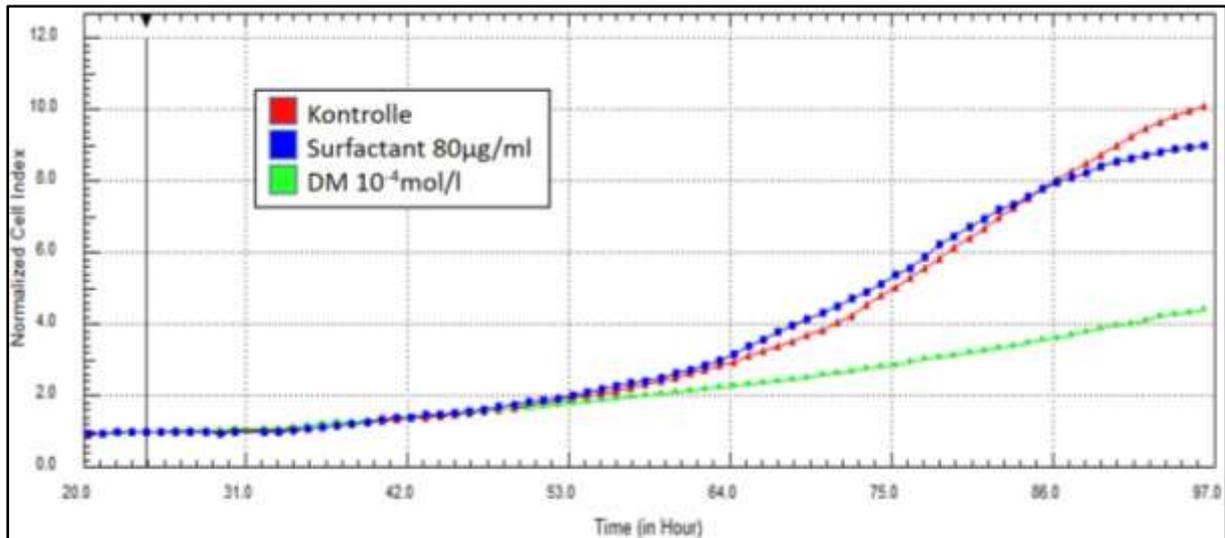
Die Wachstumshemmung der MSC durch Dexamethason und durch Surfactant soll über die Aufnahme konsekutiver Bilder über das Lichtmikroskop validiert werden. Dazu wurden im Abstand von 24h Aufnahmen des zentralen Ausschnittes der Wellböden gemacht und die Bildersequenz miteinander verglichen. Zeitgleich wurde mittels xCELLigence Wachstumskurven der gleichen Zelllinien unter den gleichen Stimulationsbedingungen aufgenommen.



**Abbildung 4.2-8: Lichtmikroskopische Beurteilung des Einflusses von Dexamethason (DM) und Surfactant auf die Spontanproliferation der MSC.** 24 Stunden nach dem Aussähen (dargestellt Zelllinie 70.4) wurde das Kulturmedium mit DM oder Surfactant in den angegebenen Konzentrationen versetzt, direkt im Anschluss wurden von einem repräsentativen von vier parallel stimulierten Wells über das Lichtmikroskop und mit Hilfe einer Digitalkamera Bilder generiert. Dies entspricht dem Zeitpunkt 0h. Alle weiteren 24 Stunden wurden von den identischen Wells Bilder aufgenommen.

Abbildung 4.2-8 zeigt zum einen eine ähnliche Wellbedeckung der Kontrolle, als auch der mit DM oder Surfactant versetzten Zellen 24h nach dem Aussähen (Zeitpunkt 0h). Im Verlauf ist deutlich zu erkennen, dass die MSC der Kontrolle sowie der mit Surfactant behandelten Kultur gut wachsen und sich stetig vermehren. Die mit DM in hoher Dosis ( $c=10^{-4}$ mol/l) stimulierten Zellen zeigen innerhalb der 72 aufgezeichneten Stunden nur ein sehr reduziertes Wachstum.

Zur Bestätigung der im Lichtmikroskop aufgenommenen Wachstumshemmung durch Dexamethason wurde zeitgleich eine xCELLigence-Analyse durchgeführt (siehe Abbildung 4.2-9). Hierbei zeigte sich der Verlauf der Linie, die die mit dem Steroid therapierten MSC repräsentiert, deutlich unterhalb der Linie der Kontrolle. Dies spricht für eine Minderung der Proliferation und deckt sich mit der sehr viel geringeren Zelldichte der mit Dexamethason stimulierten Zellen nach 72h in Abbildung 4.2-8. Die Kurve der mit Surfactant stimulierten Zellen verläuft hingegen annähernd parallel zur Kontrolle und beeinflusst das Zellwachstum somit nicht.



**Abbildung 4.2-9: Mittels xCELLigence ermittelte Zellproliferation als Validierung zur Aufnahme konsekutiver lichtmikroskopischer Bilder.** 24 Stunden nach dem Aussähen (dargestellt Zelllinie 70.4) wurde dem Kulturmedium Dexamethason oder Surfactant in den angegebenen Konzentrationen zugegeben. Die Daten wurden im Stundentakt generiert. Mit Hilfe der zugehörigen Software wurden die Wachstumskurven zum Zeitpunkt 24h normalisiert (senkrechte Markierung).

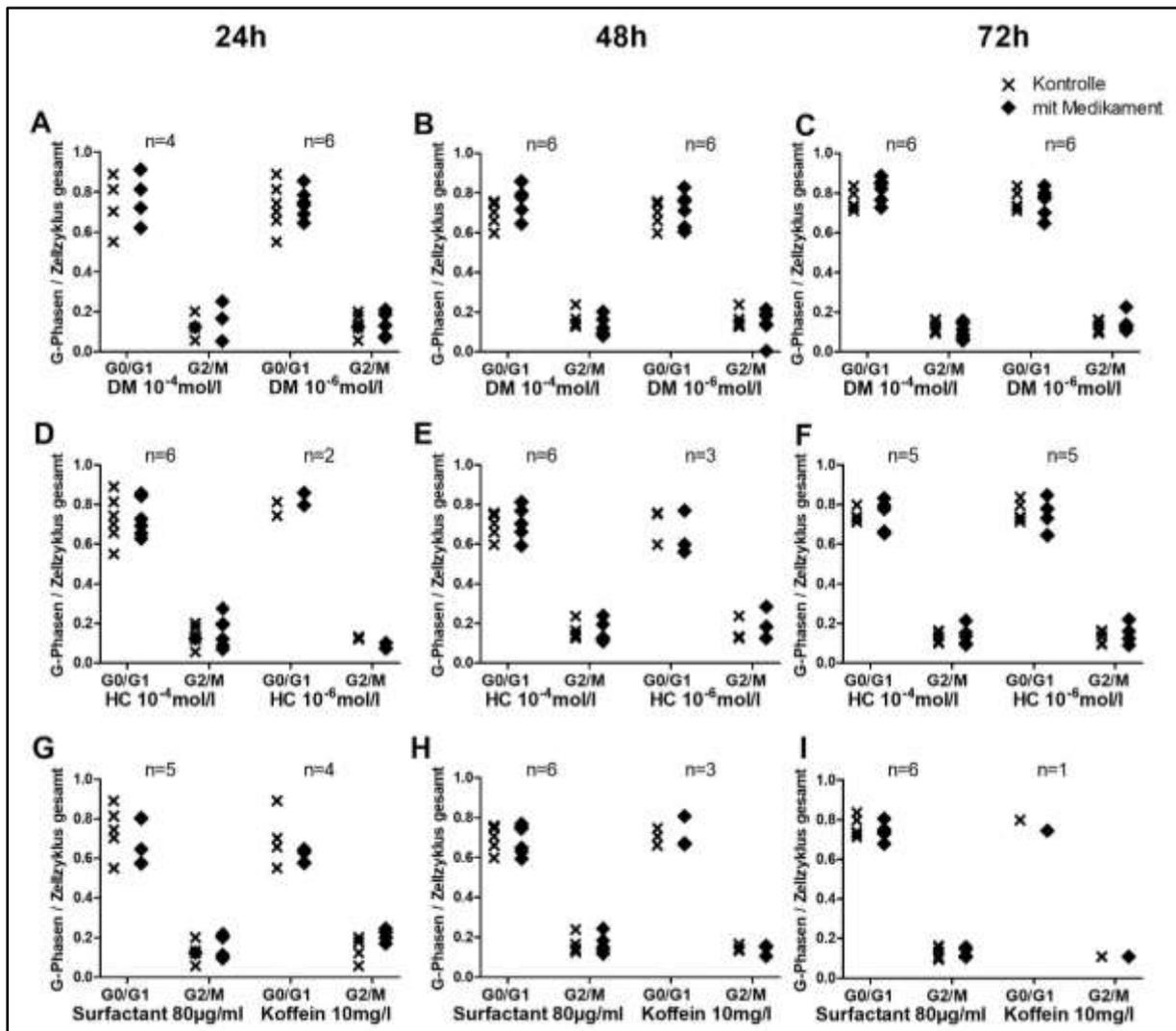
Zusammenfassend wurde die mittels Cellscreen sowie xCELLigence erhobene Wachstumshemmung durch die Steroide durch die Aufnahme konsekutiver lichtmikroskopischer Bilder validiert. Surfactant hat hierbei keinen sichtbaren Einfluss auf die Proliferation.

### 4.3 EINFLUSS VERSCHIEDENER IN DER BPD-THERAPIE ETABLIERTEN MEDIKAMENTE AUF ZELLYKLUS UND APOPTOSE

#### 4.3.1 UNTERSUCHUNG EINES ARRESTS DES ZELLYKLUS DURCH STEROIDE, SURFACTANT ODER COFFEIN

Nachdem eine Proliferationshemmung durch höher potente Steroide bestätigt werden konnte, wurde ein möglicher Zellzyklusarrest untersucht. Dazu wurden vier verschiedene Zelllinien (55, 59, 67, 70) in bis zu zwei Passagen über 24, 48 oder 72 Stunden mit Dexamethason ( $c=10^{-4}\text{mol/l}$ ,  $c=10^{-6}\text{mol/l}$ ), Hydrocortison ( $c=10^{-4}\text{mol/l}$ ,  $c=10^{-6}\text{mol/l}$ ), Surfactant ( $c=80\mu\text{g/ml}$ ) oder Coffein ( $c=10\text{mg/l}$ ) behandelt. Durch Färbung mit Propidiumiodid, einem Interkalator, kann der DNA-Gehalt einer Zelle anschließend sichtbar gemacht und mittels Durchflusszytometrie ermittelt werden. In Abbildung 4.3-1 ist die Zellzyklusverteilung der G0/G1-Phase sowie der G2/M-Phase der unbehandelten Kontroll-MSK gegenüber den stimulierten Zellen dargestellt.

Abbildung 4.3-1 zeigt, dass sich im Vergleich der mit Dexamethason in hoher Konzentration ( $c=10^{-4}\text{mol/l}$ ) stimulierten Zellen zu den unbehandelten Kontrollzellen bereits nach 24, und deutlicher noch nach 48 und 72 Stunden mehr MSK in der G0- oder G1-Phase befinden und weniger in der G2- oder M-Phase (Diagramme A, B und C). Durch die Stimulation in hoher Dexamethasonkonzentration lässt sich somit ein Arrest des Zellzyklus in der G0- oder G1-Phase ableiten. Bei Hydrocortison ist dieser Trend nicht mehr so deutlich sichtbar, jedoch für die höhere Dosierung ( $c=10^{-4}\text{mol/l}$ ) ebenfalls in Richtung eines G0-/G1-Phasen-Arrestes nachweisbar (D, E). Bei niedrigerer Konzentration ( $c=10^{-6}\text{mol/l}$ ) von Dexamethason und bei Hydrocortison mit seiner geringeren glukokortikoiden Potenz konnte dieser Trend nicht eindeutig nachgewiesen werden (A-F). Surfactant und Coffein haben keinen klaren Einfluss auf den Zellzyklus (G-I).

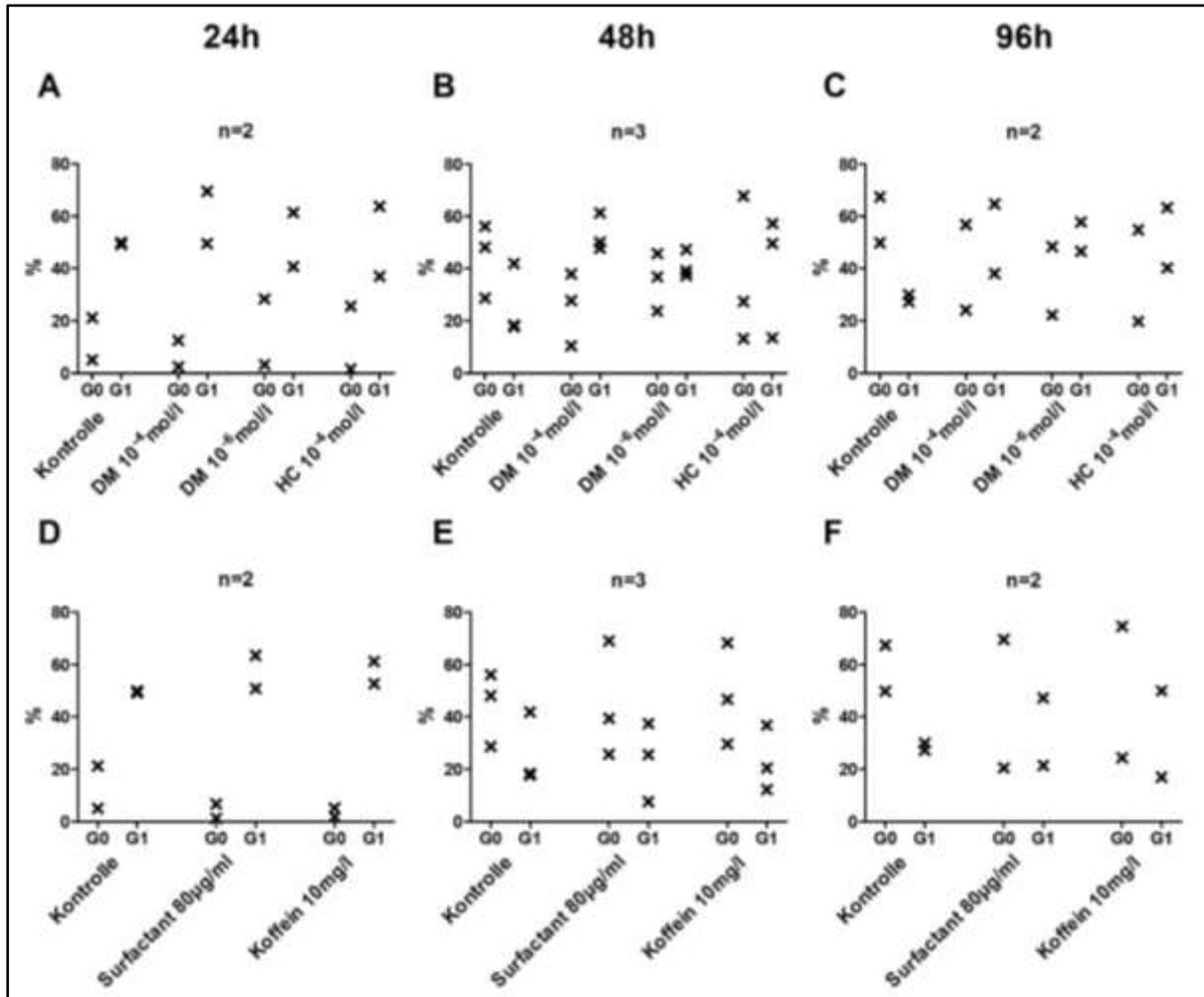


**Abbildung 4.3-1: Analyse des Einflusses verschiedener BPD-Therapeutika auf den Zellzyklus.** 24, 48 und 72 Stunden vor dem Messen (linke, mittlere und rechte Spalte) wurde das Kulturmedium der Zelllinien 55.1, 59.2, 60.1, 67.1 und 70.4 mit Dexamethason (DM,  $c=10^{-4}$  mol/l,  $c=10^{-6}$  mol/l; A-C), Hydrocortison (HC,  $c=10^{-4}$  mol/l,  $c=10^{-6}$  mol/l; D-F), Surfactant ( $c=80\mu\text{g/ml}$ ; G-I) oder Coffein ( $c=10\text{mg/l}$ ; G-I) in verschiedenen Konzentrationen versetzt. Für die Messung mittels Durchflusszytometrie wurde die DNA mit Propidiumiodid wie in Kapitel 3.2.6.1 beschrieben markiert. Wie in Abbildung 3.2-6 wurden die einzelnen Phasen des Zellzyklus bestimmt. Mit Hilfe des unpaired t-Tests wurden jeweils die behandelten mit den unstimulierten Kulturen verglichen, für  $n\leq 4$  wurde auf eine statistische Berechnung verzichtet. Mittelwert und Standardfehler wurden grafisch dargestellt. Alle getesteten Vergleiche waren nicht signifikant.

#### 4.3.2 DIFFERENZIERUNG ZWISCHEN DER G0- UND G1-PHASE UND ERMITTLUNG EINER VERSCHIEBUNG DURCH BPD-THERAPEUTIKA

Da ein Zellzyklusarrest in der G0- oder G1-Phase nachgewiesen werden konnte, wurde anschließend genauer zwischen den beiden Phasen differenziert. Dabei wurde die Expression von Cyclin D1 untersucht, welches für den Übergang der G1- in die S-

Phase notwendig ist [165]. Da es in der G0-Phase nicht exprimiert wird, jedoch in der G1-Phase, kann man wie in Kapitel 0 beschrieben zwischen den beiden Phasen unterscheiden. In Abbildung 4.3-2 wurde der Anteil MSC in der G0-Phase, dem in der G1-Phase befindlichen Anteil unter Stimulation mit Dexamethason, Hydrocortison, Surfactant und Coffein gegenübergestellt.



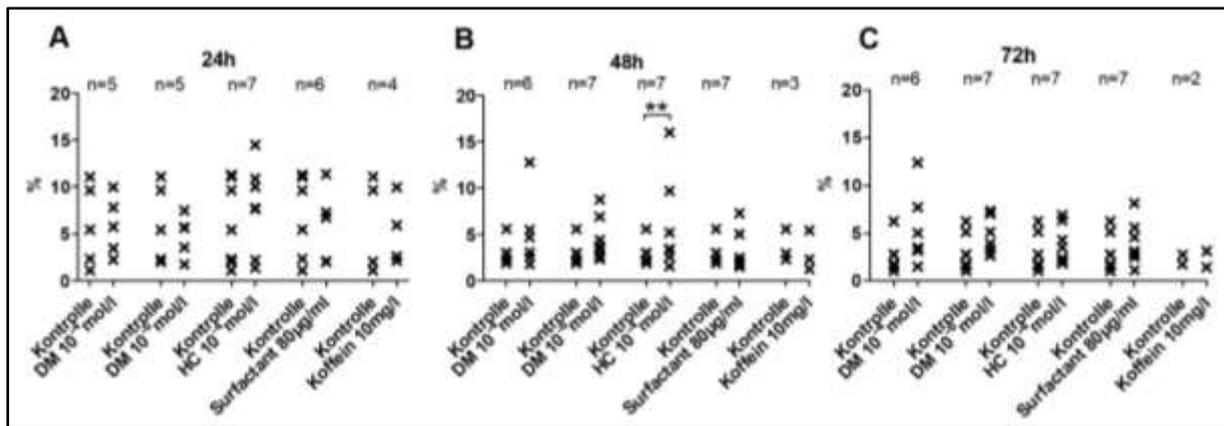
**Abbildung 4.3-2: Differenzierung zwischen der G0- und G1-Phase des Zellzyklus über Bestimmung der Expression von Cyclin D1.** 24, 48 und 72 Stunden vor dem Messen (linke, mittlere und rechte Spalte) wurde dem Kulturmedium der Zelllinien 67.1 und 70.4 Dexamethason (DM,  $c=10^{-4}$ mol/l,  $c=10^{-6}$ mol/l; A-C), Hydrocortison (HC,  $c=10^{-4}$ mol/l,  $c=10^{-6}$ mol/l; A-C), Surfactant ( $c=80\mu\text{g/ml}$ ; D-F) oder Coffein ( $c=10\text{mg/l}$ ; D-F) in verschiedenen Dosierungen zugegeben. Über einen FITC-konjugierten Antikörper wurde Cyclin D1 markiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Wie in Abbildung 3.2-7 wurde zwischen FITC-negativen Zellen, die der G0-Phase angehören sowie FITC-positiven Zellen, die der G1-Phase angehören unterschieden und der prozentuale Anteil am gesamten Zellzyklus der lebenden Zellen bestimmt. Aufgrund der niedrigen Fallzahl wurde keine statistische Berechnung durchgeführt.

