

Aus dem  
Comprehensive Pneumology Center  
des Helmholtz Zentrum München  
und der Universität München  
Leitung: Prof. Dr. Dr. h.c. Erika von Mutius

***Untersuchung des Effekts von Zigarettenrauch auf die  
plazentale Genexpression im Mausmodell***

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

vorgelegt von  
Louisa Caroline Sarica  
aus  
Düsseldorf  
Jahr  
2024

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichtersteller:

Mitberichtersteller:

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:

Dekan:

Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung:

*Meinen Eltern*

*Emin*

*Rafael*

# ***Inhaltsverzeichnis***

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>6</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>8</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>10</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>12</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>14</b>
<b>1.1 Klinischer Hintergrund .....</b>	<b>14</b>
1.1.1 Epidemiologie.....	14
1.1.2 Zigarettenrauch und fötale Gesundheit.....	14
1.1.3 Risikofaktor Rauchen in der Schwangerschaft.....	15
1.1.4 Prävention .....	16
<b>1.2 Immunsystem .....</b>	<b>16</b>
1.2.1 T-Zell vermittelte Immunität .....	16
1.2.2 T-Zell Subpopulationen (Th1/Th2/Th17/Treg) .....	17
1.2.3 T-Zell Differenzierung durch Transkriptionsfaktoren Tbx21, Rorc, Gata3, Foxp3 .....	19
1.2.4 Allergische Erkrankungen und Asthma bronchiale .....	20
1.2.5 Th1/Th2/Th17/Treg Modell in der Schwangerschaft .....	21
<b>1.3 Plazenta.....</b>	<b>22</b>
1.3.1 Übersicht .....	22
1.3.2 Aufbau der Plazenta .....	22
1.3.3 Epigenetische Veränderungen und Transgenerationenproblem .....	23
<b>1.4 Insulin-like growth factor (IGF) Achse .....</b>	<b>24</b>
<b>2 Fragestellung/Zielsetzung .....</b>	<b>26</b>
<b>3 Material und Methoden.....</b>	<b>28</b>
<b>3.1 Materialien .....</b>	<b>28</b>
3.1.1 Geräte, Zusatzmaterialien, Software.....	28
3.1.2 Substanzen .....	30
3.1.3 Kits .....	31
<b>3.2 Methoden .....</b>	<b>32</b>
3.2.1 Das Rauchmodell .....	32
Die Rauchmaschine .....	32
Versuchstiere .....	33
Ablauf Rauchzyklus.....	33
Sectio und Natürliche Geburt.....	34
3.2.2 mRNA Isolierung aus murinem Plazentagewebe .....	35
3.2.3 Quantifizierung und Überprüfung der Reinheit der mRNA .....	36

Spektrophotometrie.....	37
RNA Agarose Gelelektrophorese.....	37
3.2.4 Reverse Transkription .....	39
3.2.5 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR).....	40
Housekeeping Gene .....	41
Primer.....	42
Bestätigung der Effizienz (E <sub>amp</sub> >1,90) vorhandener Primer mit Plazenta-cDNA .....	44
Durchführung qPCR.....	44
Relative Quantifizierung der Genexpression nach der PCR.....	46
3.2.6 Statistische Methoden .....	47
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>48</b>
<b>4.1 Physiologische Konsequenzen des Zigarettenrauchens während der Schwangerschaft .....</b>	<b>48</b>
4.1.1 Gewichtsverlauf der CS Mäuse und Air Mäuse.....	51
4.1.2 Geburtsgewichte der Nachkommen.....	52
<b>4.2 Genexpressionsstudien .....</b>	<b>53</b>
4.2.1 Qualitätskontrolle der extrahierten mRNA.....	54
Nanodrop .....	54
Gelelektrophorese.....	55
4.2.2 Primereffizienzen.....	56
4.2.3 mRNA Expression der Transkriptionsfaktoren.....	57
Tbx21 .....	58
Gata3 .....	59
Rorc.....	60
Igf1 .....	61
Igf1bp3 .....	61
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>62</b>
<b>5.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse.....</b>	<b>62</b>
<b>5.2 Stärken, Schwächen und Limitationen .....</b>	<b>62</b>
<b>5.3 Vergleich mit anderen Studien.....</b>	<b>63</b>
<b>5.4 Rauchen beeinflusst das mütterliche Immunsystem in der Schwangerschaft.....</b>	<b>64</b>
<b>5.5 Entwicklung von Asthma und Allergien.....</b>	<b>66</b>
<b>5.6 IGF .....</b>	<b>69</b>
<b>6 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>72</b>
<b>7 Affidavit.....</b>	<b>82</b>
<b>8 Danksagung .....</b>	<b>83</b>
<b>9 Lebenslauf.....</b>	<b>84</b>