Abbildung 4.3-2 zeigt, dass sich nach 24 Stunden sowohl bei den mit Steroiden behandelten MSC (A), als auch den mit Surfactant oder Coffein versetzten Kulturen (D) stets der weitaus größere Anteil in der G1-Phase befindet. Im weiteren Verlauf wechselt das Verhältnis innerhalb der Kontrollzellen, so dass nach 48 und 72 Stunden jeweils mehr Zellen in der G0-Phase sind. Bei den mit Dexamethason oder Hydrocortison stimulierten Zellen findet diese Verschiebung nicht statt, es liegt weiterhin der größere Anteil in der G1-Phase vor. Es findet demnach ein G1-Arrest unter Dexamethasontherapie statt, dieser ist bis 72h nach Stimulation als Trend nachweisbar (B, C). Bei den mit Surfactant oder Coffein stimulierten Proben bleibt der Anteil der in der G0- bzw. der G1-Phase befindlichen MSC in etwa gleich zur Kontrolle. Es findet auch hier ein Shift statt mit dem Großteil der Zellen nach 24h in der G1-Phase. Nach 48h wechselt der Hauptteil in die G0-Phase (D-F).

Es lässt sich somit ein durch die Kortikosteroide induzierter Zellzyklusarrest der MSC in der G1-Phase spätestens nach 48 Stunden nachweisen. Daraus resultiert folglich die mittels Cellscreen sowie xCELLigence ermittelte Wachstumsreduktion durch höherpotente Steroide.

### *4.3.3 UNTERSUCHUNG EINER AUSWIRKUNG VERSCHIEDENER ETABLIERTER BPD-THERAPEUTIKA AUF DIE APOPTOSE*

Zusätzlich zu einem Zellzyklusarrest musste neben einer eingeschränkten Proliferation auch eine verstärkte Apoptose der MSC in Betracht gezogen werden, da beide Mechanismen zu einer, im Vergleich zur Kontrolle, niedrigeren Zellzahl führen können. Hierbei wurde ebenfalls wie bei der Zellzyklusanalyse die Untersuchung einer Änderung des DNA-Gehalts in der Zelle zu Hilfe genommen. Im Rahmen der Apoptose wird mit Hilfe von Endonucleasen die DNA fragmentiert und abgebaut [168]. Wie in Kapitel 3.2.6.4 beschrieben, wurde über Färbung mittels Propidiumiodid der DNA-Gehalt im Durchflusszytometer bestimmt. Es wurde eine Kinetik mit 24, 48 und 72 Stunden Medikamenteneinfluss auf die MSC angefertigt. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.3-3 dargestellt.



**Abbildung 4.3-3: Ermittlung der apoptotischen MSC, die mit Steroiden, Surfactant oder Coffein behandelt wurden, im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen.** 24 (A), 48 (B) und 72 (C) Stunden vor dem Messen mittels Durchflusszytometrie wurde dem Kulturmedium der Zelllinien 55.1, 59.2, 60.1, 67.1 und 70.4 eines der BPD-Therapeutika Dexamethason (DM,  $c=10^{-4}$  mol/l,  $c=10^{-6}$  mol/l), Hydrocortison (HC,  $c=10^{-4}$  mol/l,  $c=10^{-6}$  mol/l), Surfactant ( $c=80$  µg/ml) oder Coffein ( $c=10$  mg/l) zugefügt. Über den Gehalt an Propidiumiodid je Zelle kann, wie in Kapitel 3.2.6.4 beschrieben, die Apoptoserate bestimmt werden. Dargestellt ist der Anteil in Prozent der apoptotischen Zellen an allen gemessenen Zellen als Mittelwert mit Standardfehler. Es wurden jeweils mit Hilfe des unpaired t-Tests die stimulierten Kulturen mit der Kontrolle verglichen. Alle signifikanten Unterschiede wurden markiert, sonst nicht signifikant. (\*\* $p<0,01$ )

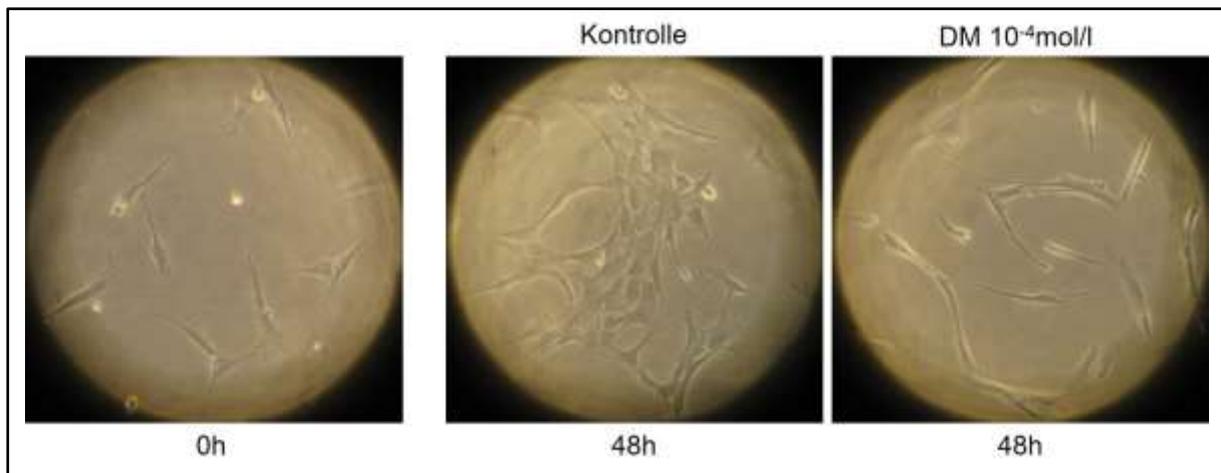
Nach 48 und 72 Stunden (siehe Abbildung 4.3-3, B und C) ist bei den mit Kortikosteroiden stimulierten Zellen ein leicht erhöhter Anteil apoptotischer MSC im Vergleich zur Kontrolle zu verzeichnen. Eine Signifikanz ist jedoch nur für Hydrocortison nach 48h nachweisbar (B).

Zusammenfassend liegt als Ursache der geringeren Zellzahl bzw. der Wachstumshemmung der mit Steroiden therapierten MSC im Vergleich zu den unstimulierten Zellen sowohl ein Arrest des Zellzyklus in der G1-Phase als auch eine Induktion der Apoptose vor. Insbesondere durch Steroide mit höherer glukokortikoider Potenz werden diese Effekte hervorgerufen. Surfactant und Coffein nehmen keinen eindeutigen Einfluss auf Zellzyklus und Apoptose.

## 4.4 EINFLUSS DER KORTIKOSTEROIDE AUF MORPHOLOGIE UND DIFFERENZIERUNG

### 4.4.1 LICHTMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG DER ÄUßEREN ZELLFORM

MSC sind adhärente spindelförmige Zellen. Um zu überprüfen ob sich die äußere Form durch Stimulation mit Dexamethason ändert, wurden unter dem Lichtmikroskop die Zellen 24 Stunden nach dem Aussähen, als sie gut adhäriert waren, mit ihrer Morphologie weitere 48 Stunden später verglichen (Abbildung 4.4-1).



**Abbildung 4.4-1: Lichtmikroskopischer Vergleich der äußeren Zellform der MSC.** 24h nach dem Aussähen (dargestellt Zelllinie 70.4) wurde ein repräsentativer Ausschnitt eines Wells über ein Lichtmikroskop fotografiert (Zeitpunkt 0h). Direkt im Anschluss wurde zu einem Teil der Wells Dexamethason ( $c=10^{-4}$  mol/l) zugegeben. Weitere 48h später wurde erneut jeweils ein repräsentativer Ausschnitt der stimulierten sowie der Kontrollzellen dokumentiert (Zeitpunkt 48h).

Es konnten keine äußerlichen Veränderungen der Zellform festgestellt werden (siehe Abbildung 4.4-1). Die anfangs meist einzelnstehenden Zellen waren nach 48 Stunden aufgrund mehrfacher Zellteilung zumindest in der Kontrollgruppe größtenteils konfluert und zum Teil verzweigt. Die mit Steroiden behandelten Zellen wirkten etwas länger und schmaler, dies ist jedoch mit bloßem Auge schwer zu beurteilen und kann auch in Folge von Migration entstanden sein.

Aufgrund fehlender mikroskopisch sichtbarer Veränderungen, wurden die MSC bezüglich ihrer Morphologie und Differenzierung auf molekularer Ebene analysiert. Dabei wurden Oberflächenmarker und einige Strukturproteine mittels Immunfluoreszenz und Westernblot untersucht.

#### 4.4.2 UNTERSUCHUNG VON OBERFLÄCHENMARKERN MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE

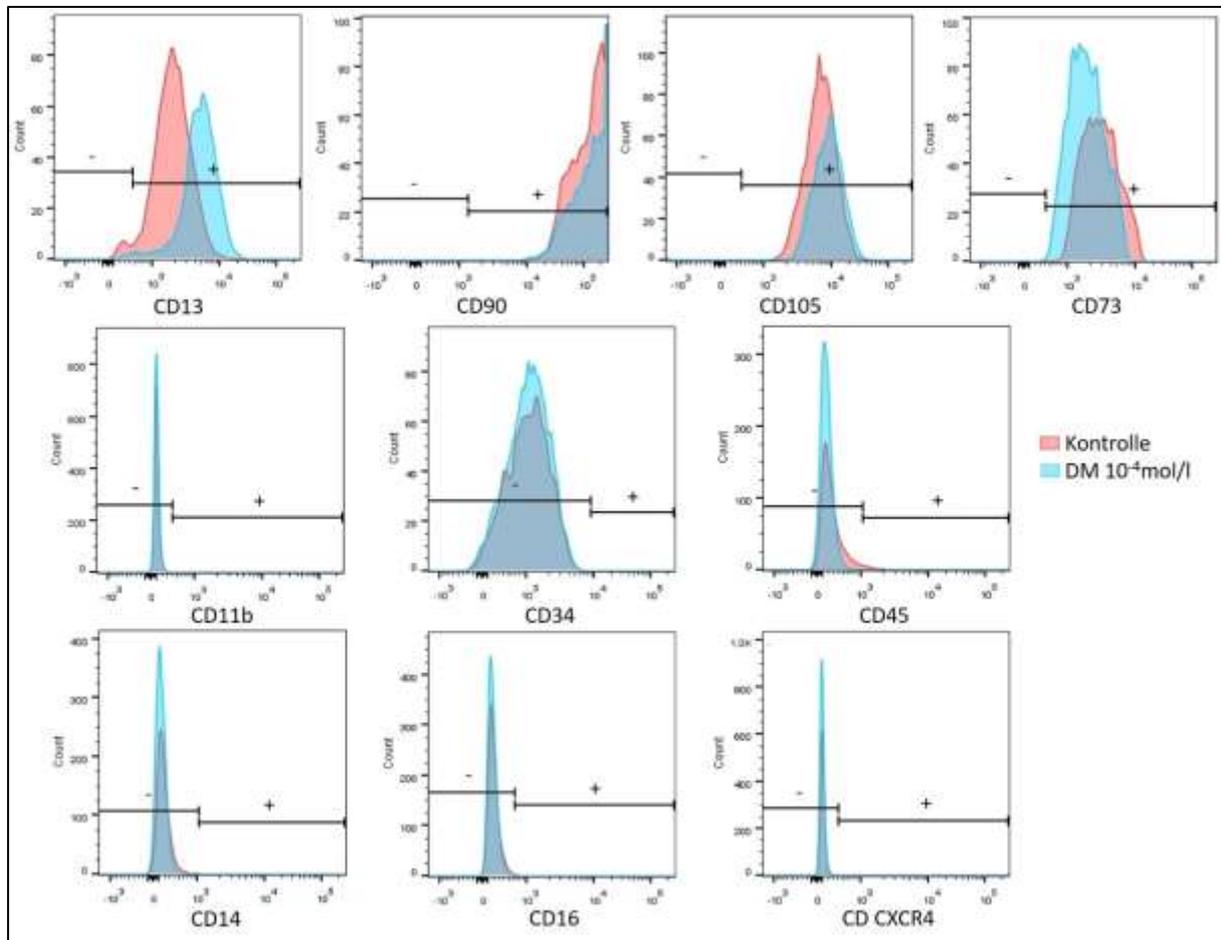
Bisher ist noch nicht gesichert in welchem Umfang die für die Experimente dieser Arbeit verwendeten Zellen zur Entstehung des Remodelling der Lunge bei Frühgeborenen beitragen und in welchem Maße der Einfluss anderer Entzündungszellen oder auch eine weitere Differenzierung der MSC eine Rolle spielt. Den fibroblastenähnlichen Zellen aus dem Trachealsekret von Frühgeborenen wurden auch Eigenschaften und das Differenzierungspotenzial von mesenchymalen Stammzellen zuerkannt (s. Kapitel 1.2.4.2) [112]. Es ist folglich nicht auszuschließen, ob die Stimulierung mit Dexamethason oder auch anderer Kortikosteroide eine weitere Ausdifferenzierung bewirkt. Hierzu wurde die Ausprägung einiger Oberflächenmarker, die MSC von Fibrozyten, Monozyten und Makrophagen unterscheiden, untersucht. Verglichen wurde die Expression der mit Steroiden stimulierten Zellen gegenüber unbehandelten Kontroll-MSCs.

**Tabelle 4.4-1: Eigenschaften von MSC im Vergleich zu Fibrozyten, Monozyten und Makrophagen, Vergleich der Oberflächenmarker von Kontroll-MSCs (Ko) und mit Dexamethason stimulierten Zellen (DM) [33, 112, 169, 170]**

	MSC	Fibrozyt	Monozyt	Makrophage	Ko	DM	Erläuterung
CD 13	+	+	+	+	+	+	Oberflächenenzym
CD 90	+	-	-	-	+	+	Marker hämatopoet. Vorläuferzellen, MSC
CD 105	+	+	-	+	+	+	Mesenchymaler Stammzellmarker
CD 73	+				+	+	Mesenchymaler Stammzellmarker
CD 11b	-	+	+	+	-	-	Adhäsion und Motilität, Makrophagenmarker
CD 34	-	+/-	-	+/-	-	-	Adhäsion und Motilität. hämatopoet. Stammzellantigen
CD 45	-	+	+	+	-	-	Oberflächenenzym, Leukozytenmarker
CD 14	-	-	+	+/-	-	-	Scavenger Rezeptor, Immunabwehr
CD 16	-	+	+/-	+	-	-	Fcγ Rezeptor
CXCR4	-	+	+	+	-	-	Chemokin Rezeptor

Die Expression der Oberflächenmarker der MSC, die mit Dexamethason stimuliert wurden, zeigt sich im Vergleich zur Kontrolle unverändert (siehe Abbildung 4.4-2). Die Graphen der stimulierten und der unbehandelten Zellen decken sich annähernd bei allen untersuchten Markern. Sie liegen entweder vollständig im negativen oder im positiven Bereich. Die untersuchten Zellen, mit sowie ohne Medikamenteneinfluss,

sind somit positiv für CD13, CD90, CD105 und CD73 und negativ für CD11b, CD34, CD45, CD14, CD16 und CD CXCR4. Diese Eigenschaften entsprechen denen der MSC (siehe Tabelle 4.4-1). Es findet folglich durch den Einfluss von Kortikosteroiden keine Differenzierung zu Fibrozyten, Makrophagen oder anderen Zellformen statt.



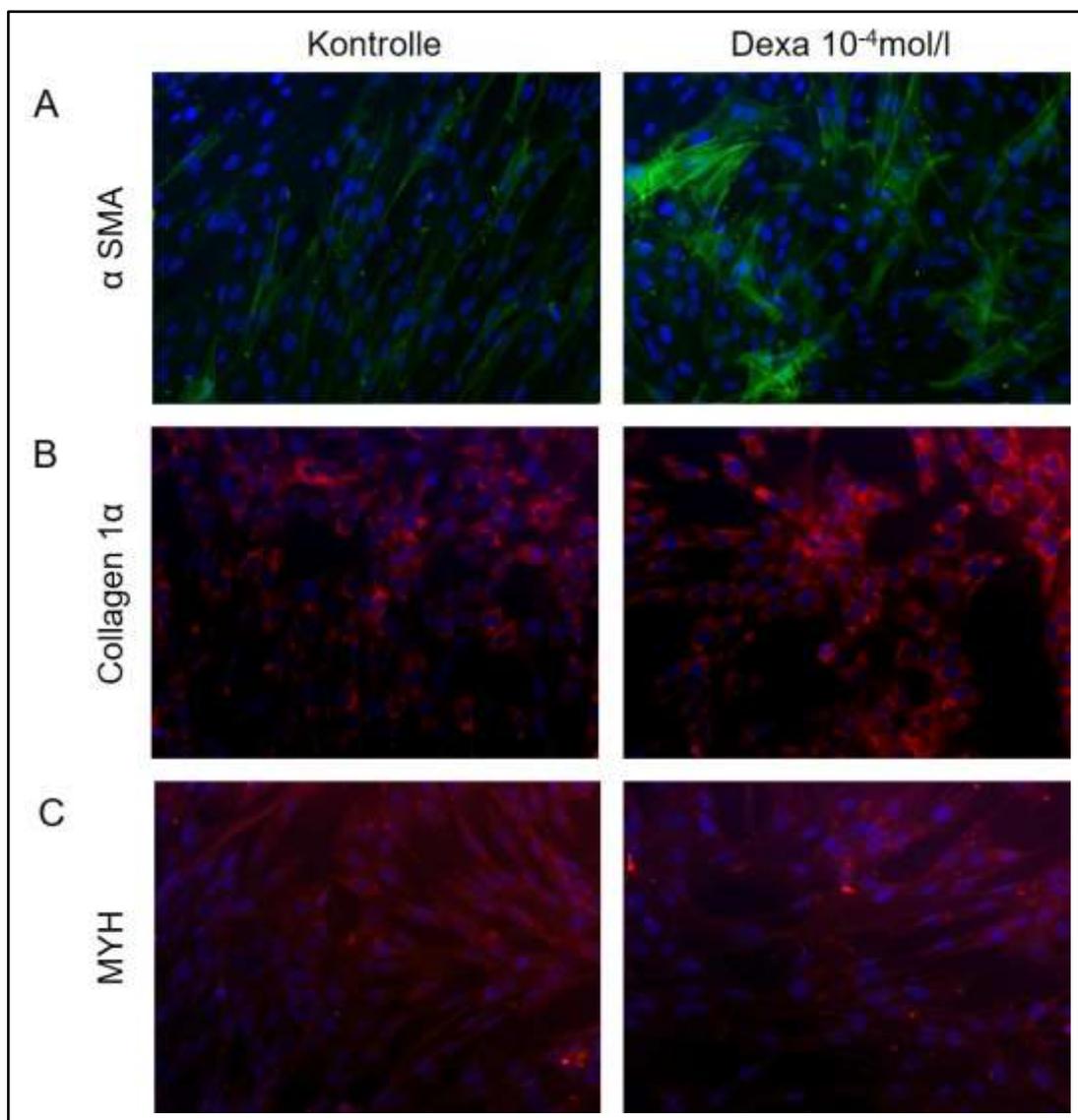
**Abbildung 4.4-2: Einfluss von Dexamethason auf die Zelldifferenzierung.** Die MSC (dargestellt Zelllinie 55.1) wurden 72 Stunden mit Dexamethason inkubiert, anschließend wurden verschiedene Oberflächenmarker gefärbt. Mittels Durchflusszytometrie wurde der Anteil positiver und negativer Marker bestimmt. In den dargestellten Histogrammen ist bei den Zellen im linken markierten Bereich der Oberflächenmarker nicht vorhanden, rechts vorhanden.

### 4.4.3 ANALYSE VERSCHIEDENER STRUKTURPROTEINE MITTELS IMMUNFLUORESCENZ UND WESTERNBLOT

Durch die Inflamationsreaktion der Lunge werden MSC rekrutiert. Verschiedene Zytokine, speziell TGF- $\beta$ 1 leiten eine Differenzierung zu Myofibroblasten ein. Diese sind durch einen höheren  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA)-Anteil gekennzeichnet, exprimieren aber kein myosine heavy chain (MYH). Zudem produzieren Fibroblasten

und Myofibroblasten einen Großteil der extrazellulären Matrix, insbesondere Kollagen vom Typ 1 [33, 34, 171-173].

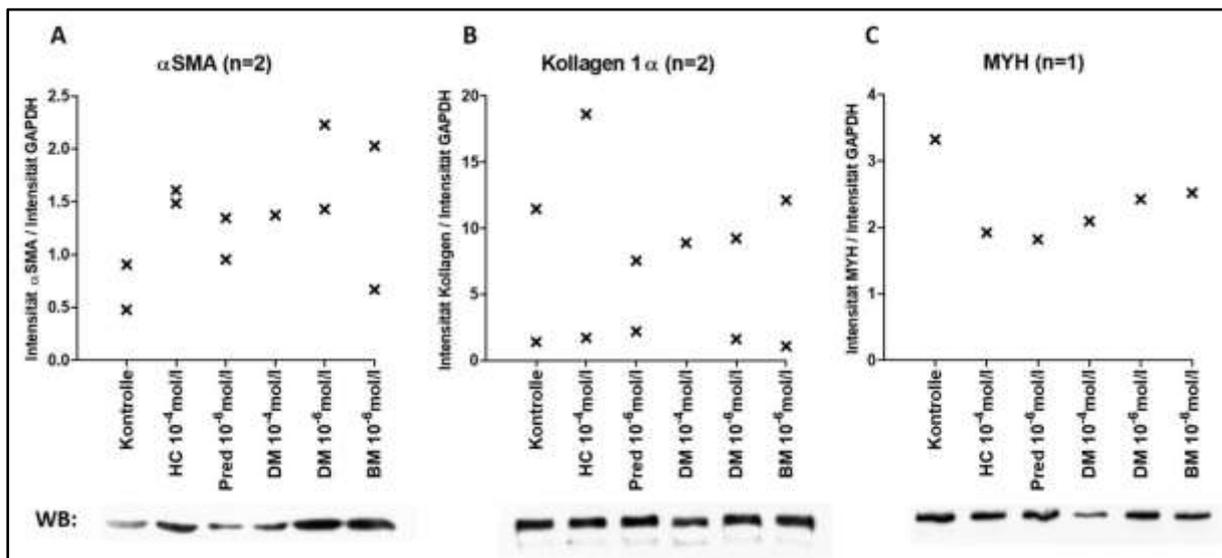
Um den Einfluss der Steroide auf den Differenzierungsgrad von MSC zu Myofibroblasten sowie eine Änderung der Produktion extrazellulärer Matrix näher zu bestimmen, wurden die Strukturproteine  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA), Kollagen-1 $\alpha$  und myosine heavy chain (MYH) mittels Immunfluoreszenz untersucht. Parallel wurden bei den gleichen Zelllinien die Proteine mit Hilfe von Westernblots analysiert und quantifiziert. Dadurch konnten sowohl die Proteinmenge als auch die Verteilung und Struktur innerhalb der MSC ermittelt werden.



**Abbildung 4.4-3: Immunfluoreszenzfärbung verschiedener Strukturproteine im Vergleich stimulierter und unstimulierter MSC.** Die Zellen wurden für 72 Stunden mit verschiedenen Steroiden inkubiert. Anschließend wurde  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA; A), Kollagen-1 $\alpha$  (B) sowie myosine heavy chain (MYH; C) mit Antikörpern markiert und mit Hilfe eines Immunfluoreszenzmikroskops unter jeweils gleicher Vergrößerung und Belichtungszeit

dokumentiert. Die mit Dapi gefärbten Zellkerne erscheinen in den Abbildungen blau. Hier ist exemplarisch der Vergleich von mit Dexamethason ( $c=10^{-4}$  mol/l) behandelten Zellen (rechte Spalte) zur unstimulierten Kontrolle (linke Spalte) der Zelllinie 60.1 dargestellt.

Mittels Immunfluoreszenzfärbung konnte wiederholt eine vermehrte Expression einzelner Zellen an  $\alpha$ SMA unter Dexamethasonstimulation festgestellt werden (siehe Abbildung 4.4-3, A). Zudem befinden sich die Filamente nicht mehr alle in annähernd paralleler Ausrichtung, sondern sind teilweise überkreuzt angeordnet. Bei Kollagen-1 $\alpha$  (B) wurden keine Unterschiede zwischen den mit Steroiden stimulierten und den unbehandelten Kontroll-MSC dokumentiert. Bei myosine heavy chain (C) ist eine Verminderung der Expression nicht sicher auszuschließen. Die mit Dexamethason behandelten MSC zeigen in Abbildung 4.4-3 C eine geringere Rotfärbung und somit einen niedrigeren Gehalt an myosine heavy chain als die Kontrollzellen. Dies konnte jedoch nicht eindeutig in wiederholten Experimenten bestätigt werden.



**Abbildung 4.4-4: Analyse der Expression verschiedener Strukturproteine im Westernblot (WB).** Nach 72-stündiger Inkubation der Zelllinie 59.2 mit den Steroiden Hydrocortison (HC,  $c=10^{-4}$  mol/l), Prednisolon (Pred,  $c=10^{-6}$  mol/l), Dexamethason (DM,  $c=10^{-4}$  mol/l,  $c=10^{-6}$  mol/l) und Betamethason (BM,  $c=10^{-6}$  mol/l) wurden die Proteine  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA; A), Kollagen-1 $\alpha$  (B) sowie myosine heavy chain (MYH; C) mittels Westernblot nachgewiesen. Über die AIDA Image Analyser Software wurden die Banden quantifiziert und in Relation zur Ladekontrolle (GAPDH) gesetzt. Aufgrund der geringen Fallzahl wurde keine statistische Berechnung durchgeführt.

Zeitgleich zu den Immunfluoreszenzexperimenten wurden die Strukturproteine unter den gleichen Bedingungen mit Hilfe von Westernblots analysiert. Dabei ließ sich bei keinem der Proteine ein deutlicher Unterschied zwischen mit Steroiden behandelten

und unstimulierten Zellen nachweisen (siehe Abbildung 4.4-4). In Diagramm A sind die Banden im Westernblot der  $\alpha$ SMA-Färbung von den mit Steroiden stimulierten MSC stärker, als die der Kontrollgruppe. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Ergebnissen aus der Immunfluoreszenzfärbung, welche eine Vermehrung des  $\alpha$ SMA-Gehalts einzelner MSC zeigt (siehe Abbildung 4.4-3). Da jedoch nicht alle Zellen betroffen zu sein scheinen, ist die Änderung des Proteingehalts mittels Westernblot nur als Trend sichtbar. Kollagen-1 $\alpha$  (Diagramm B) zeigt keine Unterschiede bezüglich der Proteinmenge zwischen den einzelnen Gruppen. Bei myosine heavy chain (Diagramm C) ist ebenso wie bei der Analyse mittels Immunfluoreszenz eine verminderte Expression nach Behandlung der MSC mit verschiedenen Steroiden sichtbar, aber aufgrund zu niedriger Versuchszahlen nicht statistisch auswertbar.

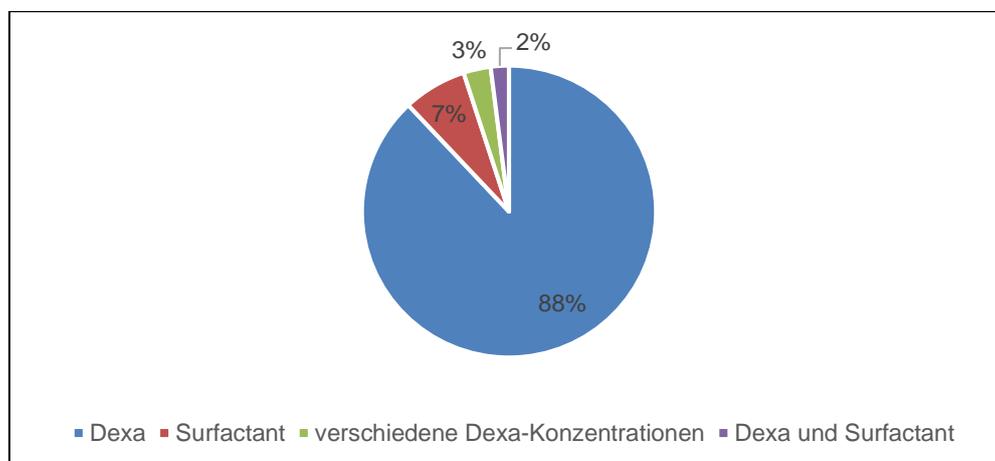
In Zusammenschau der Ergebnisse lässt die erhöhte  $\alpha$ SMA-Expression bei erniedrigtem MYH-Gehalt eine Differenzierung einzelner MSC zu Myofibroblasten durch Kortikosteroide vermuten. Auf die Kollagenbildung scheinen die Steroide keinen Einfluss zu nehmen.

### 4.5 UNTERSUCHUNG REGULIERTER INTRAZELLULÄRER SIGNALWEGE

Hierbei wurden mittels Microarray-Technologie (*Dr. Melanie Markmann und Dr. Hamid Hossain, Institut für Mikrobiologie, JLU Gießen*) die mRNAs aus vier Zelllinien (67.1, 68.3, 69.1 und 70.4) unter Stimulation von Dexamethason ( $c=10^{-4}$ mol/l,  $c=10^{-6}$ mol/l) oder Surfactant ( $c=80\mu\text{g/ml}$ ) mit der jeweils unbehandelten Kontrollgruppe verglichen.

#### 4.5.1 STATISTISCHE ANALYSE

Die mRNA-Analyse ergab im Vergleich der mit Surfactant oder Dexamethason behandelten Zellen zur unbehandelten Kontrolle 204 regulierte Gene (sowohl hoch- als auch runterreguliert). Davon waren 88% allein durch Dexamethason hervorgerufen worden, 7% durch Surfactant, 3% durch die jeweils unterschiedlichen Dexamethasonkonzentrationen und 2% sowohl durch Surfactant als auch durch Dexamethason (Abbildung 4.5-1).

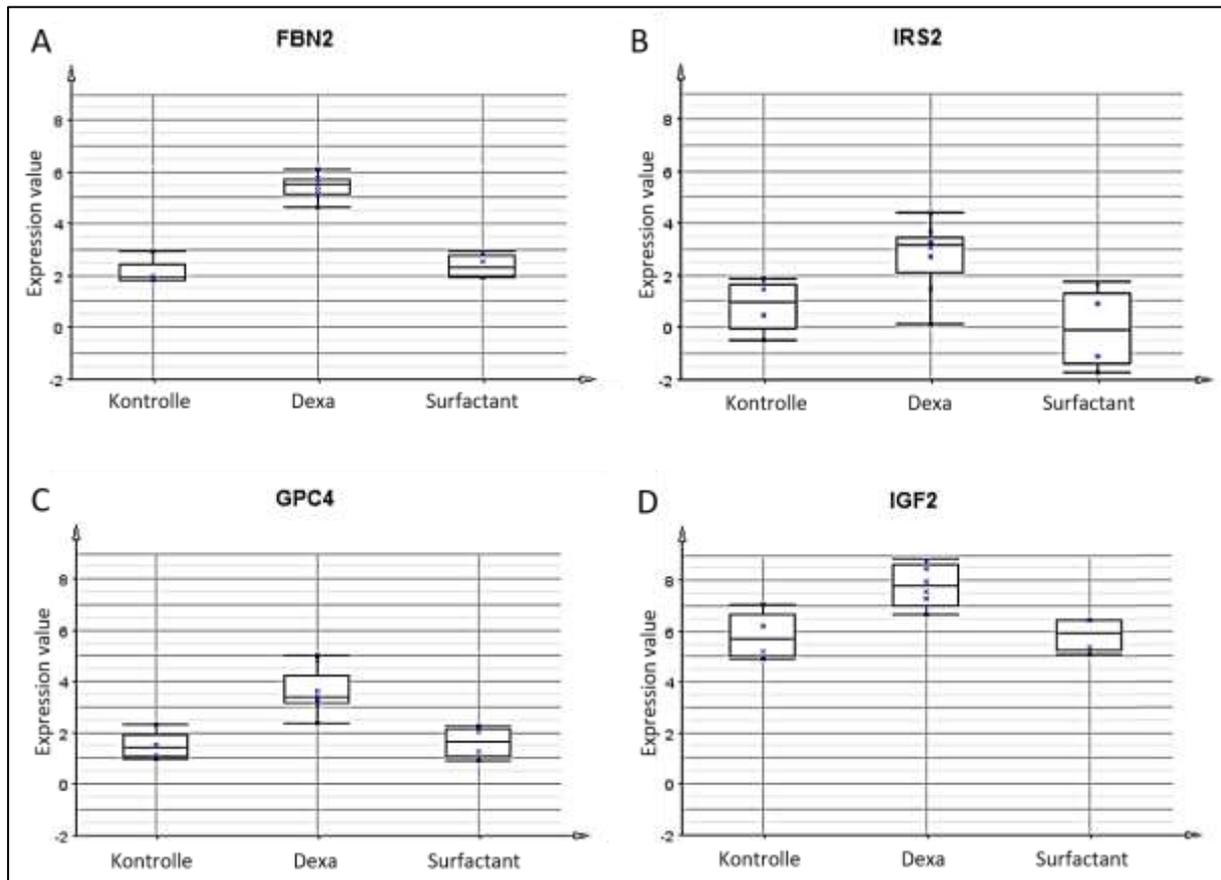


**Abbildung 4.5-1: Anteil der durch die Medikamente (Surfactant, Dexamethason) regulierten Gene an allen ermittelten regulierten Genen.** (*Dr. Melanie Markmann und Dr. Hamid Hossain, Institut für Mikrobiologie, JLU Gießen*)

Der Einfluss von Surfactant auf die Genexpression ist sehr gering im Vergleich zu Dexamethason. Bei Dexamethason spielt hingegen die Konzentration des zugeführten Medikaments eine untergeordnete Rolle. In der weiter differenzierten Analyse zeigte sich, dass es keine signifikanten Unterschiede durch die hohe (DM  $10^{-4}$  mol/l) im

Vergleich zur niedrigeren (DM  $10^{-6}$  mol/l) Dexamethasonkonzentration in Bezug auf die Veränderungen der Gene gibt.

Als am stärksten durch Dexamethason regulierte Gene stellten sich Fibrillin 2 (FBN2), Insulin Receptor Substrate 2 (IRS2), Glypican 4 (GPC4) und Insulin-like Growth Factor 2 (IGF-2) heraus (siehe Abbildung 4.5-2). Am ausgeprägtesten zeigte sich der Effekt bei Fibrillin 2, es wurde unter DM  $10^{-4}$  mol/l 8,5-fach und unter DM  $10^{-6}$  mol/l 11,2-fach im Vergleich zur Kontrolle hochreguliert.

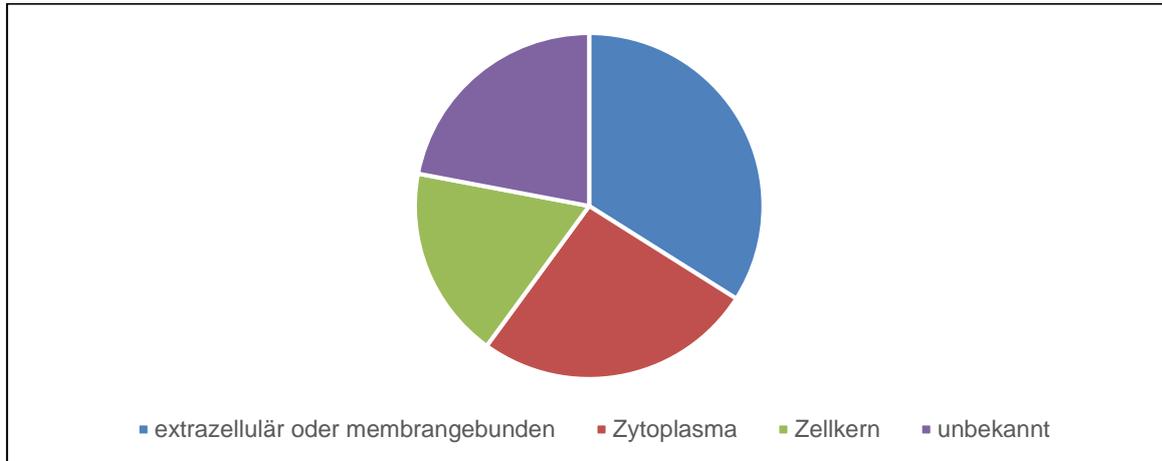


**Abbildung 4.5-2: Vergleich der vier am stärksten regulierten Gene nach Micro-Array-Analyse von mit Dexamethason ( $c=10^{-4}$  mol/l und  $c=10^{-6}$  mol/l) oder Surfactant (80  $\mu$ g/ml) behandelten MSC zur unbehandelten Kontrolle: Fibrillin 2 (FBN2), Insulin Receptor Substrate 2 (IRS2), Glypican 4 (GPC4), Insulin-like Growth Factor 2 (IGF-2). (Dr. Melanie Markmann und Dr. Hamid Hossain, Institut für Mikrobiologie, JLU Gießen)**

### 4.5.2 ANALYSE DER GENFUNKTIONEN

Von 140 der regulierten Gene ist die Lokalisation des exprimierten Proteins bekannt. Davon befinden sich 42% extrazellulär oder membrangebunden bzw. in der

Plasmamembran der Zellen. 34% der Proteine verbleiben im Zytoplasma und 24% sind im Zellkern lokalisiert (Abbildung 4.5-3).



**Abbildung 4.5-3: Lokalisation der durch die regulierten Gene exprimierten Proteine.** (Dr. Melanie Markmann und Dr. Hamid Hossain, Institut für Mikrobiologie, JLU Gießen)

Die regulierten Gene können einer ganzen Reihe verschiedener Zellfunktionen zugeordnet werden, darunter unter anderem der Regulierung der Zellmorphologie, der Zelladhäsion, der Apoptose oder der Expression von Wachstumsfaktoren (Abbildung 4.5-4).

IMMUNE	SIGNALING	DEVELOPMENT	ADHESION	Index	n	
		+	+	A	2	4%
+		+	+	B	4	8%
	+	+	+	C	4	7%
			+	D	18	33%
						} Adhäsion 52%
		+		E	12	
+		+		F	1	2%
+				G	5	9%
+	+	+		H	1	2%
	+			I	1	2%
only Apoptosis						
				J	6	11%

**Abbildung 4.5-4: Übersicht der wichtigsten Funktionen der regulierten Gene.** An der Adhäsion sind 52% der Gene beteiligt, an der Apoptose im Vergleich nur 11%. (Dr. Melanie Markmann und Dr. Hamid Hossain, Institut für Mikrobiologie, JLU Gießen)

Zelldifferenzierung und Adhäsion nehmen hierbei den größten Anteil ein. Bei genauerer Genanalyse zeigte sich, dass einige dieser Gene (z.B. NID2, FGF6, CDH6

[102, 174, 175]) für die Bildung und Umstrukturierung von Lungengewebe verantwortlich sind. Zudem kodiert auch ein großer Teil der regulierten Gene für Wachstumsfaktoren und zellmembranständige Proteine. Die Apoptose wird nur von sehr wenigen der regulierten Gene beeinflusst. Betrachtet man die einzelnen Gene, ist nicht eindeutig daraus zu schließen, ob aus der Behandlung mit Dexamethason eine Aktivierung oder Minderung der Zelladhäsion der MSC resultiert, da in beiden Bereichen Gene reguliert werden.

### 4.5.3 UPSTREAM REGULATION

Des Weiteren wurde untersucht welche Gene/ Proteine als Regulatoren für die Endproteine in Frage kommen. Hierbei wurden im Rahmen der BPD sowie der Lungenentwicklung folgende Faktoren besonders hervorgehoben:

- C/EBP $\beta$  - CCAAT/enhancer-binding protein  $\beta$  (*Activation Score: 2,43*)
- CTGF - Connective Tissue Growth Factor (*Activation Score: 1,98*)
- IGF-Signaling und Wachstumshormone: IGF-1 (*Activation Score: -2,29*); IGF-2, IRS2 und IGFBP4 werden jedoch hochreguliert
- TNF – Tumor Necrosis Factor (*Activation Score: -1,95*)



**Abbildung 4.5-5: Veranschaulichung der Activation Scores interessanter Regulatoren der Endproteine in den MSC: C/EBP $\beta$  (2,43), CTGF (1,98), IGF-1 (-2,29), TNF (-1,95).**

## 5 DISKUSSION

Bei der Versorgung von extremen Frühgeborenen spielen Kortikosteroide, insbesondere Dexamethason, sowohl zur Prophylaxe pränatal als auch zur Therapie der BPD eine entscheidende Rolle. Sie vermindern die Rate an Reintubationen nach Extubationsversuchen und verbessern wesentlich das pulmonale Outcome [151]. Der Mechanismus, der für die deutlich bessere Lungenfunktion nach Steroidtherapie verantwortlich ist, konnte noch nicht genau nachgewiesen werden. Es wird allgemein eine Verminderung der pulmonalen Inflammationsreaktion in Verbindung mit einer verringerten Permeabilität der kleinen Lungengefäße diskutiert [176]. Jedoch bringt die Behandlung auch Nebenwirkungen mit sich. Zu nennen wären insbesondere Hyperglykämien und Blutdruckschwankungen während der Therapie, sowie das erhöhte Risiko von nekrotisierenden Enterokolitiden bei Frühgeborenen. Als Langzeitfolge zeigte sich ein schlechteres neurologisches Outcome im Vergleich zu gleichaltrigen Kindern [151].

In der Pathogenese der bronchopulmonalen Dysplasie spielen neben den MSC noch zahlreiche andere Zellen, wie z.B. Makrophagen und Neutrophile eine wichtige Rolle. In den Experimenten dieser Arbeit beschränkte man sich auf die MSC, da diesen nach neueren Studien eine sehr bedeutende Rolle zugesprochen wird [33, 34]. Es wurde die Wirkung von verschiedenen Kortikosteroiden, insbesondere Dexamethason, sowie von Surfactant, Coffein und Vitamin A als ebenfalls wichtige und nachgewiesenermaßen präventive Therapeutika der BPD [176], auf MSC von extremen Frühgeborenen untersucht. Ziel war die Identifizierung einer Signalkaskade, welche mittels einer selektiven und nebenwirkungsärmeren Therapie so moduliert werden kann, dass der durch die Entzündungsreaktion veränderte Phänotyp der MSC zum ursprünglichen Zellformat zurückverwandelt werden kann, um eine normale Lungenentwicklung zu gewährleisten.