## Zusammenfassung

Aktives Rauchen während der Schwangerschaft kann Mutter und Kind großen Schaden zufügen. Die intrauterine Exposition von Zigarettenrauch gilt als eine der Hauptrisikofaktoren im späteren Leben eine Asthmaerkrankung zu entwickeln und kann der Auslöser für diverse Schwangerschaftskomplikation sein. Die initiale Beeinträchtigung der Lungenentwicklung könnte eine spätere Asthmaerkrankung begünstigen. Der Effekt von intrauteriner Nikotinexposition auf die komplexen immunologischen Vorgänge und die sich daraus ergebenden Konsequenzen sind bis heute noch nicht vollständig erforscht. Im Hinblick auf die recht hohe Prävalenz von Nikotinkonsum in der Schwangerschaft, mit denen daraus resultierenden gesundheitlichen Folgen, zeigt auf, wie immens wichtig Forschung in diesem Gebiet ist.

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen der Rauchexposition auf die Expression bestimmter Gene in der Plazenta zu untersuchen. Zum einen wurde untersucht, ob es zu einer Veränderung immunologisch wichtiger Transkriptionsfaktoren Tbx21 (Th1), Gata3 (Th2), Rorc (Th17) und Foxp3 (Treg) kommt. Veränderungen in der Expression dieser Gene könnten sich negativ auf das sich entwickelnde Immunsystem auswirken und somit das Risiko einer späteren Asthmaerkrankung erhöhen. Zum anderen wurde untersucht, inwiefern die Expression von Genen, die für die Wachstumsentwicklung des Fötuses wichtig sind (Igf1, Igfbp3) durch die Rauchexposition dereguliert werden. Neben den Genexpressionsstudien wurden im Rahmen des Rauchmodells auch die Gewichtsentwicklung der trächtigen Mütter und die Geburtsgewichte der Nachkommen gemessen.

Im Rahmen dieser Studie wurde ein bereits durch unsere Arbeitsgruppe etabliertes Rauchmodell genutzt. Schwangere Mäuse (CS Mäuse) wurden ab Tag 2,5 der Paarung bis zum Kaiserschnitt am Tag 18,5 täglich Tabakrauch exponiert. Dabei wurde aktives Rauchen durch eine Rauchmaschine simuliert. Das Gewicht der weiblichen Mäuse wurde täglich gemessen.

Zur Vorbereitung der Genexpressionsanalysen wurde mRNA aus murinem Plazentagewebe isoliert und im nächsten Schritt mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Nach der Etablierung von Referenzgenen konnte die Genexpression von T-Helferzell-spezifischen-, sowie GH/IGF1-spezifischen

Transkriptionsfaktoren mittels qPCR untersucht werden. Die Daten wurden mit Graph-Pad Prism (Version 7) und Microsoft Excel berechnet und statistisch ausgewertet (Mann-Whitney U Test, unpaired t-Test) Das statistische Signifikanzniveau wurde auf 5 Prozent gesetzt.

Die intrauterine Rauchexposition führte bei den rauchexponierten Mäusen im Gegensatz zu den Kontrollmäusen zu einer geringeren Gewichtszunahme, sowie zu niedrigeren Geburtsgewichten bei den CS Nachkommen. Bei den Genexpressionsstudien wurde der Transkriptionsfaktor Tbx21 (Th1) auf mRNA-Ebene in Plazenten von Mäusen nach Rauchexposition signifikant stärker exponiert als bei den Kontrollmäusen.