Das Augenmerk lag auf der Beeinflussung des Wachstums, des Zellzyklus und der Differenzierung sowie der Ermittlung eines Signalwegs als wichtigsten Vermittler der protektiven Wirkung. Hierbei konnte eine durch einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase verursachte Wachstumshemmung sowie eine gesteigerte Apoptoserate durch die Kortikosteroide ermittelt werden. In diesem Zusammenhang stellten sich auch einige interessante Kandidaten in der Signalwegs-Identifizierung dar, die sich als Target einer

modulierenden Therapie anbieten würden. Hierzu sollten insbesondere Fibrillin 2, IGF-1/2, C/EBP $\beta$ , CTGF und TNF genauer diskutiert werden. Surfactant, Vitamin A und Coffein haben keinen nennenswerten Einfluss auf Wachstum und Phänotyp der MSC gezeigt.

## 5.1 EINFLUSS VERSCHIEDENER BDP-THERAPEUTIKA AUF WACHSTUM, ZELLYKLUS UND DIFFERENZIERUNG DER MESENCHYMALEN STROMAZELLEN VON EXTREMEN FRÜHGEBORENEN

### 5.1.1 WIRKUNG VON KORTIKOSTEROIDEN INSBESONDERE DEXAMETHASON

#### 5.1.1.1 Wachstum, Zellzyklus und Apoptose

Bei den Wachstumsanalysen zeigte sich bei allen Zelllinien eine Reduktion des Zellwachstums der MSC unter dem Einfluss von Kortikosteroiden. Diese war jedoch nur unter dem Einfluss des Medikaments mit hoher glukokortikoider Potenz, Dexamethason, in zudem hoher Dosierung ( $10^{-4}$  mol/l) signifikant nachweisbar ( $p < 0,01$ ). Für die niedrigeren getesteten Dexamethasonkonzentrationen ( $10^{-6}$  mol/l,  $10^{-8}$  mol/l) zeichnete sich lediglich ein Trend ab. Eine Vergleichsmessung mit einer Alternativen Methode (xCELLigence) führte hierbei zum gleichen Ergebnis. Aufgrund des hohen Versuchsaufwandes mit nur geringer Anzahl Wells beschränkte sich der Hauptteil weiterer Untersuchungen auf Dexamethason.

Ursächlich für die Proliferationshemmung der MSC ließ sich im Rahmen der weiteren Differenzierung der Wachstumshemmung ein durch die Kortikosteroide induzierter Zellzyklusarrest in der G1-Phase spätestens nach 48 Stunden nachweisen (DM  $10^{-4}$  mol/l,  $p < 0,05$ ). Des Weiteren zeigte sich unter Dexamethason ( $10^{-4}$  mol/l,  $10^{-6}$  mol/l) eine nach 72 Stunden signifikant erhöhte Apoptoserate ( $p < 0,05$ ).

Bisher gibt es noch keine vergleichbaren Studien über den Einfluss auf das Wachstumsverhalten von Kortikosteroiden auf die MSC von Frühgeborenen. Es konnte aber bereits eine konzentrationsabhängige Wachstumshemmung von Lungenfibroblasten durch Kortikosteroide nachgewiesen werden [177, 178]. Im Allgemeinen ist die Datenlage zum Einfluss von Kortikosteroiden auf die Proliferation von Fibroblasten noch etwas unklar. Es gibt in der Literatur neben der Wachstumshemmung auch Daten über eine wachstumsfördernde Wirkung von Fibroblasten. Jedoch scheint es einen Unterschied zu machen ob, die Zellen von gesunden oder lungenkranken Probanden stammen und ob es sich um Zellen von Kindern bzw. Mäusen mit noch unreifer Lunge oder um erwachsene Menschen handelt. Die Vermutungen legen nahe, dass ein zuvor stattgehabter Einfluss durch Zytokine im Rahmen einer Inflammationsreaktion die Rezeptoren der Fibroblasten und somit die Wirkung der Kortikosteroide auf die Zellen verändert [179-181].

Bisherige Studien weisen darauf hin, dass im Zellzyklus der Übergang aus der G1- in die S-Phase ein wichtiger Kontrollpunkt der Regulation des weiteren Wachstums und der Apoptose ist [182]. In Fibroblasten-Kulturen wurde bereits nachgewiesen, dass Glukokortikoide einen G1-Arrest herbeiführen und dadurch auch die Apoptoserate ansteigt [183]. Bei Zellen der glatten Muskulatur aus dem Bereich der Atemwege konnte ebenfalls ein G1-Arrest durch Glukokortikoide erzielt werden [184]. Bei Makrophagen im Mausmodell wurden ebenso diese Beobachtungen gemacht, auch hier konnte ein durch Glukokortikoide ausgelöster Zellzyklusarrest mit darauffolgender Apoptose nachgewiesen werden [185].

All diese bisherigen Daten bestätigen die Vermutung, dass die Reduktion der MSC durch eine Proliferationshemmung mit Zellzyklusarrest in der G1-Phase sowie eine Minderung der Zellzahl durch Apoptose herbeigeführt wird. Es liegt nahe, dass nicht alle Zellen, die in der G1-Phase arretiert sind in dieser Phase verbleiben, sondern je nach Dauer des wirksamen Medikamentenspiegels in die nächste Phase übergehen oder ein Teil auch in den programmierten Zelltod eingeleitet wird.

### ***5.1.1.2 Morphologie und Differenzierung unter dem Einfluss von Dexamethason***

Für die BPD-Entstehung sowie auch bei der Pathogenese anderer Lungenerkrankungen wie Asthma bronchiale, spielen Umstrukturierungen, wie die gesteigerte Kollagenbildung sowie die Differenzierung von MSC zu Myofibroblasten eine relevante Rolle [34]. Während die Untersuchung der Oberflächenmarker der MSC keine Änderung durch die Behandlung mit Dexamethason ergab, schienen bei der Analyse verschiedener Strukturproteine einzelner Zellen vermehrt  $\alpha$ SMA zu exprimieren.  $\alpha$ SMA gilt hierbei als Marker für die Differenzierung zu Myofibroblasten [186]. Die quantitativen Analysen der Strukturproteine Collagen 1 $\alpha$ , MYH und insbesondere auch  $\alpha$ SMA ergaben jedoch keine signifikanten Änderungen. Es liegt nahe, dass nur einzelne MSC durch den Einfluss von Dexamethason ihren Phänotyp ändern und sich in Myofibroblasten umwandeln. Die Änderung der untersuchten Proteinexpressionen ist aufgrund dessen zu gering, um mittels Westernblot als signifikant nachgewiesen werden zu können. Eine Differenzierung zu Fibrozyten oder Makrophagen findet durch die Kortikosteroide nicht statt.

In bisherigen Studien konnte in Bezug auf MSC der gleiche Effekt nachgewiesen werden. Die durch TGF- $\beta$ 1 induzierte Differenzierung von fetalen MSC zu Myofibroblasten wird durch Dexamethason verstärkt, die Kollagenproduktion hingegen nicht. Dexamethason hat keinen Einfluss auf morphologische Veränderungen der Zellen [187, 188].

Im Gegensatz dazu gibt es Studien, die auf das Gegenteil hindeuten, nämlich eine Hemmung der durch TGF- $\beta$ 1 induzierten Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten [189, 190]. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz ist, dass nicht alle Fibroblasten morphologisch gleich sind und sich beispielsweise je nach Einfluss durch eine Inflammationsreaktion des Gewebes in den Rezeptoren unterscheiden. Zudem liegt nahe, dass es verschiedene Untergruppen gibt, die zum Teil auch unterschiedlich auf Dexamethason reagieren können. Außerdem scheint die Proliferationshemmung der MSC die entscheidendere durch Kortikosteroide vermittelte Wirkung bei der BPD-Therapie zu sein. Die Differenzierung zu Myofibroblasten unter Kortisoneinfluss ist insgesamt gesehen eher zu vernachlässigen.

### *5.1.2 WIRKUNG VON SURFACTANT*

Bei den Wachstumsanalysen unter dem Einfluss von Surfactant auf die MSC zeigte sich in hoher Dosierung (80 $\mu$ g/ml) eine Abnahme des Zellwachstums im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen ( $p < 0,05$ ). Um das Ergebnis zu bestätigen, wurde es mit einer alternativen Messmethode über die Messung der elektrischen Impedanz (xCELLigence) im Vergleich zur lichtmikroskopischen Analyse der Wellbedeckung (Cellscreen) überprüft. Hierbei war die Zellproliferation leicht reduziert, jedoch nicht signifikant. Ein Einfluss auf Zellzyklus oder Apoptose zeigte sich nicht.

Es stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage, wie Surfactant nach der Applikation in der Lunge beim Frühgeborenen direkten Einfluss auf die MSC hat. Nach bisherigem Kenntnisstand wird es von den Pneumozyten Typ II gebildet und entfaltet hauptsächlich an der Lungen-Luft-Grenze seine Wirkung. Es vermindert die Oberflächenspannung und erhöht somit die Compliance der Lunge. Zudem trägt es auch einen wichtigen Beitrag zur Infektabwehr, unter anderem über die Verminderung der Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen. In diesem

Zusammenhang wird auch eine Wirkung im Lungeninterstitium vermutet [191-194]. In einer neueren Studie wurde eine Sekretion an der basolateralen Seite der Pneumozyten Typ II bei Vögeln beobachtet. Hierbei sei ebenfalls die Immunabwehr als wichtige Funktion im Interstitium der Lunge genannt [195]. Zudem findet bei Lungenschädigung eine Migration von Fibroblasten zur Oberfläche statt, wo sie Kontakt mit Surfactant-Proteinen bekommen. Es konnte bereits in verschiedenen Studien eine Induktion der Apoptose von humanen Lungenfibroblasten durch Surfactant gezeigt werden, ebenso wie eine Verminderung der Kollagen-1-Bildung von Fibroblasten [196-198].

In den in-vitro-Experimenten dieser Arbeit konnte letztendlich im Vergleich zu den bisherigen bekannten Studien kein eindeutiger Einfluss von Surfactant auf MSC der Frühgeborenen beobachtet werden. Das Zellwachstum war leicht vermindert, jedoch nicht statistisch signifikant. Weder auf die Apoptose noch auf die Differenzierung konnten Auswirkungen beobachtet werden. Eine mögliche Ursache für den fehlenden Effekt in den in-vitro-Versuchen könnte sein, dass Surfactant nicht direkt auf die MSC Einfluss nimmt, sondern indirekt über die Verminderung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine wirkt. In den Experimenten fehlen somit weitere Faktoren wie Neutrophile oder Makrophagen aus der Lunge und die Zytokine, um einen Effekt auf die MSC übertragen zu können.

### *5.1.3 WIRKUNG VON VITAMIN A UND COFFEIN*

Vitamin A hat in den Experimenten dieser Arbeit keinen messbaren Einfluss auf die Proliferation der MSC genommen. Coffein hat ebenfalls keine Auswirkung auf Proliferation, Zellzyklus oder Apoptose.

Der Vitamin A-Blutspiegel ist nachgewiesenermaßen bei Frühgeborenen, vor allem bei denen, die im Verlauf eine BPD entwickeln, niedriger als bei termingerecht geborenen Babys. Es ist bekannt, dass Retinol für die Organ- und auch Lungenentwicklung von großer Bedeutung ist. Eine Vitamin A-Behandlung nimmt einen positiven Einfluss auf die weitere Entwicklung der Frühgeborenen und senkt die Rate an BPD-erkrankter Kinder [199-202]. Im Zusammenhang mit MSC konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass durch supplementäres Vitamin A die Proliferation und Differenzierung der Zellen positiv beeinflusst und die Alveolarisierung der Lunge gefördert wird. Es stimuliert das

Zellwachstum und sorgt für eine Regenerierung des Lungengewebes. Insbesondere konnte bereits gezeigt werden, dass die vermehrte Bildung von Elastin in diesem Zusammenhang von Bedeutung ist. Bei Erwachsenen Mäusen mit Lungenemphysem konnte mit Hilfe von Retinol wieder eine normale Lungenstruktur gebildet werden [203-206].

Im Vergleich mit der bisher bekannten Wirkung von Vitamin A auf andere Zellarten wäre eine Steigerung der Proliferation der MSC zu erwarten gewesen. In den Experimenten dieser Arbeit konnte kein Einfluss auf das Wachstum der MSC nachgewiesen werden. Dies kann jedoch auch daran gelegen haben, dass das lipophile Vitamin A, das hierbei verwendet wurde, sich in dem Medium nicht ausreichend verteilen und an die MSC gelangen konnte. Ebenso wie bei Surfactant könnte es auch an dem artifiziellen System der Experimente gelegen haben, ohne zusätzlichen Einfluss von anderen Zellarten oder Zytokinen, die in der Lunge für die Wirkung von Vitamin A mitverantwortlich sind. Möglicherweise hat Vitamin A auch gar keinen direkten Einfluss auf die MSC der Frühgeborenen. Aufgrund dieser Unsicherheiten sowie aufgrund des fehlenden Einflusses auf die Proliferation, wurden außer den Wachstumsanalysen keine weiterführenden Experimente mit Vitamin A durchgeführt.

Coffein wird bei Frühgeborenen mit BPD im Rahmen eines Apnoe-Bradycardie-Syndroms eingesetzt. Hierbei wird die Wirkung als Adenosin-Rezeptor-Antagonist zur Stimulation des Atemantriebes genutzt [126, 207, 208]. In den bisherigen Untersuchungen gibt es zudem Hinweise auf einen antiinflammatorischen Effekt von Xanthin-Derivaten wie Coffein und Theophyllin [209, 210]. Ein antiinflammatorischer Effekt in der Lunge, wie er bei Asthma oder COPD nachgewiesen werden konnte [209, 210], lässt sich auch bei der BPD vermuten und trägt somit wahrscheinlich neben der Verbesserung des Atemantriebes ebenfalls zur Senkung der BPD-Rate bei. Im Mausmodell konnte bereits eine Minderung der pulmonalen Inflammationsreaktion durch Coffein bestätigt werden [211, 212]. Zudem konnte bei anderen Krankheitsbildern gezeigt werden, dass Coffein teilweise einen hemmenden Einfluss auf die Apoptose verschiedener Zellarten hat, z.B. auf Fibroblasten von durch Zigarettenrauch induziertes Lungenemphysem, auf Zellen der Cornea nach Schädigung durch UV-Strahlen oder auf Nervenzellen bei der Parkinsonkrankheit [213-215].

In den Experimenten dieser Arbeit konnte kein Einfluss auf Proliferation der MSC, deren Zellzyklus oder die Apoptose beobachtet werden. Im Unterschied zu den in früheren Studien genannten Zellen, waren diese bereits vorgeschädigt, d.h. es wurde ein bereits aktivierter Apoptosevorgang gehemmt oder die Zellen standen unter dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine. Die MSC der Frühgeborenen in den Versuchen dieser Arbeit hatten in ihren in-vitro-Kulturen optimale Wachstumsbedingungen, jedoch fehlten ebenso wie bei Surfactant weitere Faktoren wie andere Zellarten, z.B. Neutrophile und Makrophagen oder Zytokine, über die sich die antiinflammatorische Coffeinwirkung wahrscheinlich normalerweise entfaltet.

## 5.2 ERMITTLUNG EINES DURCH DEXAMETHASON INDUZIERTEN SIGNALWEGES IN MSC ZUR REDUKTION DER RATE AN BPD VON FRÜHGEBORENEN

Mit Hilfe einer Mikro-Array-Analyse sollten verschiedene Gene identifiziert werden, die für die bereits ermittelte Kortikosteroidwirkung, insbesondere die Wachstumshemmung der MSC, verantwortlich sind und sich für weitere Studien als Target einer gezielten modulierenden Therapie eignen. Vergleichsweise wurden hierbei sowohl mit Dexamethason als auch mit Surfactant behandelte Zellkulturen untersucht.

Mittels Analyse der mRNA konnte gezeigt werden, dass Surfactant auch in hoher Dosierung (80µg/ml) auf die Genexpression der MSC nur einen sehr geringen Einfluss nimmt. Dies unterstützt die Hypothese, dass der in der BPD-Therapie relevante protektive Effekt nicht direkt über die MSC wirkt. Entscheidend ist vielmehr die Reduktion der Oberflächenspannung in den Alveolen, wodurch die Beatmung gemildert und somit der inspiratorische Sauerstoffgehalt und der mechanische Stress auf das Lungengewebe reduziert werden kann. Zum anderen ist auch ein antientzündlicher Effekt über die Verminderung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen und somit eher eine Wirkung über andere Zellarten wie Neutrophile oder Makrophagen auswirkend auf die Lungenentwicklung und das Risiko einer BPD (s. Kapitel 5.1.2).

Dexamethason hingegen zeigt eine ausgeprägte Regulation einer Vielzahl von Genen. Es konnten jedoch keine dosisabhängigen Effekte auf Basis der mRNA nachgewiesen werden, vielmehr führten beide untersuchten Dosierungen (DM  $10^{-4}$ mol/l, DM  $10^{-6}$  mol/l) trotz eines Dosisunterschiedes um den Faktor 100 bis auf vereinzelte Ausnahmen zu den gleichen Veränderungen in der Genexpression. In den Wachstumsexperimenten zeigten sich jedoch dosisabhängige Effekte, weshalb nur die höheren Konzentrationen des Kortikosteroids für die Mikro-Array-Analyse verwendet wurden, welche in den Proliferationsexperimenten eine deutliche Wachstumshemmung hervorrufen konnten (DM  $10^{-4}$ mol/l, DM  $10^{-6}$  mol/l), die niedrigste Konzentration mit DM  $10^{-8}$ mol/l wurde nicht untersucht. Ob letztere Dosierung ebenfalls zu den gleichen Veränderungen der Genexpression führen, muss noch überprüft werden.

## 5.2.1 REGULATION VON FBN2, IGF-1/2 UND IRS2 DURCH DEXAMETHASON

### 5.2.1.1 Fibrillin 2

Als das am stärksten durch Dexamethason regulierte Gen stellte sich Fibrillin 2 (FBN2) heraus. Es wurde unter der hohen Konzentration von Dexamethason ( $c=10^{-4}$ mol/l) 8,5-fach und unter der mittleren Konzentration ( $c=10^{-6}$ mol/l) 11,2-fach im Vergleich zur Kontrolle hochreguliert.

Fibrillin 2 bildet zusammen mit Fibrillin 1 Microfibrillen, die sich dann zu größeren Fasern zusammenlagern. Außerdem interagieren sie mit verschiedenen anderen Matrixproteinen, z.B. Elastin und bilden als elastische Fasern einen Grundbestandteil des Bindegewebes der Lunge und der Gefäßwände. Fibrillin 2 nimmt zudem eine wichtige Rolle in der Organentwicklung sowie in der Gewebshomöostase ein. In Studien konnte gezeigt werden, dass die Fibrillin-Genexpression bereits während der Gastrulation der Embryonalentwicklung beginnt. Außerdem interagiert Fibrillin mit verschiedenen Signalwegen unter anderem verschiedener Wachstumsfaktoren, z.B. bindet es TGF- $\beta$  und BMP-Komplexe. Diese Interaktion ist wichtiger Bestandteil der Organogenese der Lunge sowie der Vaskulogenese. Es ist erwiesen, dass FBN2 in der Fetalperiode besonders stark exprimiert wird. Um den Geburtszeitpunkt wendet sich das Verhältnis zu Fibrillin 1. In der Perinatalperiode dominiert dann die Expression von letzterem [102, 216-220].

Dies könnte bedeuten, dass durch die Therapie mit Dexamethason bei Frühgeborenen eine Verschiebung in Richtung des natürlicheren Gleichgewichts durch eine Aktivierung der FBN2-Genexpression erreicht und so eine normale Lungenentwicklung unterstützt wird. In einer Micro-Array-Untersuchung mit embryonalen Chondrozyten von Mäusen konnte eine Hochregulation von FBN2 durch Dexamethason gezeigt werden [221]. Auch die Vaskulogenese wird durch FBN2 beeinflusst, welche bekanntlich in der Pathogenese der BPD ebenfalls eine bedeutende Rolle spielt. Demnach stellt sich FBN2 als ein sehr interessanter Kandidat für die Entwicklung einer gezielten molekulargenetischen Therapie dar.

### **5.2.1.2 Insulin-like Growth Factor**

In der Micro-Array-Analyse zeigte sich, dass neben Fibrillin 2 auch die Gene von IGF-2, IRS2 und IGFBP4 durch Dexamethason stark hochreguliert werden, die Expression von IGF-1 hingegen wurde deaktiviert.

IGF-1 und IGF-2 werden bereits frühzeitig in der Schwangerschaft von fetalem Gewebe exprimiert und spielen eine wichtige Rolle als Wachstumsfaktoren in der fetalen Entwicklung und Differenzierung von Zellen, im fetalen Stoffwechsel (Anabolismus) sowie für das Wachstum der Plazenta. Die IGFs sind sowohl für die prä- als auch für die postnatale Lungenentwicklung wichtig. IGF-1 wird in der Lunge in den Epithelzellen, in mesenchymalen Zellen sowie durch Alveolarmakrophagen gebildet. Besonders im zweiten und dritten Schwangerschaftstrimenon dominiert IGF-2 gegenüber IGF-1. In Bezug auf die BPD konnte gezeigt werden, dass die IGFs eine bedeutende Rolle in der Alveologenese spielen. Der Effekt der IGFs wird u.a. durch IGF-Bindungsproteine (z.B. IGFBP3, IGFBP4) beeinflusst, welche wie die IGFs selbst vom Nährstoffangebot und von verschiedenen Hormonen (u.a. Insulin, Thyroxine, Glukokortikoide) abhängig sind. Im Tierversuch, bei Lämmern und Nagern, wurde gezeigt, dass der IGF-2-Spiegel im fetalen Lungen- und Nierengewebe besonders hoch ist. Um den Geburtszeitpunkt wechselt das Verhältnis zwischen IGF-1 und IGF-2, es dominiert das Wachstumshormon (GH)-abhängige und nährstoffabhängigere IGF-1. Dieses wurde in der Lunge insbesondere in Epithelzellen der Bronchien und peribronchialen mesenchymalen Zellen exprimiert. Dieser Switch ist vermutlich eine Anpassungsreaktion an die mit der Geburt von parenteral auf enteral wechselnde Ernährung, um ein optimales Wachstum zu ermöglichen [200, 222-224].

Antenatal verabreichte Kortikosteroide (z.B. Dexamethason) führen zu einer Änderung der Expression von IGF-1, IGF-2 und der IGF-Bindungsproteine, wobei diese Veränderungen je nach Organ unterschiedlich sein können. IGF-1 wird, wie auch bei der Micro-Array-Analyse dieser Arbeit, vermindert exprimiert [200, 224, 225]. Auch die Bindungsproteine werden unterschiedlich reguliert, nach Fowden et al. werden die Expressionen von IGFBP1 gesenkt und von IGFBP3 erhöht, nach Gatford et al. wird die Gesamtheit der Bindungsproteine durch Glukokortikoide im Mittel vermindert exprimiert [224, 226].

Im Rahmen der BPD ist bekannt, dass Frühgeborene mit nCLD einen deutlich höheren IGF-1-Spiegel aufweisen [200, 222, 223]. Die Erklärungen zur IGF-1-Erhöhung bei

BPD-erkrankten Kindern sind konträr, es gibt Meinungen dies sei eine Anpassungsreaktion zur Verbesserung der Reparaturmechanismen in der Lunge. Bourbon schreibt zudem, dass Vitamin A, als ein für die Alveologenese sehr wichtiges Vitamin, den IGF-1-Spiegel erhöht und somit dem Dexamethason-Effekt entgegenwirkt. Bei Vitamin A ist zudem bekannt, dass es protektiv gegenüber der BPD wirkt. Durch Vitamin A würde das benötigte IGF-1-Defizit ausgeglichen und die positive inflammationshemmende Wirkung von Dexamethason beibehalten, das Gleichgewicht zwischen Vitamin A und Kortison sei demnach entscheidend [200, 227].

Andere Studien deuten jedoch auf einen Zusammenhang von IGF-1 mit der Pathogenese der BPD hin [223, 228]. Insbesondere in den mesenchymalen Zellen der Lunge konnte bei manifester nCLD eine verstärkte IGF-1-Expression nachgewiesen werden. In Versuchen mit Ratten konnte dieser Effekt nach einer 4-wöchigen Hyperoxie-Behandlung bestätigt werden. Nachdem IGF-1 hauptsächlich über den IGF-1-Rezeptor seine Wirkung entfaltet (Zellproliferation, Differenzierung, Bildung extrazellulärer Matrix) und dieser vornehmlich in dem peribronchialen und perivaskulären Bindegewebe nachgewiesen werden konnte, vermutete Chatty et al. einen Zusammenhang mit der Pathogenese der BPD. Durch die Hochregulierung der Rezeptoren im mesenchymalen Bindegewebe beeinflusse IGF-1 die Proliferation der Bindegewebszellen und trage zur Entstehung einer Lungenfibrose bei [223].

Es gibt zudem Studien, die durch eine postnatale IGF-1-Substitution über Infusionen einen protektiven Wert bzgl. der Entstehung einer nCLD zeigen und die postnatale Lungenentwicklung bei Frühgeborenen positiv beeinflussen [227, 229, 230]. Dies lässt sich dadurch erklären, dass Frühgeborene im Vergleich zu gleichaltrigen Feten in utero einen deutlich niedrigeren IGF-1-Spiegel aufweisen. Dieser erniedrigte IGF-1-Spiegel stellt einen bekannten Risikofaktor in der Entstehung einer BPD dar. Durch das Ausgleichen des IGF-1-Spiegels mittels Infusionen kann eine normalere Lungenentwicklung postnatal stattfinden und somit auch das BPD-Risiko reduziert werden [231].

Insgesamt deckt sich die dexamethasoninduzierte verminderte IGF-1-Expression in den MSC dieser Arbeit mit den bekannten Daten. Die Frage ist nun, ob sich dieser Effekt als Möglichkeit einer gezielten Therapie eignet. Postnatal scheint bei Frühgeborenen ein IGF-1-Defizit vorzuliegen, weshalb zu dem Zeitpunkt eine Therapie mit IGF-1-Infusionen protektiv gegenüber einer BPD-Entstehung wirkt. Welcher

Mechanismus dem deutlich erhöhten IGF-1-Spiegel bei manifester nCLD zugrunde liegt, ist jedoch noch unklar und bedarf weiterer Erforschung. An dieser Stelle stehen zwei Aussagen gegenüber, entweder es handelt sich um eine endogen getriggerte Anpassung an die strukturellen Lungenveränderungen, um eine Gewebsreparatur einzuleiten, oder es ist Teil der Pathogenese der BPD. Im ersten Fall wäre die Verminderung der IGF-1-Expression durch Glukokortikoide eher als Nebenwirkung zu betrachten, in letzterem Fall wäre sie gewünscht. Um diesen strittigen Punkt zu klären, müssen zunächst weitere Untersuchungen unternommen werden.

### *5.2.2 INTERESSANTE KANDIDATEN AUS DER UPSTREAM REGULATION*

In der Upstream Regulation wurden neben den bereits in Kapitel 5.2.1 diskutierten Genprodukten noch weitere vielversprechende Faktoren eruiert, die in Zusammenhang mit der BPD sowie der Lungenentwicklung durch Dexamethason reguliert werden und sich als vielversprechend für die Entwicklung einer gezielten Therapie erweisen. Hierbei wurde sich auf die interessantesten Kandidaten beschränkt.

#### **5.2.2.1 C/EBP $\beta$ – CCAAT/enhancer-binding protein $\beta$**

Das Gen für C/EBP $\beta$  wurde gemäß unserer mRNA-Analyse durch die Stimulation durch Dexamethason aktiviert (Aktivation Score 2,43).

Glukokortikoide entfalten ihre Wirkung hauptsächlich über im Zytoplasma befindliche Glukokortikoidrezeptoren. Durch die Bindung des Glukokortikoids an seinen Rezeptor wird dieser aktiviert und wandert in den Zellkern. Dort bindet er an die DNA und führt zur Beeinflussung der Transkription von glukokortikoidabhängigen Genen. Im Lungenepithel ist C/EBP $\beta$  der aktivste Transkriptionsfaktor, die Bindung an die DNA wird durch Glukokortikoide verstärkt. Allgemein kann die DNA-Bindung durch posttranslationale Modifikationen beeinflusst werden, beispielsweise durch Phosphorylierung von C/EBP $\beta$ . Dieser Mechanismus spielt offenbar auch eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion von Wachstumshormonen. Auch die durch Glukokortikoide induzierte verstärkte Bindung geht vermutlich auf die Phosphorylierung von C/EBP $\beta$  zurück [232, 233].

C/EBPs werden ubiquitär exprimiert, in der Lunge sind die Hauptvertreter C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$  und C/EBP $\gamma$ . Ihre Abwesenheit führt zu verschiedenen Zellmetaplasien und insbesondere zur Clara-Zell-Hypoplasie und trägt somit zur Pathogenese der BPD bei. Clara-Zellen spielen u.a. eine wichtige Rolle in der Immunabwehr sowie der Epithelregeneration und sie bilden Proteinkomponenten für Surfactant. Knock-out-Mäuse haben gezeigt, dass C/EBP $\beta$  sehr wichtig für die Lungenentwicklung ist. Es gibt bereits auch in anderen Studien Hinweise, dass die durch Glukokortikoide induzierte Reifung des Lungenepithels über C/EBPs wirken [234].

Ein weiterer durch C/EBP $\beta$  vermittelter Effekt ist die Aktivierung der 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 1 (11 $\beta$ -HSD1). Sie wird in fetalem Lungengewebe in der Spätschwangerschaft sowohl im Epithelium der Bronchien und Bronchiolen sowie im mesenchymalen Bindegewebe exprimiert und ist für die Lungenentwicklung von entscheidender Bedeutung. Durch 11 $\beta$ -HSD1 wird das biologisch inaktive Cortison in aktives Cortisol umgewandelt. In Anwesenheit des proinflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  wird die Aktivierung von 11 $\beta$ -HSD1 nochmal verstärkt. IL-1 $\beta$  ist normalerweise während der Fetalentwicklung nur in sehr geringer Konzentration im Lungengewebe zu finden, im Rahmen der Inflammationsreaktion z.B. bei einer intrauterinen Infektion steigt IL-1 $\beta$  stark an. In Zusammenarbeit von IL-1 $\beta$  mit Glukokortikoiden wird 11 $\beta$ -HSD1 synergistisch aktiviert. Dieser endogene Mechanismus scheint im Falle einer Infektion, welche häufig zu einer Frühgeburt führen kann, die Lungenreifung zu beschleunigen [235]. Auch proinflammatorische Zytokine wie IL6, IL1 oder TNF- $\alpha$  allein können zu einer vermehrten Expression von C/EBP $\beta$  führen [233].

Bei den MSC scheint nach der Micro-Array-Analyse sich die Dexamethason-induzierte Wirkung ebenfalls über C/EBP $\beta$  zu entfalten. Interessant wäre in weiteren Studien zu ermitteln, inwieweit C/EBP $\beta$  nach einer Glukokortikoidtherapie phosphoryliert wird.

### **5.2.2.2 CTGF – Connective Tissue Growth Factor**

Das Gen für den CTGF wurde ebenfalls durch die Stimulation mit Dexamethason aktiviert bzw. hochreguliert (Aktivation Score 1,98).

CTGF koordiniert komplexe Entwicklungs- und Umbauvorgänge verschiedener Gewebe, insbesondere auch der Lunge von Frühgeborenen. Es wird unter Einfluss von TGF- $\beta$ , mechanischer Beatmung und Sauerstoffexposition vermehrt exprimiert.

Anschließend wird es von den Epithelzellen der Lunge in die extrazelluläre Matrix sezerniert und beeinflusst dort die Wirkung unterschiedlicher Wachstumsfaktoren. Beispielsweise hemmt es die VEGF-induzierte Angiogenese. CTGF stört zudem bei Überexpression die Alveolarisierung des Lungengewebes, führt zu einem Umbau der pulmonalen Gefäßarchitektur mit der Folge des pulmonalen Hypertonus und induziert eine interstitielle Fibrose der Lunge. In Experimenten mit neonatalen Mäusen entsteht auf diese Weise eine BPD-ähnliche Pathologie [236]. Auch andere Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen CTGF und der Entstehung einer nCLD. Hierbei stellt CTGF einen Vermittler dar, der durch eine Inflamationsreaktion mit TGF- $\beta$  induzierten Veränderung der Lungenstruktur dar. Es konnte gezeigt werden, dass bei Überexpression von CTGF im Trachealaspirat von Frühgeborenen deutlich mehr Neutrophile und Makrophagen nachzuweisen sind sowie vermehrt proinflammatorische Zytokine (TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ). Die Wirkung von CTGF wird vermutlich über einen  $\beta$ -Catenin-Signalweg induziert [236-240].

Werden bei einer drohenden Frühgeburt antenatal Glukokortikoide wie z.B. Betamethason rechtzeitig verabreicht, kann die TGF- $\beta$ -induzierte CTGF-Expression gemindert werden [241]. Postnatal ist bereits bekannt, dass Glukokortikoide, so wie es auch in den Experimenten dieser Arbeit nachgewiesen wurde, zu einer Steigerung der CTGF-Expression führen. Dies ist jedoch eher eine Nebenwirkung der neonatalen Kortisontherapie und sollte deshalb stets im Vergleich zum Nutzen mit Milderung der pulmonalen Inflamationsreaktion abgewogen werden [242].

Als Gegenspieler ist TNF- $\alpha$  zu nennen, es hemmt die Bildung von CTGF. Bei pränataler Inflamationsreaktion durch z.B. eine Chorioamnionitis wird zwar die TGF- $\beta$ -Expression im fetalen Blut erhöht, jedoch steigt nicht wie erwartet auch der CTGF-Spiegel in MSC und Endothelzellen an. In Studien wurde eruiert, dass in diesem Fall die durch die Inflamationsreaktion erhöhte TNF- $\alpha$ -Expression die CTGF-Bildung hemmt [239]. Auch Coffein hat eine bekannte protektive Wirkung auf die Entwicklung und Inflamationsreaktion der Lunge. Es wird vermutet, dass diese Wirkung ebenfalls durch eine Minderung der CTGF-Expression, welche wiederum über TNF- $\alpha$  vermittelt wird, induziert wird. Coffein antagonisiert somit die durch Glukokortikoide ausgelöste CTGF-Bildung [242]. Neben Coffein wurde auch Rolipram, ein Phosphodiesterase-Inhibitor, als mögliches Therapeutikum zur Reduktion von CTGF untersucht. Es wirkt der TGF- $\beta$ -induzierten vermehrten CTGF-Expression entgegen [238].

Im Rahmen der BPD-Therapieforschung entdeckten Chou et al., dass die durch Amnioninfektion und postnatale Beatmung induzierte Entzündungsreaktion in der Lunge, die zur Pathogenese der BPD beiträgt, im Tiermodell durch intratracheale Gabe von menschlichen mesenchymalen Stammzellen abgeschwächt werden kann. Es wurde gezeigt, dass dem im Rahmen der nCLD erhöhten CTGF-Spiegel und der verminderten VEGF-Ausschüttung durch die Therapie mit mesenchymalen Stammzellen entgegengewirkt wird. Dadurch konnte im Tiermodell die Fibrosierung der Lunge reduziert und die Lungenentwicklung verbessert werden [237].

Eine weitere Überlegung, um der CTGF-induzierten Lungenpathologie entgegenzuwirken, bezieht sich auf die Beeinflussung des  $\beta$ -Catenin-Signalweges. Dies wäre ein interessanter Ansatzpunkt, um neue Therapiestrategien zur Behandlung der BPD zu entwickeln [240].

Zusammenfassend ist, wie auch bei IGF-1, die Erhöhung der CTGF-Expression als Nebenwirkung der Dexamethason-Therapie zu diskutieren. In Studien werden, wie bereits erörtert, schon mehrere Therapiestrategien erforscht zur Reduktion der CTGF-vermittelten Auswirkung auf Lungenentwicklung und Umbauvorgänge des Lungengewebes, die zur Pathogenese der BPD beitragen.

### **5.2.2.3 TNF – Tumor Necrosis Factor**

In den Experimenten dieser Arbeit wurde unter Stimulation mit Dexamethason die TNF-Sekretion der MSC runterreguliert (Aktivation Score: -1,95).

Wie bereits in der Einleitung erörtert, spielt die Inflammationsreaktion eine bedeutende Rolle bei der Pathogenese der BPD. Im Trachealsekret von Frühgeborenen mit nCLD können erhöhte Spiegel von proinflammatorischen Zytokinen, darunter auch TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 nachgewiesen werden. Bereits das Fruchtwasser von Frühgeborenen, die im Verlauf eine BPD entwickeln, enthält höhere Spiegel der genannten Zytokine. Diese Veränderungen entstehen in der Regel aufgrund einer Chorioamnionitis. TNF- $\alpha$  führt zur Rekrutierung von Neutrophilen und Makrophagen. Es wird von einer Vielzahl von Zellen sezerniert, u.a. von Alveolarmakrophagen, Endothelzellen, Pneumozyten Typ II und MSC. Reize für die Sezernierung sind Hypoxie, Hyperoxie, Entzündungen, bakterielle Infektionen aber auch Baro- und Volutrauma der Lunge. Im Gegensatz dazu werden verschiedene antiinflammatorische Zytokine (z.B. IL10) und Wachstumsfaktoren (z.B. VEGF, PDGF,

FGF) vermindert im Trachealspirat gefunden. Zur Entstehung einer BPD trägt demnach ein Ungleichgewicht aus proinflammatorischen (z.B. TNF- $\alpha$ ) und antiinflammatorischen Faktoren sowie von Wachstumsfaktoren bei [41, 47, 77, 243, 244].

Ehrhardt et al. konnte im Tiermodell nachweisen, dass auch das Fehlen von TNF- $\alpha$  zur Verstärkung des TGF- $\beta$ -Signalweges und damit zur Entwicklung einer BPD-Pathologie führt. Eine darauffolgende Therapie mit TNF- $\alpha$  führt dagegen zu einer Abschwächung der TGF- $\beta$ -Wirkung und Verminderung der dadurch induzierten Apoptosereaktion. Die genauen Auswirkungen von TNF- $\alpha$  auf die MSC und der Schaden oder Nutzen der Apoptose der MSC sind noch unklar, es scheint jedoch ein bestimmter TNF- $\alpha$ -Spiegel für eine normale Lungenentwicklung notwendig zu sein, insbesondere muss das Gleichgewicht zwischen TNF- $\alpha$  und TGF- $\beta$  ausgewogen sein [47].

Bei mit Kortikosteroiden behandelten Frühgeborenen mit BPD konnte eine Minderung der proinflammatorischen Zytokine, auch von TNF- $\alpha$ , im Trachealspirat nachgewiesen werden [243]. Dies deckt sich mit den Ergebnissen des Micro-Arrays dieser Arbeit, nachdem die MSC in der Lunge weniger TNF- $\alpha$  exprimieren. Auch Swantek et al. konnte in Zellkulturen mit Makrophagen aus dem Blut von Mäusen eine durch Kortikosteroide induzierte Hemmung der TNF- $\alpha$ -Sekretion bewirken. Hierbei scheint der JNK/SAPK-Signalweg eine wichtige Rolle zu spielen [245].

Im Rahmen der BPD-Forschung hat sich gezeigt, dass TNF- $\alpha$  auch protektive Eigenschaften hat, z.B. durch Antagonisierung von CTGF (s. Kapitel 5.2.2.2). Ohne den Einsatz von Kortikosteroiden wäre jedoch die CTGF-Expression geringer und damit auch der notwendige TNF- $\alpha$ -Spiegel. Zudem scheint es teilweise die TGF- $\beta$ -induzierte Entzündungsreaktion abzuschwächen, was dafürspricht, dass ein bestimmtes Gleichgewicht aufrechterhalten werden muss [47, 244].

### 5.3 AUSBLICK

Die in den durchgeführten Experimenten gewonnenen Erkenntnisse unterstützen die These, die MSC von Frühgeborenen als potenziellen Angriffspunkt einer gezielten Therapie zu wählen, um das Risiko einer BPD zu vermindern. Kortikosteroide nehmen doch großen Einfluss auf die MSC, welche nach neueren Studien mit für die Pathogenese der BPD verantwortlich sind [34, 116]. Die Wachstumshemmung der MSC hat sich als ein vielversprechendes Ziel herausgestellt. Auch bei der Untersuchung der durch Kortikosteroide regulierten Gene gibt es eine ganze Reihe interessanter Kandidaten, die über eine gezielte Therapie moduliert werden könnten. Dies steht in Einklang mit den vorangegangenen Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe. Beispielsweise könnte die durch TGF- $\beta$  induzierte Differenzierung zu Myofibroblasten unterbunden werden. Zudem kann allein durch eine Wachstumshemmung der negative Einfluss der MCS auf die BPD-Entstehung gemildert werden. Auch der PDGF-R $\alpha$  oder der  $\beta$ -Catenin-Signalweg könnten, gemäß den Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe, Angriffspunkte für eine Therapie darstellen [88, 115, 116].

Bezüglich der in dieser Arbeit mit Hilfe der Micro-Array-Technologie ermittelten Ergebnisse sollten in weiterführenden Experimenten die Veränderungen der Expression ausgewählter Gene mittels PCR bestätigt werden. Des Weiteren sollte der Phosphorylierungsstatus von C/EBP $\beta$  beispielsweise mittels Westernblot untersucht werden. In Bezug auf die verschiedenen Zellfunktionen ist die Rolle der regulierten Gene noch nicht im Hinblick auf einen protektiven Effekt bezüglich der BPD ausreichend untersucht. Es könnten in-vitro-Versuche mit molekularer Modulation zum Nachweis der Steroidwirkung auf die ermittelten Genfunktionen und Signalkaskaden entworfen werden. Zudem sollten Tierversuche unternommen werden, zum Beispiel mit Hyperoxie behandelte transgene Mäuse, um speziell nach der Population der residenten MSC und deren phänotypischen Veränderungen zu suchen.