Das mütterliche Immunsystem spielt eine Schlüsselrolle für den Erfolg der Schwangerschaft. Die Veränderung der Tbx21-Expression in der Plazenta demonstriert, dass Rauchen in der Schwangerschaft das Immunsystem lokal beeinflussen kann.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Ausdifferenzierung von naiven CD4+ T-Zellen. Naive CD4+ T-Vorläuferzellen können sich je nach Signalweg in spezifische Th1, Th2, Th17-Effektor, regulatorische T-Zellen und NKT-Zellen differenzieren[19, 20].	18
Abbildung 2 Schematische Abbildung von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren für die CD4+ T-Zelldifferenzierung[17, 19][17]	20
Abbildung 3 Anatomie der Plazenta (Grays Anatomy 1918).	23
Abbildung 4 Rauchmaschine (Teague Enterprises, CA, USA)	33
Abbildung 5 Timeline	34
Abbildung 6 RNA Isolierung[72]	35
Abbildung 7 Thermo Fisher Scientific NanoDrop 1000 Spectrophotometer	37
Abbildung 8 Ablauf Polymerasekettenreaktion	41
Abbildung 9 Gewichtsverlauf der schwangeren CS Mäuse (grau) und der Air Mäuse (blau) während der Schwangerschaft	51
Abbildung 10 Geburtsgewicht der Nachkommen nach intrauteriner CS (orange) oder AIR (blau) Exposition nach Geschlechtern getrennt, statistischer Test durch unpaired t-Test (*p<0,05; **p<0,005; ***p<0,005), Mittelwerte +/- SD	52
Abbildung 11 Gelelektrophorese zur Überprüfung der RNA Qualität von RNA 32-52 (Tabelle 15).	56
Abbildung 12 Tbx21 mRNA Expression in der Plazenta; p<0.05; unpaired t-Test; Mittelwerte (+/-SD).	58
Abbildung 13 Gata3 mRNA Expression in der Plazenta; unpaired t-Test; Mittelwerte (+/-SD)	59
Abbildung 14 Rorc mRNA Expression in der Plazenta; unpaired t-Test; Mittelwerte (+/-SD)	60
Abbildung 15 Igf1 mRNA Expression in der Plazenta; unpaired t-Test; Mittelwerte (+/-SD)	61

Abbildung 16 Igfbp3 mRNA Expression in der Plazenta; unpaired t-Test; Mittelwerte ( $\pm$ SD).....61

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte und Verbrauchsgegenstände. ....	28
Tabelle 2: Software. ....	29
Tabelle 3: Substanzen. ....	30
Tabelle 4: Kits. ....	31
Tabelle 5: TBE: TRIS-Borat-EDTA-Puffer, TRIS: Tris-hydroxymethyl-aminome- than, Borat: Anion der Borsäure, EDTA: Ethylendiamintetraessigsäu- re. ....	38
Tabelle 6: RNA Ladepuffer. ....	38
Tabelle 7: gDNA Eliminationsschritt. ....	39
Tabelle 8: RT Mastermix (Kit der Firma QIAGEN). ....	40
Tabelle 9: Sequenzen der Zielgene. ....	43
Tabelle 10: Sequenzen der Referenzgene. ....	43
Tabelle 11: Reaktionsansatz für die PCR. ....	44
Tabelle 12: Ablauf des RT-qPCR Programms. ....	46
Tabelle 13: Schwangerschaftscharakteristika. #Mean±SD, *analysiert in nicht- schwangeren Mäusen ....	49
Tabelle 14: Auflistung der Tiere für die Genexpressionsstudien. ....	53
Tabelle 15: NanoDrop Werte für die extrahierten RNAs. ....	55
Tabelle 16: Primer-Effizienzen. ....	57



## Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
APC	Antigenpräsentierende Zelle
CD	Cluster of differentiation
CO	Kohlenmonoxid
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CPC	Comprehensive Pneumology Center
CS	Cigarette smoke
DC	Denritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FC	Fold Change
GH	Wachstumshormon
Hb	Hämoglobin
hCG	Humanes Choriongonadotropin
HPL	Humanes Plazentalaktogen
IFN	Interferon
IGF	Insuline-like growth factor
IL	Interleukin
IUGR	Intrauterine Wachstumsretardierung
IVR	Intervillöser Raum
KHK	Koronare Herzkrankheit
MHC	Major histocompatibility complex
mRNA	Messenger RNA
NKT	Natürliche Killer-T-Zellen
NTC	No template control
OD	Optische Dichte
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCR	Polymerase- Kettenreaktion
PRAMS	Pregnancy Risk Assessment Monitoring System
qPCR	Quantitative Echtzeit PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
so.	siehe oben
SGA	Small for gestational age

SIDS	Sudden infant death syndrome
STAT	Signal Transducer and Transcription
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
Th Zelle	T-Helfer-Zelle
Treg	T-Regulations-Zellen

# 1 Einleitung

## 1.1 Klinischer Hintergrund

### 1.1.1 Epidemiologie

Der Konsum von Zigaretten in der Schwangerschaft ist auch heute noch eine der wichtigsten vermeidbaren Ursachen für Kindersterblichkeit und –morbidity. Obwohl die Zahl der Raucherinnen in der Schwangerschaft über die letzten 20 Jahre gesunken ist, rauchen immer noch circa 11% der Schwangeren in Deutschland[1]. Laut dem amerikanischen „Pregnancy Risk Assessment Monitoring System (PRAMS)“ rauchten 2010 circa 10.7% der befragten schwangeren Frauen in den USA[2]. In den europäischen Ländern liegt der Anteil bei 4-26%[3]. In der asiatischen Bevölkerung ist das Konsumieren von Zigaretten während der Schwangerschaft weniger verbreitet. Aufgrund der Größe der asiatischen Bevölkerung sind es jedoch zahlentechnisch sehr viele Frauen, die in der Schwangerschaft rauchen. Die Quoten der Raucherinnen in den USA, die während der Schwangerschaft aufhören, sind mit 54% und denen, die in den ersten 6 Monaten nach der Geburt wiederanfangen mit 44% trotz internationaler Aufklärungskampagnen ernüchternd[4]. Daher, ist es von hoher Relevanz die Konsequenzen und weitreichenden biologischen und gesundheitlichen Effekte von pränataler Nikotinexposition weiter zu erforschen[5].

### 1.1.2 Zigarettenrauch und fötale Gesundheit

Im Jahre 1997 stellte das Bundesverfassungsgericht fest, dass Rauchen der Gesundheit schadet. Es ist ein gesicherter Risikofaktor für zahlreiche Krankheiten wie Krebs, chronische Lungenerkrankungen, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, neurologische Erkrankungen, und Viele mehr. Im Zigarettenrauch befinden sich bis zu 12.000 verschiedene Stoffe[6]. Sie enthalten eine Vielzahl an toxischen Komponenten, einschließlich Kohlenmonoxid (CO), Cadmium und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen. Die Giftstoffe können den Fetus direkt, als auch indirekt beeinträchtigen. Der Großteil der Komponenten kann die Plazentaschranke überwinden[7]. Auch die Plazentaentwicklung kann negativ betroffen sein. Dennoch ist noch nicht klar erforscht, welche Inhaltsstoffe des Zigarettenrauchs, welchen Effekt im Ungeborenen auslösen[8].

### 1.1.3 Risikofaktor Rauchen in der Schwangerschaft

Rauchen während der Schwangerschaft gefährdet Mutter und Kind. Wie es auf vielen Zigarettenpackungen steht, mittlerweile auch mit Bildern dargestellt, schadet Rauchen der Gesundheit. Nikotinexposition vor der Konzeption kann zu verminderter Fertilität und Verspätung der Empfängnis bei Frauen führen[9]. Mütterlicher Zigarettenkonsum während der Schwangerschaft erhöht das Risiko für Schwangerschaftskomplikationen (Plazenta praevia, vorzeitige Plazentaablösung, Frühgeburt) und den plötzlichen Kindstod (Sudden infant death syndrome SIDS)[10]. Im Jahre 2002 wurden 5-8% der Frühgeburten, 13-19% der „low-birth-weight“ Geburten, und 23-34% der plötzlichen Kindstode in den USA dem pränatalen Rauchen zugeschrieben[11]. Auch motorische, kognitive und sensorische Defizite kann man bei Kindern rauchender Mütter nachweisen[12].

Die Exposition des Fötus gegenüber Zigarettenkonsum in der Schwangerschaft kann zu strukturellen Veränderungen in der pulmonalen Entwicklung führen und so die Lungenfunktion des Neugeborenen erheblich beeinträchtigen[13]. Unter anderem dadurch kommt es zur Entwicklung von Erkrankungen wie Asthma in der Kindheit[14]. Eine Studie mit über 13.000 Menschen hat gezeigt, dass mütterliches Rauchen in der Schwangerschaft, neben mütterlichem oder väterlichem Asthma, häufigen respiratorischen Infekten, sowie Asthma in der Kindheit, Risikofaktoren für eine reduzierte Lungenfunktion im späteren Leben und eine erhöhte Prävalenz für chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (COPD) darstellen[15].

Die durch Rauchen in der Schwangerschaft ausgelösten medizinischen Konsequenzen wie z.B. Asthma bronchiale stellen ein großes gesundheitliches Problem der modernen Gesellschaft dar. Rauchen erhöht nicht nur das Risiko für Krebserkrankungen immens, sondern auch für kardiovaskuläre (KHK, pAVK), und chronische Erkrankungen (COPD, chronische Bronchitis, Magengeschwüre). Dies führt nicht nur zu einer gesundheitlichen Belastung und reduzierter Lebensqualität für die Betroffenen, sondern auch zu einer finanziellen Belastung der Allgemeinheit bei beträchtlichen Arzneimittel- und Krankenhauskosten.

### **1.1.4 Prävention**

Schwangere Frauen und deren Konsumverhalten stellen eine wichtige Zielgruppe der Prävention dar, um die Kindersterblichkeit und -morbidity aufgrund von Nikotinkonsum zu senken. Sowohl der Konsum von Tabak, als auch von anderen Suchtmitteln wie Alkohol während der Schwangerschaft und Stillzeit sind für die Mutter und ihr Kind mit großen gesundheitlichen Risiken verbunden[16]. Die einzige wirksame Möglichkeit, tabakbedingte Schäden für das ungeborene Kind zu verhindern, ist der konsequente Verzicht auf aktives und passives Rauchen während der Schwangerschaft. Gesundheitspolitisch besteht daher bei Rauchen in der Schwangerschaft und Stillzeit dringender Handlungsbedarf. In den USA wird das „Pregnancy Risk Assessment Monitoring System“ (PRAMS) genutzt, um Daten durch Fragebögen zum Rauchverhalten vor, während und nach der Schwangerschaft zu sammeln[17]. Diese Daten können benutzt werden um Gesetze und Richtlinien zum Tabakkonsum neu zu entwickeln, zu überprüfen und zu evaluieren.

Die größte Schwierigkeit beim Präventionsansatz besteht darin, dass viele Frauen sich der Risiken des Zigarettenkonsums während der Schwangerschaft und der möglichen Folgen nicht bewusst sind. Der Fokus der Präventionsarbeit sollte auf Aufklärungsarbeit der behandelnden Ärzte gelegt werden, die ihre schwangeren Patientinnen adäquat beraten sollten.