Es gibt bereits eine ganze Reihe von Studien, die sich mit der Therapie durch MSC, die aus der Nabelschnur von Frühgeborenen gewonnen werden, beschäftigen. Sie werden Frühgeborenen mit hohem BPD-Risiko intratracheal appliziert. Bis zur regulären Anwendung ist es noch ein weiter Weg, und es werden noch zahlreiche Studien zur Klärung der Mechanismen und Zusammenhänge notwendig sein. Die bisherigen Ergebnisse sind sehr vielversprechend, jedoch sind noch viele Fragen offen: Optimierung der Anzucht der gewonnenen MSC, welche Patienten kommen in

Frage, Zeitpunkt der Applikation, Dosierung etc. Eine gezielte Therapie der durch die Inflammationsreaktion veränderten residenten pulmonalen MSC bei Frühgeborenen stellt somit eine ebenso wichtige Option zur Behandlung der BPD dar [117, 246, 247]. Umso wichtiger ist vorab ein umfassendes Verständnis der physiologischen Funktion und der pathophysiologischen Veränderungen bei Kindern, die eine BPD entwickeln. Die hier gewonnenen Erkenntnisse ermutigen dazu, die Untersuchung von residenten MSC fortzuführen und therapeutische Interventionen zunächst im in-vitro-Zellkulturmodell und im Tiermodell zu evaluieren.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die bronchopulmonale Dysplasie ist eine der schwersten und häufigsten Komplikationen der extremen Frühgeburt. Zentral in der Pathogenese ist die pulmonale Inflammationsreaktion, an der auch die residenten mesenchymalen Stromazellen mit verändertem Phänotyp beteiligt sind. Ziel dieser Studie war es, die Wirkung der vier nachgewiesenermaßen BPD-protectiven Therapeutika, Dexamethason, Surfactant, Vitamin A und Coffein, auf die MSC zu untersuchen, um potentielle effektivere und selektiver wirkende Therapeutika im Sinne einer targeted Therapy zu identifizieren.

Hierfür wurde der Einfluss auf das Proliferationsverhalten sowie Zellzyklus und Apoptose der MSC untersucht. Es zeigte sich eine Wachstumshemmung der Zellen durch die Kortikosteroide. Surfactant, Vitamin A und Coffein hatten keinen relevanten Einfluss auf die Proliferation. Bei der weiteren Einordnung dieser Wachstumshemmung konnte ein Arrest des Zellzyklus in der G1-Phase nachgewiesen werden. Die Apoptoserate wurde ebenfalls tendenziell leicht gesteigert, jedoch nicht signifikant. Des Weiteren wurde untersucht, ob unter dem Einfluss der Medikation eine Differenzierung zu Myofibroblasten induziert werden kann, was sich in den Experimenten nicht bestätigte.

Im nachfolgenden Schritt wurden mittels einer Analyse der mRNA einige Gene identifiziert, die durch Dexamethason oder Surfactant reguliert wurden. Surfactant zeigte kaum einen Effekt auf die Genexpression der MSC. Durch Dexamethason wurden jedoch in beiden untersuchten Medikamentenkonzentration (DM  $10^{-4}$ mol/l, DM  $10^{-6}$ mol/l) zahlreiche Gene reguliert. Hierzu gehören eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren oder membranständige Proteine. Ungefähr die Hälfte der Gene konnte der Zelladhäsion oder Differenzierung zugeschrieben werden (z.B. NID2, FGF6, CDH6). In der weiteren Analyse stellten sich FBN2, C/EBP $\beta$ , IGF-1 und TNF- $\alpha$  als besonders stark regulierte Zielgene heraus. Inwiefern sich diese Kandidaten für eine zielgerichtete Therapie eignen, muss in nachfolgenden Studien im Detail und unter Einsatz von konditionalen Knockout-Tieren herausgearbeitet werden. So kann abschließend beurteilt werden, ob selektiv wirksame Therapeutika gegen einen der Kandidaten vielversprechende Therapeutika für einen klinischen Einsatz darstellen.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

1. WHO. *preterm birth*. 2016; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs363/en/>.
2. Ruegger, C., et al., *Population based trends in mortality, morbidity and treatment for very preterm- and very low birth weight infants over 12 years*. BMC Pediatr, 2012. **12**: p. 17.
3. Jobe, A.H. and E. Bancalari, *Bronchopulmonary dysplasia*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **163**(7): p. 1723-9.
4. Fanaroff, A.A., et al., *Trends in neonatal morbidity and mortality for very low birthweight infants*. Am J Obstet Gynecol, 2007. **196**(2): p. 147 e1-8.
5. Bancalari, E., N. Claure, and I.R. Sosenko, *Bronchopulmonary dysplasia: changes in pathogenesis, epidemiology and definition*. Semin Neonatol, 2003. **8**(1): p. 63-71.
6. Gortner, L., et al., *Rates of bronchopulmonary dysplasia in very preterm neonates in Europe: results from the MOSAIC cohort*. Neonatology, 2011. **99**(2): p. 112-117.
7. Voyles, J.B., *Bronchopulmonary dysplasia*. Am J Nurs, 1981. **81**(3): p. 510-4.
8. Moya, M.P., et al., *Reliability of CXR for the diagnosis of bronchopulmonary dysplasia*. Pediatr Radiol, 2001. **31**(5): p. 339-42.
9. Baraldi, E. and M. Filippone, *Chronic lung disease after premature birth*. N Engl J Med, 2007. **357**(19): p. 1946-55.
10. Baraldi, E., S. Carraro, and M. Filippone, *Bronchopulmonary dysplasia: definitions and long-term respiratory outcome*. Early human development, 2009. **85**(10): p. S1-S3.
11. Bhandari, A. and S. McGrath-Morrow, *Long-term pulmonary outcomes of patients with bronchopulmonary dysplasia*. Semin Perinatol, 2013. **37**(2): p. 132-7.
12. Carraro, S., et al., *Bronchopulmonary dysplasia: the earliest and perhaps the longest lasting obstructive lung disease in humans*. Early Hum Dev, 2013. **89 Suppl 3**: p. S3-5.
13. Lovering, A.T., et al., *Ventilatory and sensory responses in adult survivors of preterm birth and bronchopulmonary dysplasia with reduced exercise capacity*. Ann Am Thorac Soc, 2014. **11**(10): p. 1528-37.
14. Narang, I., *Review series: What goes around, comes around: childhood influences on later lung health? Long-term follow-up of infants with lung disease of prematurity*. Chron Respir Dis, 2010. **7**(4): p. 259-69.
15. Goodman, G., et al., *Pulmonary hypertension in infants with bronchopulmonary dysplasia*. J Pediatr, 1988. **112**(1): p. 67-72.
16. Khemani, E., et al., *Pulmonary artery hypertension in formerly premature infants with bronchopulmonary dysplasia: clinical features and outcomes in the surfactant era*. Pediatrics, 2007. **120**(6): p. 1260-9.
17. del Cerro, M.J., et al., *Pulmonary hypertension in bronchopulmonary dysplasia: clinical findings, cardiovascular anomalies and outcomes*. Pediatric pulmonology, 2014. **49**(1): p. 49-59.
18. de Jong, M., M. Verhoeven, and A.L. van Baar, *School outcome, cognitive functioning, and behaviour problems in moderate and late preterm children and adults: a review*. Semin Fetal Neonatal Med, 2012. **17**(3): p. 163-9.

19. Fawke, J., *Neurological outcomes following preterm birth*. Semin Fetal Neonatal Med, 2007. **12**(5): p. 374-82.
20. Inder, T.E., et al., *Abnormal cerebral structure is present at term in premature infants*. Pediatrics, 2005. **115**(2): p. 286-94.
21. Rogers, E.E. and S.R. Hintz, *Early neurodevelopmental outcomes of extremely preterm infants*. Semin Perinatol, 2016. **40**(8): p. 497-509.
22. Northway, W.H., Jr., R.C. Rosan, and D.Y. Porter, *Pulmonary disease following respirator therapy of hyaline-membrane disease. Bronchopulmonary dysplasia*. N Engl J Med, 1967. **276**(7): p. 357-68.
23. Van Lierde, S., et al., *Different patterns of pulmonary sequelae after hyaline membrane disease: heterogeneity of bronchopulmonary dysplasia? A clinicopathologic study*. Biol Neonate, 1991. **60**(3-4): p. 152-62.
24. Hislop, A.A. and S.G. Haworth, *Pulmonary vascular damage and the development of cor pulmonale following hyaline membrane disease*. Pediatr Pulmonol, 1990. **9**(3): p. 152-61.
25. Husain, A.N., N.H. Siddiqui, and J.T. Stocker, *Pathology of arrested acinar development in postsurfactant bronchopulmonary dysplasia*. Hum Pathol, 1998. **29**(7): p. 710-7.
26. Coalson, J.J., *Pathology of bronchopulmonary dysplasia*. Semin Perinatol, 2006. **30**(4): p. 179-84.
27. Jobe, A.J., *The new BPD: an arrest of lung development*. Pediatr Res, 1999. **46**(6): p. 641-3.
28. Rannels, S.R. and D.E. Rannels, *The type II pneumocyte as a model of lung cell interaction with the extracellular matrix*. J Mol Cell Cardiol, 1989. **21 Suppl 1**: p. 151-9.
29. Schöni-Affolter, F., C. Dubuis-Grieder, and E. Strauch. *embryology.ch*. Available from: <http://www.embryology.ch/indexde.html>.
30. Zeltner, T.B. and P.H. Burri, *The postnatal development and growth of the human lung. II. Morphology*. Respir Physiol, 1987. **67**(3): p. 269-82.
31. Joshi, S. and S. Kotecha, *Lung growth and development*. Early human development, 2007. **83**(12): p. 789-794.
32. Hislop, A.A., *Airway and blood vessel interaction during lung development*. Journal of Anatomy, 2002. **201**(4): p. 325-334.
33. Mobius, M.A. and B. Thebaud, *Stem Cells and Their Mediators - Next Generation Therapy for Bronchopulmonary Dysplasia*. Front Med (Lausanne), 2015. **2**: p. 50.
34. Popova, A.P., et al., *Isolation of tracheal aspirate mesenchymal stromal cells predicts bronchopulmonary dysplasia*. Pediatrics, 2010. **126**(5): p. e1127-33.
35. Bose, C., et al., *Fetal growth restriction and chronic lung disease among infants born before the 28th week of gestation*. Pediatrics, 2009. **124**(3): p. e450-8.
36. Parton, L.A., et al., *The genetic basis for bronchopulmonary dysplasia*. Front Biosci, 2006. **11**: p. 1854-60.
37. Chess, P.R., et al., *Pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia*. Semin Perinatol, 2006. **30**(4): p. 171-8.
38. Hallman, M. and R. Haataja, *Genetic influences and neonatal lung disease*. Semin Neonatol, 2003. **8**(1): p. 19-27.
39. Oak, P., et al., *Attenuated PDGF signaling drives alveolar and microvascular defects in neonatal chronic lung disease*. EMBO Mol Med, 2017. **9**(11): p. 1504-1520.

40. Watterberg, K.L., et al., *Chorioamnionitis and early lung inflammation in infants in whom bronchopulmonary dysplasia develops*. Pediatrics, 1996. **97**(2): p. 210-5.
41. Yoon, B.H., et al., *Amniotic fluid cytokines (interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8) and the risk for the development of bronchopulmonary dysplasia*. Am J Obstet Gynecol, 1997. **177**(4): p. 825-30.
42. Redline, R.W., D. Wilson-Costello, and M. Hack, *Placental and other perinatal risk factors for chronic lung disease in very low birth weight infants*. Pediatr Res, 2002. **52**(5): p. 713-9.
43. Dempsey, E., et al., *Outcome of neonates less than 30 weeks gestation with histologic chorioamnionitis*. Am J Perinatol, 2005. **22**(3): p. 155-9.
44. Elimian, A., et al., *Histologic chorioamnionitis, antenatal steroids, and perinatal outcomes*. Obstet Gynecol, 2000. **96**(3): p. 333-6.
45. Lahra, M.M., P.J. Beeby, and H.E. Jeffery, *Intrauterine inflammation, neonatal sepsis, and chronic lung disease: a 13-year hospital cohort study*. Pediatrics, 2009. **123**(5): p. 1314-9.
46. Plakkal, N., et al., *Histological chorioamnionitis and bronchopulmonary dysplasia: a retrospective cohort study*. J Perinatol, 2013. **33**(6): p. 441-5.
47. Ehrhardt, H., et al., *Absence of TNF-alpha enhances inflammatory response in the newborn lung undergoing mechanical ventilation*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2016. **310**(10): p. L909-18.
48. Watson, E., et al., *Perinatal factors and the development of chronic lung disease in preterm infants: A case control study*. Journal of Paediatrics and Child Health, 1987. **23**(3): p. 181-184.
49. Qun-fang, R., Z. Yu-cai, and Z. Guo-qin, *Analysis on the risk factors and the prognosis of chronic lung disease in premature infants*. Chinese Pediatric Emergency Medicine, 2006. **4**: p. 024.
50. Vohr, B.R., E.F. Bell, and W. Oh, *Infants with bronchopulmonary dysplasia. Growth pattern and neurologic and developmental outcome*. Am J Dis Child, 1982. **136**(5): p. 443-7.
51. Durrmeyer, X., et al., *Perinatal risk factors for bronchopulmonary dysplasia in extremely low gestational age infants: a pregnancy disorder-based approach*. J Pediatr, 2012. **160**(4): p. 578-583 e2.
52. Reiss, I., et al., *Increased risk of bronchopulmonary dysplasia and increased mortality in very preterm infants being small for gestational age*. Arch Gynecol Obstet, 2003. **269**(1): p. 40-4.
53. Marshall, D.D., et al., *Risk factors for chronic lung disease in the surfactant era: a North Carolina population-based study of very low birth weight infants*. North Carolina Neonatologists Association. Pediatrics, 1999. **104**(6): p. 1345-50.
54. Hernandez, L.A., et al., *Chest wall restriction limits high airway pressure-induced lung injury in young rabbits*. J Appl Physiol (1985), 1989. **66**(5): p. 2364-8.
55. Thomson, M.A., et al., *Delayed extubation to nasal continuous positive airway pressure in the immature baboon model of bronchopulmonary dysplasia: lung clinical and pathological findings*. Pediatrics, 2006. **118**(5): p. 2038-50.
56. Bland, R.D., et al., *Mechanical ventilation with 40% oxygen reduces pulmonary expression of genes that regulate lung development and impairs alveolar septation in newborn mice*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. **293**(5): p. L1099-110.

57. Courtney, S.E., et al., *High-frequency oscillatory ventilation versus conventional mechanical ventilation for very-low-birth-weight infants*. N Engl J Med, 2002. **347**(9): p. 643-52.
58. Johnson, A.H., et al., *High-frequency oscillatory ventilation for the prevention of chronic lung disease of prematurity*. N Engl J Med, 2002. **347**(9): p. 633-42.
59. Lista, G., et al., *Volume guarantee versus high-frequency ventilation: lung inflammation in preterm infants*. Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition, 2008. **93**(4): p. F252-F256.
60. Bonikos, D.S., et al., *Oxygen toxicity in the newborn. The effect of prolonged 100 per cent O2 exposure on the lungs of newborn mice*. Lab Invest, 1975. **32**(5): p. 619-35.
61. Randell, S.H., R.R. Mercer, and S.L. Young, *Neonatal hyperoxia alters the pulmonary alveolar and capillary structure of 40-day-old rats*. Am J Pathol, 1990. **136**(6): p. 1259-66.
62. Warner, B.B., et al., *Functional and pathological effects of prolonged hyperoxia in neonatal mice*. Am J Physiol, 1998. **275**(1 Pt 1): p. L110-7.
63. Yee, M., et al., *Neonatal hyperoxia causes pulmonary vascular disease and shortens life span in aging mice*. Am J Pathol, 2011. **178**(6): p. 2601-10.
64. Ozdemir, A., M.A. Brown, and W.J. Morgan, *Markers and mediators of inflammation in neonatal lung disease*. Pediatr Pulmonol, 1997. **23**(4): p. 292-306.
65. Cassell, G.H., et al., *Association of Ureaplasma urealyticum infection of the lower respiratory tract with chronic lung disease and death in very-low-birth-weight infants*. Lancet, 1988. **2**(8605): p. 240-5.
66. Wang, E.E., et al., *Role of Ureaplasma urealyticum and other pathogens in the development of chronic lung disease of prematurity*. Pediatr Infect Dis J, 1988. **7**(8): p. 547-51.
67. An, H.S., et al., *Pulmonary hypertension in preterm infants with bronchopulmonary dysplasia*. Korean Circ J, 2010. **40**(3): p. 131-6.
68. Van Marter, L.J., et al., *Hydration during the first days of life and the risk of bronchopulmonary dysplasia in low birth weight infants*. J Pediatr, 1990. **116**(6): p. 942-9.
69. Thebaud, B. and S.H. Abman, *Bronchopulmonary dysplasia: where have all the vessels gone? Roles of angiogenic growth factors in chronic lung disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2007. **175**(10): p. 978-85.
70. Bhatt, A.J., et al., *Disrupted pulmonary vasculature and decreased vascular endothelial growth factor, Flt-1, and TIE-2 in human infants dying with bronchopulmonary dysplasia*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(10 Pt 1): p. 1971-80.
71. Baker, C.D. and S.H. Abman, *Impaired pulmonary vascular development in bronchopulmonary dysplasia*. Neonatology, 2015. **107**(4): p. 344-351.
72. Mourani, P.M. and S.H. Abman, *Pulmonary vascular disease in bronchopulmonary dysplasia: pulmonary hypertension and beyond*. Curr Opin Pediatr, 2013. **25**(3): p. 329-37.
73. Groneck, P., et al., *Association of pulmonary inflammation and increased microvascular permeability during the development of bronchopulmonary dysplasia: a sequential analysis of inflammatory mediators in respiratory fluids of high-risk preterm neonates*. Pediatrics, 1994. **93**(5): p. 712-8.
74. Thiel, M., et al., *Oxygenation inhibits the physiological tissue-protecting mechanism and thereby exacerbates acute inflammatory lung injury*. PLoS Biol, 2005. **3**(6): p. e174.

75. Wilson, M.R., et al., *High tidal volume upregulates intrapulmonary cytokines in an in vivo mouse model of ventilator-induced lung injury*. J Appl Physiol (1985), 2003. **95**(4): p. 1385-93.
76. Hillman, N.H., et al., *Brief, large tidal volume ventilation initiates lung injury and a systemic response in fetal sheep*. Am J Respir Crit Care Med, 2007. **176**(6): p. 575-81.
77. Speer, C.P., *Inflammation and bronchopulmonary dysplasia: a continuing story*. Semin Fetal Neonatal Med, 2006. **11**(5): p. 354-62.
78. Greenlee, K.J., Z. Werb, and F. Kheradmand, *Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted*. Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 69-98.
79. Speer, C.P., *Inflammatory mechanisms in neonatal chronic lung disease*. Eur J Pediatr, 1999. **158 Suppl 1**: p. S18-22.
80. Sweet, D.G., H.L. Halliday, and J.A. Warner, *Airway remodelling in chronic lung disease of prematurity*. Paediatric Respiratory Reviews. **3**(2): p. 140-146.
81. Blackwell, T.S., et al., *NF-kappaB signaling in fetal lung macrophages disrupts airway morphogenesis*. J Immunol, 2011. **187**(5): p. 2740-7.
82. Velten, M., et al., *Deficits in lung alveolarization and function after systemic maternal inflammation and neonatal hyperoxia exposure*. J Appl Physiol (1985), 2010. **108**(5): p. 1347-56.
83. Rozycki, H.J., *Bronchoalveolar interleukin-1 beta in infants on day 1 of life*. South Med J, 1994. **87**(10): p. 991-6.
84. Jonsson, B., et al., *Early increase of TNF alpha and IL-6 in tracheobronchial aspirate fluid indicator of subsequent chronic lung disease in preterm infants*. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 1997. **77**(3): p. F198-201.
85. Tullus, K., et al., *Elevated cytokine levels in tracheobronchial aspirate fluids from ventilator treated neonates with bronchopulmonary dysplasia*. Eur J Pediatr, 1996. **155**(2): p. 112-6.
86. Ambalavanan, N., et al., *Cytokines associated with bronchopulmonary dysplasia or death in extremely low birth weight infants*. Pediatrics, 2009. **123**(4): p. 1132-41.
87. Bose, C.L., C.E. Dammann, and M.M. Laughon, *Bronchopulmonary dysplasia and inflammatory biomarkers in the premature neonate*. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2008. **93**(6): p. F455-61.
88. Popova, A.P., et al., *Reduced platelet-derived growth factor receptor expression is a primary feature of human bronchopulmonary dysplasia*. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 2014. **307**(3): p. L231-L239.
89. Bry, K., J.A. Whitsett, and U. Lappalainen, *IL-1beta disrupts postnatal lung morphogenesis in the mouse*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2007. **36**(1): p. 32-42.
90. Lappalainen, U., et al., *Interleukin-1beta causes pulmonary inflammation, emphysema, and airway remodeling in the adult murine lung*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005. **32**(4): p. 311-8.
91. Stenmark, K.R., et al., *Potential role of eicosanoids and PAF in the pathophysiology of bronchopulmonary dysplasia*. Am Rev Respir Dis, 1987. **136**(3): p. 770-2.
92. Kojima, T., M. Sasai, and Y. Kobayashi, *Increased soluble ICAM-1 in tracheal aspirates of infants with bronchopulmonary dysplasia*. Lancet, 1993. **342**(8878): p. 1023-4.
93. Kotecha, S., et al., *Increase in interleukin-8 and soluble intercellular adhesion molecule-1 in bronchoalveolar lavage fluid from premature infants who develop chronic lung disease*. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 1995. **72**(2): p. F90-6.