## **1.2 Immunsystem**

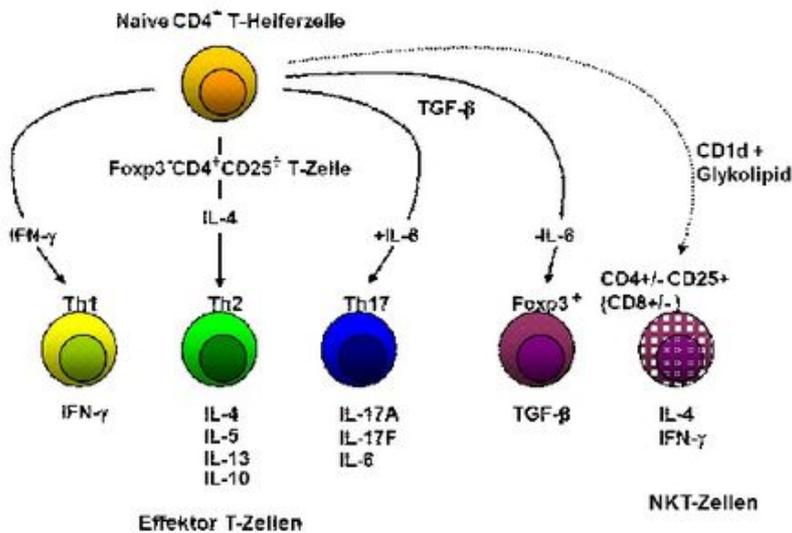
### **1.2.1 T-Zell vermittelte Immunität**

Das Immunsystem ist das biologische Abwehrsystem des Menschen. Es funktioniert durch ein komplexes Zusammenspiel von verschiedenen Organen, Zelltypen und Molekülen. Es gibt zwei Mechanismen der Immunabwehr: die angeborene Immunabwehr, und die adaptive Immunabwehr. Neben den antigenpräsentierenden Zellen (APC), sind die T-Lymphozyten und die B-Lymphozyten die Hauptbestandteile der adaptiven Immunabwehr. Die B-Lymphozyten sind für die humorale Immunität zuständig, wobei Antikörper gebildet werden. Die T-Zell-vermittelte zelluläre Immunität ist ein Prozess, bei dem antigenspezifische T-Lymphozyten virale, bakterielle, oder parasitäre Infektionen oder maligne Zellen eliminieren. Außerdem ist sie an der Ausbildung von Autoimmunkrankheiten be-

teilt. Die Vorläuferzellen der T-Zellen gelangen aus dem Knochenmark über das Blut in den Thymus. Dort findet die Reifung und Selektion der T-Zellen statt. Naive T-Lymphozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche den T-Zell-Rezeptor (TCR), welchem Peptide eines Antigenes über den MHC (major histocompatibility complex) von APC-Zellen präsentiert werden. Es kommt zur Aktivierung der T-Zellen bei Bindung des TCR an das spezifische Antigen. Diese Aktivierung findet in den sekundär-lymphatischen Organen (z.B. Milz, Lymphknoten) statt. Für die optimale Aktivierung brauchen T-Zellen co-stimulatorische Signale, die sie über die Interaktion von Oberflächenmolekülen auf APC und T-Zellen erhalten. Die durch die aktivierten T-Zellen vermittelten Effektorfunktionen stellen die zelluläre Immunität dar[18]. Einige dieser Effektorfunktionen sind die Transplantatabstoßung, Abtötung virusinfizierter Zellen, verzögerte Allergie, und die Tumorüberwachung.

### **1.2.2 T-Zell Subpopulationen (Th1/Th2/Th17/Treg)**

Die reifen T-Zellen (CD3+) werden in zwei Subpopulationen mit charakteristischem Phänotyp eingeteilt: die CD4-positiven T-Lymphozyten mit ihrer Helferfunktion, sowie die CD8-positiven T-Lymphozyten mit ihrer zytotoxischen Funktion. Das CD4 Molekül bindet an die MHC-Klasse-II und das CD8 Molekül an die MHC-Klasse-I (CD8) um die antigenspezifische Interaktion des T-Zellrezeptors mit dem Peptid-MHC-Komplex zu verstärken.



**Abbildung 1** Ausdifferenzierung von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Naive CD4<sup>+</sup> T-Vorläuferzellen können sich je nach Signalweg in spezifische Th1, Th2, Th17-Effektor, regulatorische T-Zellen und NKT-Zellen differenzieren[19, 20].