94. Hawwa, R.L., et al., *IL-10 inhibits inflammatory cytokines released by fetal mouse lung fibroblasts exposed to mechanical stretch*. *Pediatr Pulmonol*, 2011. **46**(7): p. 640-9.
95. Bohrer, B., et al., *Mechanical ventilation of newborns infant changes in plasma pro- and anti-inflammatory cytokines*. *J Pediatr*, 2010. **156**(1): p. 16-9.
96. Strieter, R.M. and S.L. Kunkel, *Acute lung injury: the role of cytokines in the elicitation of neutrophils*. *J Investig Med*, 1994. **42**(4): p. 640-51.
97. Ogden, B.E., et al., *Lung lavage of newborns with respiratory distress syndrome. Prolonged neutrophil influx is associated with bronchopulmonary dysplasia*. *Chest*, 1983. **83**(5 Suppl): p. 31S-33S.
98. Sime, P.J., et al., *Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor-beta1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung*. *J Clin Invest*, 1997. **100**(4): p. 768-76.
99. Hardie, W.D., et al., *Postnatal lung function and morphology in transgenic mice expressing transforming growth factor-alpha*. *Am J Pathol*, 1997. **151**(4): p. 1075-83.
100. Gaudie, J., et al., *Transfer of the active form of transforming growth factor-beta 1 gene to newborn rat lung induces changes consistent with bronchopulmonary dysplasia*. *Am J Pathol*, 2003. **163**(6): p. 2575-84.
101. Nakanishi, H., et al., *TGF-beta-neutralizing antibodies improve pulmonary alveologenesis and vasculogenesis in the injured newborn lung*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007. **293**(1): p. L151-61.
102. Hines, E.A. and X. Sun, *Tissue crosstalk in lung development*. *J Cell Biochem*, 2014. **115**(9): p. 1469-77.
103. Healy, A.M., et al., *VEGF is deposited in the subepithelial matrix at the leading edge of branching airways and stimulates neovascularization in the murine embryonic lung*. *Dev Dyn*, 2000. **219**(3): p. 341-52.
104. Stenmark, K.R. and S.H. Abman, *Lung vascular development: implications for the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia*. *Annu Rev Physiol*, 2005. **67**: p. 623-61.
105. Tambunting, F., et al., *Impaired lung vascular endothelial growth factor in extremely premature baboons developing bronchopulmonary dysplasia/chronic lung disease*. *J Investig Med*, 2005. **53**(5): p. 253-62.
106. Nupponen, I., et al., *Neutrophil activation in preterm infants who have respiratory distress syndrome*. *Pediatrics*, 2002. **110**(1 Pt 1): p. 36-41.
107. Prince, L.R., et al., *Macrophage phenotype is associated with disease severity in preterm infants with chronic lung disease*. *PLoS One*, 2014. **9**(8): p. e103059.
108. Davies, P.L., et al., *Relationship of proteinases and proteinase inhibitors with microbial presence in chronic lung disease of prematurity*. *Thorax*, 2010. **65**(3): p. 246-51.
109. Lukkarinen, H., et al., *Matrix metalloproteinase-9 deficiency worsens lung injury in a model of bronchopulmonary dysplasia*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2009. **41**(1): p. 59-68.
110. Bhattacharya, S., et al., *Genome-wide transcriptional profiling reveals connective tissue mast cell accumulation in bronchopulmonary dysplasia*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012. **186**(4): p. 349-58.
111. Rosen, D., et al., *Accelerated thymic maturation and autoreactive T cells in bronchopulmonary dysplasia*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006. **174**(1): p. 75-83.
112. Henrick, K.T., et al., *Lung cells from neonates show a mesenchymal stem cell phenotype*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007. **175**(11): p. 1158-64.

113. Bozyk, P.D., et al., *Mesenchymal stromal cells from neonatal tracheal aspirates demonstrate a pattern of lung-specific gene expression*. *Stem Cells Dev*, 2011. **20**(11): p. 1995-2007.
114. Reicherzer, T., A. Schulze, and H. Ehrhardt, *Phänotypische Charakterisierung der Lungenfibroblasten aus dem Trachealspirat von Frühgeborenen < 29 vollendeten Schwangerschaftswochen*. *Klinische Pädiatrie*, 2010. **222**(S 01): p. GNPI\_PO\_49.
115. Oak, P., et al., *Effect of TGF-beta on functional properties of un-stretched and stretched neonatal lung (myo) fibroblast*. *European Respiratory Journal*, 2014. **44**(Suppl 58): p. P3758.
116. Reicherzer, T., et al. *PHENOTYPE OF LUNG MESENCHYMAL STROMAL CELLS PREDICTS SEVERITY OF BPD IN EXTREMELY PRETERM INFANTS*. in *EUROPEAN JOURNAL OF PEDIATRICS*. 2016. SPRINGER 233 SPRING ST, NEW YORK, NY 10013 USA.
117. Mobius, M.A. and M. Rudiger, *Mesenchymal stromal cells in the development and therapy of bronchopulmonary dysplasia*. *Mol Cell Pediatr*, 2016. **3**(1): p. 18.
118. *Effect of corticosteroids for fetal maturation on perinatal outcomes*. *NIH Consensus Development Panel on the Effect of Corticosteroids for Fetal Maturation on Perinatal Outcomes*. *JAMA*, 1995. **273**(5): p. 413-8.
119. McParland, P.C., *Obstetric management of moderate and late preterm labour*. *Semin Fetal Neonatal Med*, 2012. **17**(3): p. 138-42.
120. Morales, W.J., et al., *Use of ampicillin and corticosteroids in premature rupture of membranes: a randomized study*. *Obstet Gynecol*, 1989. **73**(5 Pt 1): p. 721-6.
121. Roberts, D. and S. Dalziel, *Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2006(3): p. CD004454.
122. Bersani, I., C.P. Speer, and S. Kunzmann, *Surfactant proteins A and D in pulmonary diseases of preterm infants*. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2012. **10**(5): p. 573-84.
123. Soll, R.F. and C.J. Morley, *Prophylactic versus selective use of surfactant for preventing morbidity and mortality in preterm infants*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2000(2): p. CD000510.
124. Egberts, J., et al., *Mortality, severe respiratory distress syndrome, and chronic lung disease of the newborn are reduced more after prophylactic than after therapeutic administration of the surfactant Curosurf*. *Pediatrics*, 1997. **100**(1): p. E4.
125. Schmidt, B., et al., *Long-term effects of caffeine therapy for apnea of prematurity*. *N Engl J Med*, 2007. **357**(19): p. 1893-902.
126. Schmidt, B., et al., *Caffeine therapy for apnea of prematurity*. *N Engl J Med*, 2006. **354**(20): p. 2112-21.
127. Shenai, J.P., et al., *Clinical trial of vitamin A supplementation in infants susceptible to bronchopulmonary dysplasia*. *J Pediatr*, 1987. **111**(2): p. 269-77.
128. Tyson, J.E., et al., *Vitamin A supplementation for extremely-low-birth-weight infants*. *National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network*. *N Engl J Med*, 1999. **340**(25): p. 1962-8.
129. Darlow, B.A. and P.J. Graham, *Vitamin A supplementation for preventing morbidity and mortality in very low birthweight infants*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2002(4): p. CD000501.
130. Marquez, H.A. and W.V. Cardoso, *Vitamin A-retinoid signaling in pulmonary development and disease*. *Mol Cell Pediatr*, 2016. **3**(1): p. 28.

131. Group, T.I.-R.S., *Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants*. Pediatrics, 1998. **102**(3 Pt 1): p. 531-7.
132. *Empfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO) am Robert Koch-Institut/Stand: August 2013, Epidemiologisches Bulletin 34/2013*. 2013: Robert Koch-Institut.
133. Thomas, W. and C.P. Speer, *Prevention and treatment of bronchopulmonary dysplasia: current status and future prospects*. Journal of Perinatology, 2007. **27**: p. S26-S32.
134. Sweet, D.G., et al., *European consensus guidelines on the management of neonatal respiratory distress syndrome in preterm infants-2013 update*. Neonatology, 2013. **103**(4): p. 353-368.
135. Abman, S.H., et al., *Pulmonary vascular response to oxygen in infants with severe bronchopulmonary dysplasia*. Pediatrics, 1985. **75**(1): p. 80-4.
136. Askie, L.M., et al., *Oxygen-saturation targets and outcomes in extremely preterm infants*. N Engl J Med, 2003. **349**(10): p. 959-67.
137. Poets, C.F., *When do infants need additional inspired oxygen? A review of the current literature*. Pediatr Pulmonol, 1998. **26**(6): p. 424-8.
138. *Target Ranges of Oxygen Saturation in Extremely Preterm Infants*. New England Journal of Medicine, 2010. **362**(21): p. 1959-1969.
139. *Oxygen Saturation and Outcomes in Preterm Infants*. New England Journal of Medicine, 2013. **368**(22): p. 2094-2104.
140. Keszler, M., S. Nassabeh-Montazami, and K. Abubakar, *Evolution of tidal volume requirement during the first 3 weeks of life in infants < 800 g ventilated with Volume Guarantee*. Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition, 2009. **94**(4): p. F279-F282.
141. Network, S.S.G.o.t.E.K.S.N.N.R., et al., *Early CPAP versus surfactant in extremely preterm infants*. N Engl J Med, 2010. **362**(21): p. 1970-9.
142. Morley, C.J., et al., *Nasal CPAP or intubation at birth for very preterm infants*. N Engl J Med, 2008. **358**(7): p. 700-8.
143. Dunn, M.S., et al., *Randomized trial comparing 3 approaches to the initial respiratory management of preterm neonates*. Pediatrics, 2011. **128**(5): p. e1069-76.
144. Stevens, T.P., et al., *Early surfactant administration with brief ventilation vs. selective surfactant and continued mechanical ventilation for preterm infants with or at risk for respiratory distress syndrome*. Cochrane Database Syst Rev, 2007(4): p. CD003063.
145. Bollen, C.W., C.S. Uiterwaal, and A.J. van Vught, *Cumulative metaanalysis of high-frequency versus conventional ventilation in premature neonates*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. **168**(10): p. 1150-5.
146. Baveja, R. and H. Christou, *Pharmacological strategies in the prevention and management of bronchopulmonary dysplasia*. Semin Perinatol, 2006. **30**(4): p. 209-18.
147. Cole, C.H. and J.M. Fiascone, *Strategies for prevention of neonatal chronic lung disease*. Semin Perinatol, 2000. **24**(6): p. 445-62.
148. Doyle, L.W., et al., *Low-dose dexamethasone facilitates extubation among chronically ventilator-dependent infants: a multicenter, international, randomized, controlled trial*. Pediatrics, 2006. **117**(1): p. 75-83.
149. Halliday, H.L., R.A. Ehrenkranz, and L.W. Doyle, *Early (< 8 days) postnatal corticosteroids for preventing chronic lung disease in preterm infants*. Cochrane Database Syst Rev, 2009(1): p. CD001146.

150. Halliday, H.L., R.A. Ehrenkranz, and L.W. Doyle, *Late (>7 days) postnatal corticosteroids for chronic lung disease in preterm infants*. Cochrane Database Syst Rev, 2009(1): p. CD001145.
151. Doyle, L.W., R.A. Ehrenkranz, and H.L. Halliday, *Early (< 8 days) postnatal corticosteroids for preventing chronic lung disease in preterm infants*. Cochrane Database Syst Rev, 2014. **5**.
152. Cloutier, M.M., *Nebulized steroid therapy in bronchopulmonary dysplasia*. *Pediatr Pulmonol*, 1993. **15**(2): p. 111-6.
153. Shah, V., et al., *Early administration of inhaled corticosteroids for preventing chronic lung disease in ventilated very low birth weight preterm neonates*. Cochrane Database Syst Rev, 2007(4): p. CD001969.
154. Dugas, M.A., et al., *Fluticasone inhalation in moderate cases of bronchopulmonary dysplasia*. *Pediatrics*, 2005. **115**(5): p. e566-72.
155. Barrington, K.J., *The adverse neuro-developmental effects of postnatal steroids in the preterm infant: a systematic review of RCTs*. *BMC Pediatr*, 2001. **1**: p. 1.
156. Shinwell, E.S., et al., *Early postnatal dexamethasone treatment and increased incidence of cerebral palsy*. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 2000. **83**(3): p. F177-81.
157. Wapner, R.J., et al., *Long-term outcomes after repeat doses of antenatal corticosteroids*. *N Engl J Med*, 2007. **357**(12): p. 1190-8.
158. Rademaker, K.J., et al., *Postnatal hydrocortisone treatment for chronic lung disease in the preterm newborn and long-term neurodevelopmental follow-up*. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 2008. **93**(1): p. F58-63.
159. van der Heide-Jalving, M., et al., *Short- and long-term effects of neonatal glucocorticoid therapy: is hydrocortisone an alternative to dexamethasone?* *Acta Paediatr*, 2003. **92**(7): p. 827-35.
160. Reicherzer, T., et al., *Activation of the NF-kappaB pathway alters the phenotype of MSCs in the tracheal aspirates of preterm infants with severe BPD*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2018. **315**(1): p. L87-L101.
161. Intensivmedizin, G.f.N.u.P. *Prävention und Therapie der bronchopulmonalen Dysplasie Frühgeborener*. 06/2009; Available from: [http://www.gnpi.de/leitlinien/aktuell/024-014\\_S2\\_Praevention\\_und\\_Therapie\\_der\\_bronchopulmonalen\\_Dysplasie\\_Fru\\_ehgeborener\\_06-2009\\_06-2014.pdf](http://www.gnpi.de/leitlinien/aktuell/024-014_S2_Praevention_und_Therapie_der_bronchopulmonalen_Dysplasie_Fru_ehgeborener_06-2009_06-2014.pdf).
162. Petersen, K.B., et al., *Population pharmacokinetics of prednisolone in children with acute lymphoblastic leukemia*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2003. **51**(6): p. 465-73.
163. Chabra, S., et al., *Vitamin A status after prophylactic intramuscular vitamin A supplementation in extremely low birth weight infants*. *Nutr Clin Pract*, 2013. **28**(3): p. 381-6.
164. Natarajan, G., et al., *Therapeutic drug monitoring for caffeine in preterm neonates: an unnecessary exercise?* *Pediatrics*, 2007. **119**(5): p. 936-940.
165. Baldin, V., et al., *Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1*. *Genes Dev*, 1993. **7**(5): p. 812-21.
166. Nicoletti, I., et al., *A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry*. *J Immunol Methods*, 1991. **139**(2): p. 271-9.
167. Lefebvre-Roque, M., et al., *Toxic effects of intracerebral PrP antibody administration during the course of BSE infection in mice*. *Prion*, 2007. **1**(3): p. 198-206.

168. Nagata, S., *Apoptotic DNA Fragmentation*. Experimental Cell Research, 2000. **256**(1): p. 12-18.
169. Pilling, D., et al., *Identification of markers that distinguish monocyte-derived fibrocytes from monocytes, macrophages, and fibroblasts*. PLoS One, 2009. **4**(10): p. e7475.
170. Reilkoff, R.A., R. Bucala, and E.L. Herzog, *Fibrocytes: emerging effector cells in chronic inflammation*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(6): p. 427-35.
171. Phan, S.H., *The myofibroblast in pulmonary fibrosis*. Chest, 2002. **122**(6 Suppl): p. 286S-289S.
172. Fukuda, Y., et al., *The role of intraalveolar fibrosis in the process of pulmonary structural remodeling in patients with diffuse alveolar damage*. Am J Pathol, 1987. **126**(1): p. 171-82.
173. Desmouliere, A., et al., *Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts*. J Cell Biol, 1993. **122**(1): p. 103-11.
174. Clay, M.R. and M.C. Halloran, *Cadherin 6 promotes neural crest cell detachment via F-actin regulation and influences active Rho distribution during epithelial-to-mesenchymal transition*. Development, 2014. **141**(12): p. 2506-15.
175. Nischt, R., et al., *Lack of nidogen-1 and -2 prevents basement membrane assembly in skin-organotypic coculture*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(3): p. 545-54.
176. Laughon, M.M., P.B. Smith, and C. Bose, *Prevention of bronchopulmonary dysplasia*. Semin Fetal Neonatal Med, 2009. **14**(6): p. 374-82.
177. Sabatini, F., et al., *Concentration-dependent effects of mometasone furoate and dexamethasone on foetal lung fibroblast functions involved in airway inflammation and remodeling*. Pulmonary pharmacology & therapeutics, 2003. **16**(5): p. 287-297.
178. Oddera, S., et al., *Effects of triamcinolone acetonide on adult human lung fibroblasts: decrease in proliferation, surface molecule expression and mediator release*. International archives of allergy and immunology, 2002. **129**(2): p. 152-159.
179. Warshamana, G.S., et al., *Dexamethasone activates expression of the PDGF- $\alpha$  receptor and induces lung fibroblast proliferation*. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 1998. **274**(4): p. L499-L507.
180. Kraft, M., et al., *IL-4, IL-13, and dexamethasone augment fibroblast proliferation in asthma*. Journal of allergy and clinical immunology, 2001. **107**(4): p. 602-606.
181. Silvestri, M., et al., *Fluticasone and salmeterol downregulate in vitro, fibroblast proliferation and ICAM-1 or H-CAM expression*. European Respiratory Journal, 2001. **18**(1): p. 139-145.
182. Mazel, S., D. Burtrum, and H.T. Petrie, *Regulation of cell division cycle progression by bcl-2 expression: a potential mechanism for inhibition of programmed cell death*. The Journal of experimental medicine, 1996. **183**(5): p. 2219-2226.
183. Frost, G.H., et al., *Expression of c-Myc in glucocorticoid-treated fibroblastic cells*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1994. **50**(3-4): p. 109-19.
184. Fernandes, D., et al., *Glucocorticoids inhibit proliferation, cyclin D1 expression, and retinoblastoma protein phosphorylation, but not activity of the extracellular-regulated kinases in human cultured airway smooth muscle*. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 1999. **21**(1): p. 77-88.

185. Shin, H.H., et al., *The soluble glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor causes cell cycle arrest and apoptosis in murine macrophages*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **316**(1): p. 24-32.
186. Serini, G. and G. Gabbiani, *Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation*. Exp Cell Res, 1999. **250**(2): p. 273-83.
187. Schwartze, J.T., et al., *Glucocorticoids recruit Tgfbr3 and Smad1 to shift transforming growth factor-beta signaling from the Tgfbr1/Smad2/3 axis to the Acvrl1/Smad1 axis in lung fibroblasts*. J Biol Chem, 2014. **289**(6): p. 3262-75.
188. Gu, L., et al., *Effect of IFN-gamma and dexamethasone on TGF-beta1-induced human fetal lung fibroblast-myofibroblast differentiation*. Acta Pharmacol Sin, 2004. **25**(11): p. 1479-88.
189. Cazes, E., et al., *Novel anti-inflammatory effects of the inhaled corticosteroid fluticasone propionate during lung myofibroblastic differentiation*. J Immunol, 2001. **167**(9): p. 5329-37.
190. Franke, J. and G. Abraham, *Concomitant inhibition of primary equine bronchial fibroblast proliferation and differentiation by selective beta2-adrenoceptor agonists and dexamethasone*. Eur J Pharmacol, 2014. **741**: p. 205-13.
191. Han, S. and R.K. Mallampalli, *The Role of Surfactant in Lung Disease and Host Defense against Pulmonary Infections*. Ann Am Thorac Soc, 2015. **12**(5): p. 765-74.
192. Lopez-Rodriguez, E. and J. Perez-Gil, *Structure-function relationships in pulmonary surfactant membranes: from biophysics to therapy*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1838**(6): p. 1568-85.
193. Ochs, M., et al., *Intracellular and intraalveolar localization of surfactant protein A (SP-A) in the parenchymal region of the human lung*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2002. **26**(1): p. 91-8.
194. Barrow, A.D., et al., *OSCAR is a receptor for surfactant protein D that activates TNF- $\alpha$  release from human CCR2+ inflammatory monocytes*. The Journal of Immunology, 2015. **194**(7): p. 3317-3326.
195. Bodi, I., et al., *Dual secretion locations on type II cells in the avian lung suggest local as well as general roles of surfactant*. J Morphol, 2016.
196. Bersani, I., S. Kunzmann, and C.P. Speer, *Immunomodulatory properties of surfactant preparations*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2013. **11**(1): p. 99-110.
197. Guzman-Silva, A., et al., *Lung Surfactant Increases Free Cytosolic Levels of Ca<sup>2+</sup> in Human Lung Fibroblasts*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0134564.
198. Vazquez de Lara, L., et al., *Surfactant components modulate fibroblast apoptosis and type I collagen and collagenase-1 expression*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **279**(5): p. L950-7.
199. Mendelsohn, C., et al., *Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II). Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants*. Development, 1994. **120**(10): p. 2749-2771.
200. Bourbon, J., et al., *Control mechanisms of lung alveolar development and their disorders in bronchopulmonary dysplasia*. Pediatric research, 2005. **57**: p. 38R-46R.
201. Shenai, J.P., et al., *Plasma vitamin A and retinol-binding protein in premature and term neonates*. The Journal of pediatrics, 1981. **99**(2): p. 302-305.
202. Darlow, B. and P. Graham, *Vitamin A supplementation for preventing morbidity and mortality in very low birthweight infants (Cochrane Review)*. The Cochrane Library, 2002. **3**.

203. Liebeskind, A., et al., *Retinoic acid stimulates immature lung fibroblast growth via a PDGF-mediated autocrine mechanism*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **279**(1): p. L81-90.
204. Belloni, P.N., et al., *Effects of all-trans-retinoic acid in promoting alveolar repair*. Chest, 2000. **117**(5 Suppl 1): p. 235S-41S.
205. Liu, B., C.S. Harvey, and S.E. McGowan, *Retinoic acid increases elastin in neonatal rat lung fibroblast cultures*. Am J Physiol, 1993. **265**(5 Pt 1): p. L430-7.
206. McGowan, S., et al., *Mice bearing deletions of retinoic acid receptors demonstrate reduced lung elastin and alveolar numbers*. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 2000. **23**(2): p. 162-167.
207. Fredholm, B.B., *Adenosine, adenosine receptors and the actions of caffeine*. Pharmacology & toxicology, 1995. **76**(2): p. 93-101.
208. Van Marter, L.J., *Epidemiology of bronchopulmonary dysplasia*. Seminars in Fetal and Neonatal Medicine, 2009. **14**(6): p. 358-366.
209. Culpitt, S.V., et al., *Effect of theophylline on induced sputum inflammatory indices and neutrophil chemotaxis in chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. **165**(10): p. 1371-6.
210. Kidney, J., et al., *Immunomodulation by theophylline in asthma. Demonstration by withdrawal of therapy*. Am J Respir Crit Care Med, 1995. **151**(6): p. 1907-14.
211. Weichelt, U., et al., *Prevention of hyperoxia-mediated pulmonary inflammation in neonatal rats by caffeine*. European Respiratory Journal, 2013. **41**(4): p. 966-973.
212. Köroğlu, Ö., et al., *Anti-inflammatory effect of caffeine is associated with improved lung function after lipopolysaccharide-induced amnionitis*. Neonatology, 2014. **106**(3): p. 235-240.
213. Kim, Y.J., et al., *Protective Effect of Aminophylline against Cigarette Smoke Extract-Induced Apoptosis in Human Lung Fibroblasts (MRC-5 Cells)*. Basic & clinical pharmacology & toxicology, 2011. **109**(1): p. 17-22.
214. Schwarzschild, M.A., et al., *Neuroprotection by caffeine and more specific A2A receptor antagonists in animal models of Parkinson's disease*. Neurology, 2003. **61**(11 Suppl 6): p. S55-61.
215. Wang, L. and L. Lu, *Pathway-specific effect of caffeine on protection against UV irradiation-induced apoptosis in corneal epithelial cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007. **48**(2): p. 652-60.
216. Ramirez, F. and H.C. Dietz, *Extracellular microfibrils in vertebrate development and disease processes*. J Biol Chem, 2009. **284**(22): p. 14677-81.
217. Zilberberg, L., et al., *Specificity of latent TGF- $\beta$  binding protein (LTBP) incorporation into matrix: Role of fibrillins and fibronectin*. Journal of cellular physiology, 2012. **227**(12): p. 3828-3836.
218. group, S., *Interactions of growth factors with the extracellular matrix*.
219. Hynes, R.O. and A. Naba, *Overview of the matrisome—an inventory of extracellular matrix constituents and functions*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2012. **4**(1): p. a004903.
220. Yang, Q., et al., *Cloning of Rat Fibrillin-2 cDNA and Its Role in Branching Morphogenesis of Embryonic Lung*. Developmental Biology, 1999. **212**(1): p. 229-242.
221. James, C.G., et al., *Expression profiling of dexamethasone-treated primary chondrocytes identifies targets of glucocorticoid signalling in endochondral bone development*. BMC Genomics, 2007. **8**.

222. Albertine, K.H., *Progress in understanding the pathogenesis of BPD using the baboon and sheep models*. Semin Perinatol, 2013. **37**(2): p. 60-8.
223. Chetty, A., et al., *Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and IGF-1 receptor (IGF-1R) expression in human lung in RDS and BPD*. Pediatr Pulmonol, 2004. **37**(2): p. 128-36.
224. Fowden, A.L., *The insulin-like growth factors and fetoplacental growth*. Placenta, 2003. **24**(8-9): p. 803-12.
225. Skinner, A.M., et al., *Growth and growth factors in premature infants receiving dexamethasone for bronchopulmonary dysplasia*. Am J Perinatol, 1997. **14**(9): p. 539-46.
226. Gatford, K.L., et al., *Repeated betamethasone treatment of pregnant sheep programs persistent reductions in circulating IGF-I and IGF-binding proteins in progeny*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008. **295**(1): p. E170-8.
227. Atkinson, S.A., *Special nutritional needs of infants for prevention of and recovery from bronchopulmonary dysplasia*. J Nutr, 2001. **131**(3): p. 942S-946S.
228. Capoluongo, E., et al., *Increased levels of IGF-1 and beta2-microglobulin in epithelial lining fluid of preterm newborns developing chronic lung disease. effects of rhG-CSF*. Int J Immunopathol Pharmacol, 2006. **19**(1): p. 57-66.
229. Hansen-Pupp, I., et al., *Continuous longitudinal infusion of rhIGF-1/rhIGFBP-3 in extremely preterm infants: Evaluation of feasibility in a phase II study*. Growth Horm IGF Res, 2017. **36**: p. 44-51.
230. Dani, C., et al., *Recombinant human (rh) IGF-1/rhIGFBP-3 for prevention of bronchopulmonary dysplasia*. 2017, Eur Respiratory Soc.
231. Hellstrom, A., et al., *Role of Insulinlike Growth Factor 1 in Fetal Development and in the Early Postnatal Life of Premature Infants*. Am J Perinatol, 2016. **33**(11): p. 1067-71.
232. Berg, T., et al., *Glucocorticoids increase C/EBPbeta activity in the lung epithelium via phosphorylation*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **334**(2): p. 638-45.
233. Poli, V., *The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions*. J Biol Chem, 1998. **273**(45): p. 29279-82.
234. Roos, A.B., T. Berg, and M. Nord, *A Relationship between Epithelial Maturation, Bronchopulmonary Dysplasia, and Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. Pulm Med, 2012. **2012**: p. 196194.
235. Yang, Z., et al., *Expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in human fetal lung and regulation of its expression by interleukin-1beta and cortisol*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(1): p. 306-13.
236. Chen, S., et al., *CTGF disrupts alveolarization and induces pulmonary hypertension in neonatal mice: implication in the pathogenesis of severe bronchopulmonary dysplasia*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2011. **300**(3): p. L330-40.
237. Chou, H.C., Y.T. Li, and C.M. Chen, *Human mesenchymal stem cells attenuate experimental bronchopulmonary dysplasia induced by perinatal inflammation and hyperoxia*. Am J Transl Res, 2016. **8**(2): p. 342-53.
238. Fehrholz, M., C.P. Speer, and S. Kunzmann, *Caffeine and rolipram affect Smad signalling and TGF-beta1 stimulated CTGF and transgelin expression in lung epithelial cells*. PLoS One, 2014. **9**(5): p. e97357.
239. Kunzmann, S., et al., *Antenatal inflammation induced TGF-beta1 but suppressed CTGF in preterm lungs*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. **292**(1): p. L223-31.

240. Rong, M., et al., *Inhibition of beta-catenin signaling protects against CTGF-induced alveolar and vascular pathology in neonatal mouse lung*. *Pediatr Res*, 2016. **80**(1): p. 136-44.
241. Collins, J.J., et al., *Antenatal glucocorticoids counteract LPS changes in TGF-beta pathway and caveolin-1 in ovine fetal lung*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2013. **304**(6): p. L438-44.
242. Fehrholz, M., et al., *Caffeine modulates glucocorticoid-induced expression of CTGF in lung epithelial cells and fibroblasts*. *Respir Res*, 2017. **18**(1): p. 51.
243. Jonsson, B., et al., *Downregulatory cytokines in tracheobronchial aspirate fluid from infants with chronic lung disease of prematurity*. *Acta Paediatrica*, 2000. **89**(11): p. 1375-1380.
244. Shahzad, T., et al., *Pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia: when inflammation meets organ development*. *Mol Cell Pediatr*, 2016. **3**(1): p. 23.
245. Swantek, J.L., M.H. Cobb, and T.D. Geppert, *Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is required for lipopolysaccharide stimulation of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) translation: glucocorticoids inhibit TNF-alpha translation by blocking JNK/SAPK*. *Mol Cell Biol*, 1997. **17**(11): p. 6274-82.
246. Mobius, M.A. and B. Thebaud, *Cell Therapy for Bronchopulmonary Dysplasia: Promises and Perils*. *Paediatr Respir Rev*, 2016. **20**: p. 33-41.
247. O'Reilly, M. and B. Thebaud, *Stem cells for the prevention of neonatal lung disease*. *Neonatology*, 2015. **107**(4): p. 360-4.

## 8 ANHANG

### 8.1 ETHIKVOTUM

Der Ethikantrag mit der Nummer 195-07 wurde von der Ethikkommission der LMU München genehmigt.

### 8.2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

11 $\beta$ -HSD1	11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 1
$\alpha$ SMA	$\alpha$ -smooth muscle actin
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung
AIS	Amnioninfektionssyndrom
ANOVA	analysis of variance, Varianzanalyse
ANS	Atemnotsyndrom
APGAR	Score zur Beurteilung der postnatalen Adaptation von Neugeborenen
APS	Ammoniumpersulfat
BM	Betamethason
BMP	Bone morphogenetic protein
BPD	Bronchopulmonale Dysplasie
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
CDH6	Cadherin6
C/EBP $\beta$	CCAAT/enhancer-binding protein $\beta$
CO	Control/Kontrolle
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease/ chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CPAP	Continuous Positive Airway Pressure
CRIB	clinical risk index for babies
CRP	C-reaktives Protein
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
CTRL	Control / Kontrolle
DM	Dexamethason

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonuclein acid
ECL-Reagenz	Enhanced Chemilumineszenz-Reagenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMT	Epithelialen-Mesenchymalen-Transition
EOS	Early onset Sepsis
Eppi	Eppendorf Reaktionsgefäße
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Fluorescence-activated cell sorter (Durchflusszytometer)
FBN2	Fibrillin 2
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FG	Frühgeborene(s)
FGF	fibroblast growth factor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat, Fluoreszenzfarbstoff
FSC	Forward Scatter, Forwärtsstreulicht
GG	Geburtsgewicht
GH	Wachstumshormon / Growth Hormone
GPC4	Glypican 4
h	Stunde
HC	Hydrocortison
HFO	Hochfrequenzoszillation
HRP	horseradish peroxidase
I.E./IE	Internationale Einheiten
i.t.	Intratracheal
IGF	Insulin-like Growth Factor
IGFBP4	Insulin-like Growth Factor Binding Protein 4
IL	Interleukin
IQ	Intelligenzquotient
IRS2	Insulin Receptor Substrate 2
IUGR	intrauterine growth restriction
IVH	Intraventrikuläre Hämorrhagie
JNK/SAPK	c-Jun N-terminale Kinase / stress-activated phosphokinase
KG	Körpergewicht
KO	Körperoberfläche

LT	Lebenstag
LTB4	Leukotriene B4
MMP	Matrix Metalloproteinase, interstitielle Kollagenase
MSC	Mesenchymale Stromazelle (mesenchymal stromal cell)
MYH	myosine heavy chain
nCLD	neonatale Chronic lung disease
NCPAP	non-invasive continuous positive airway pressure
NEC	Nekrotisierende Enterocolitis
NID2	Nidogen2
OP	Operation
p	Passage (Zellkultur)
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PBS	Phosphate buffered saline
PDA	Persistierender Ductus arteriosus
PDGF-R $\alpha$	Platelet-derived growth factor receptor $\alpha$
PE	Phycoerythrin
PFO	Persistierendes Foramen ovale
PGSH	Prostaglandinsynthesehemmer
PI	Propidiumjodid
PMA	post menstrual age
PPV	pressure ventilation
Pred	Prednisolon
PVD	pulmonal vascular disease
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVL	Periventrikuläre Leukomalazie
RDS	Respiratory distress syndrome
RNA	Rbonuclein acid
ROP	Retinopathy of prematurity/ Frühgeborenenretinopathie
rpm	rounds per minute
RSV	Respiratorische Synzytial-Virus
SDS	sodium dodecyl sulfate/ Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standardfehler (standard error of the mean)
SGA	small for gestational age

sICAM-1	Soluble Intercellular Adhesion Molecule 1
SNAP/SNAPPE	Score for Neonatal Acute Physiology with Perinatal Extension
SSC	Side Scatter, Seitwärtsstreulicht
SSW	Schwangerschaftswoche
STIKO	Ständige Impfkommission
TBS	Tris-Buffered Saline
TBST	Tris-Buffered Saline and Tween 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF	Transforming growth factor
TIMP-1	tissue inhibitor of metalloproteinases
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
VEGF	vascular endothelial growth factor

### 8.3 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1-1: Anteil an BPD erkrankter Kinder nach Geburtsgewicht .....	- 9 -
Abbildung 1.1-2: Alveolarisierung in Abhängigkeit einer Surfactanttherapie der Frühgeborenen (FG) mit BPD.....	- 12 -
Abbildung 1.1-3: Darstellung der Entwicklung des Bronchialbaumes.....	- 13 -
Abbildung 3.2-1: Baseline Wachstumsgeschwindigkeit verschiedener Zelllinien .	- 37 -
Abbildung 3.2-2: Auswertung einer xCELLigence-Messung.....	- 45 -
Abbildung 3.2-3: Qualitativer Vergleich eines xCELLigence- und eines Cellscreen- Experiments.....	- 47 -
Abbildung 3.2-4: Schematische Darstellung eines vom Durchflusszytometer erfassten Lichtimpulses .....	- 49 -
Abbildung 3.2-5: Auswertung einer Durchflusszytometrie-Analyse .....	- 49 -
Abbildung 3.2-6: Histogramm zur Darstellung des Zellzyklus.....	- 51 -
Abbildung 3.2-7: Unterscheidung zwischen G0- und G1-Phase über den Gehalt an Cyclin D1 .....	- 52 -
Abbildung 3.2-8: Vergleich des Zellwachstums mittels BrdU.....	- 53 -
Abbildung 3.2-9: Ermittlung der Apoptoserate mittels Durchflusszytometrie .....	- 54 -
Abbildung 3.2-10: Histogramme zur Bestimmung der Oberflächenmarker mittels Durchflusszytometrie .....	- 55 -

Abbildung 3.2-11: Quantifizierung von Proteinbanden nach Western Blotting .....	59 -
Abbildung 4.1-1: Vergleich des Effekts unterschiedlicher Konzentrationen von Dexamethason (DM) auf das Zellwachstum bei verschiedenen Konzentrationen von FCS im Kulturmedium .....	62 -
Abbildung 4.2-1: Ermittlung der Auswirkung von Dexamethason (DM) in verschiedenen Konzentrationen auf das Zellwachstum einzelner MSC-Zelllinien mittels Cellscreen .....	63 -
Abbildung 4.2-2: Ermittlung der Auswirkung von Betamethason (BM), Prednisolon (Pred) oder Hydrocortison (HC) auf das Zellwachstum einzelner MSC-Zelllinien mittels Cellscreen .....	64 -
Abbildung 4.2-3: Darstellung der mittels xCELLigence ermittelten Proliferation unter dem Einfluss verschiedener Kortikosteroide aller gemessenen MSC-Zelllinien .....	65 -
Abbildung 4.2-4: Wirkung von Surfactant, Vitamin A oder Coffein auf das Wachstum der MSC .....	67 -
Abbildung 4.2-5: Darstellung des mit dem xCELLigence ermittelten Einflusses von Surfactant auf die Proliferation von MSC .....	68 -
Abbildung 4.2-6: Vergleich der Proliferation durch Einbau und Quantifizierung von BrdU in der DNA .....	69 -
Abbildung 4.2-7: Zeitlich parallele Proliferationsmessung mittels xCELLigence zur BrdU-Analyse .....	70 -
Abbildung 4.2-8: Lichtmikroskopische Beurteilung des Einflusses von Dexamethason (DM) und Surfactant auf die Spontanproliferation der MSC .....	71 -
Abbildung 4.2-9: Mittels xCELLigence ermittelte Zellproliferation als Validierung zur Aufnahme konsekutiver lichtmikroskopischer Bilder .....	72 -
Abbildung 4.3-1: Analyse des Einflusses verschiedener BPD-Therapeutika auf den Zellzyklus .....	74 -
Abbildung 4.3-2: Differenzierung zwischen der G0- und G1-Phase des Zellzyklus über Bestimmung der Expression von Cyclin D1 .....	75 -
Abbildung 4.3-3: Ermittlung der apoptotischen MSC, die mit Steroiden, Surfactant oder Coffein behandelt wurden, im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen .....	77 -
Abbildung 4.4-1: Lichtmikroskopischer Vergleich der äußeren Zellform der MSC	78 -
Abbildung 4.4-2: Einfluss von Dexamethason auf die Zelldifferenzierung .....	80 -

Abbildung 4.4-3: Immunfluoreszenzfärbung verschiedener Strukturproteine im Vergleich stimulierter und unstimulierter MSC.....	- 81 -
Abbildung 4.4-4: Analyse der Expression verschiedener Strukturproteine im Westernblot .....	- 82 -
Abbildung 4.5-1: Anteil der durch die Medikamente (Surfactant, Dexamethason) regulierten Gene an allen ermittelten regulierten Genen .....	- 84 -
Abbildung 4.5-2: Vergleich der vier am stärksten regulierten Gene nach Micro-Array-Analyse von mit Dexamethason oder Surfactant behandelten MSC zur unbehandelten Kontrolle.....	- 85 -
Abbildung 4.5-3: Lokalisation der durch die regulierten Gene exprimierten Proteine .....	- 86 -
Abbildung 4.5-4: Übersicht der wichtigsten Funktionen der regulierten Gene .....	- 86 -
Abbildung 4.5-5: Veranschaulichung der Activation Scores interessanter Regulatoren der Endproteine in den MSC .....	- 87 -

#### 8.4 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1.1-1: Klinische Definition der neuen bronchopulmonalen Dysplasie.....	- 11 -
Tabelle 3.1-1: Eingesetzte Antikörper in Westernblot und Immunfluoreszenz.....	- 32 -
Tabelle 3.1-2: Eingesetzte Sekundärantikörper für Westernblot oder Immunfluoreszenz .....	- 33 -
Tabelle 3.1-3: Antikörper zur Oberflächenmarkerfärbung.....	- 33 -
Tabelle 3.2-1: Patientendaten der zu den Zelllinien gehörenden Probanden. ....	- 39 -
Tabelle 3.2-2: Dosierung und Plasmakonzentration verwendeter Steroide .....	- 42 -
Tabelle 3.2-3: Dosierung und geschätzte Konzentration im interstitiellen Lungengewebe der verwendeten Therapeutika.....	- 43 -
Tabelle 3.2-4: Stimulanzien mit verwendeten Konzentrationen .....	- 44 -
Tabelle 4.4-1: Eigenschaften von MSC im Vergleich zu Fibrozyten, Monozyten und Makrophagen, Vergleich der Oberflächenmarker von Kontroll-MSC und mit Dexamethason stimulierten Zellen.....	- 79 -

## 8.5 DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Harald Ehrhardt für die Bereitstellung des Themas, die fachliche Mitbetreuung und die geduldige ausdauernde Unterstützung bei meiner Arbeit. Vielen Dank auch für die Einblicke in die Versorgung der Frühgeborenen auf der neonatologischen Station des Klinikums Großhadern.

An dieser Stelle auch großen Dank an die Stationsärzte, besonders an Herrn Dr. Kai Förster und Herrn Matthias Klemme, für ihre Begleitung und Erklärungen zur Betreuung von Frühgeborenen auf der Station. So konnte ich einen guten Einblick in die komplexe Problematik der Frühgeburtlichkeit und die Versorgung der extremen Frühgeborenen gewinnen.

Vielen Dank an Herrn Tobias Reicherzer für die Gewinnung der Proben und Anzucht der Zellen sowie für die Einarbeitung in verschiedene Labortechniken. Großer Dank gilt auch Frau Prof. Dr. Irmela Jeremias für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und Geräte ihres Labors sowie für die Hilfsbereitschaft durch ihr Laborteam. Ebenfalls auch Danke an Frau PD Dr. Anne Hilgendorff mit Team für Ihre Unterstützung und Bereitstellung des Fluoreszenzmikroskops.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Melanie Markmann für die Microarray-Analyse und Auswertung unserer Proben im Labor der Justus-Liebig-Universität Gießen, sowie Dr. Hamid Hossain und seinen Mitarbeitern für die Möglichkeit dazu.

Herzlichen Dank auch an meinen Ehemann, meine Familie und meine Freunde für die kontinuierliche und ausdauernde Unterstützung und Motivation bei meiner Arbeit. An dieser Stelle möchte ich noch einen besonderen Dank an Susi für ihre Unterstützung im Labor sowie für anschließende Tipps bei der Verfassung der Arbeit aussprechen und an Franca für die Überprüfung meiner statistischen Analysen.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Mehaffey, Carla

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

*Einfluss verschiedener Therapeutika der BPD-Prävention auf Wachstum und  
Phänotyp von mesenchymalen Stromazellen der Lunge von extrem kleinen  
Frühgeborenen*

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

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

München, 29.12.2019

---

Ort, Datum

Carla Mehaffey

---

Unterschrift