Aktiviert CD4-positive T-Zellen können sich je nach vorangegangenen Signalen durch Interleukine und Zytokine in verschiedene Effektorpopulationen differenzieren: Th1, Th2, Th17 und regulatorische T-Zellen (Abb. 1). Diese charakterisieren sich durch das Profil der produzierten Zytokine und die Expression von Oberflächenmolekülen. Th1- Zellen produzieren hauptsächlich IFN-γ und Interleukin 2 (IL-2). Dadurch steigern sie die pro-inflammatorische Zell-vermittelte Immunabwehr und bekämpfen intrazelluläre Viren und Bakterien. Th2-Zellen sezernieren IL-4,-5,-6,-10 und -13, und fördern die nicht-inflammatorischen Immunantworten. Th2-Zellen kontrollieren die Differenzierung von B-Zellen in antikörperbildende Plasmazellen und die Aktivierung von Eosinophilen. Eine weitere Subpopulation der T-Helferzellen sind die Th17- Zellen. Diese sezernieren IL-17, und aktivieren neutrophile Granulozyten. Ähnlich zu den Th1-Zellen vermitteln sie proentzündliche Effekte, sie spielen jedoch eher eine Rolle bei chronisch-entzündlichen Immunprozessen wie Autoimmunerkrankheiten[19]. Eine weitere spezielle Subgruppe der CD4-positiven Zellen sind die regulatorischen T-Zellen auch Treg genannt. Deren Existenz war bis in die 90ziger Jahre umstritten, obwohl schon in den 70er Jahren, durch Richard K. Gershon, von T-Suppressorzellen berichtet worden war[21]. Die Aufgabe der Treg-Zellen ist die Unterdrückung einer laufenden Immunantwort. Diese Regulation findet haupt-

sächlich durch IL-10 und TGF- $\beta$  statt. In einem gesunden Organismus verhindern sie die Entstehung von Autoimmunkrankheiten.

### **1.2.3 T-Zell Differenzierung durch Transkriptionsfaktoren Tbx21, Rorc, Gata3, Foxp3**

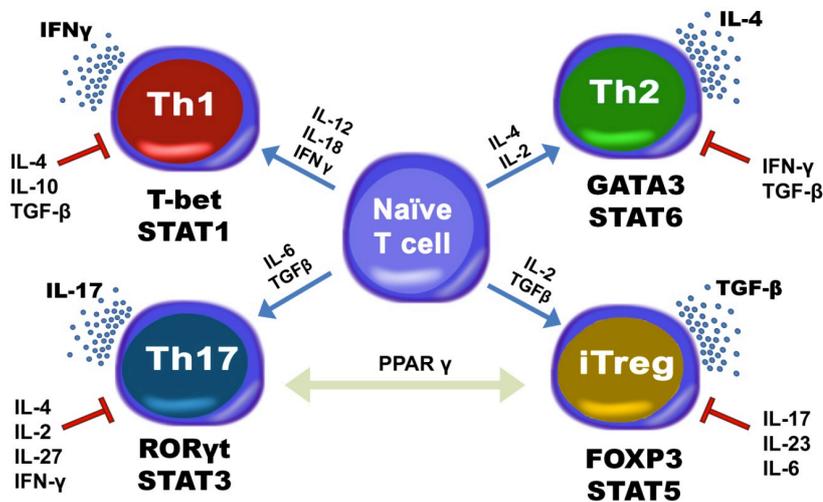
Jeder T-Helfer-Zell Subtyp produziert spezifische Zytokine, welche die Expression von Transkriptionsfaktoren wie die STAT Proteine (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) und Mastertranskriptionsfaktoren induzieren. Diese wiederum beeinflussen die Differenzierung und Proliferationen einer Subpopulation. Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die für die Initiation und Regulation einer Gentranskription verantwortlich sind[22] (Abb. 2). Sie binden an eine spezifische DNA Sequenz und aktivieren oder deaktivieren so den Promotor. In dieser Studie wurden unter anderem Tbx21, Gata3, Rorc und Foxp3 untersucht. Eine Dysregulation in der Aktivierung oder Differenzierung von T-Helferzellen kann die Ursache verschiedenener immunvermittelten Krankheiten und Autoimmunkrankheiten sein[23].

Die Stimulus-abhängige Signalkaskade über IL-12, IFN- $\gamma$  und weiteren Transkriptionsfaktoren wie STAT1 und STAT4 führt über den Schlüsseltranskriptionsfaktor Tbx21 zu der Proliferation von Th1-Zellen[24]. Die dadurch ausgeschütteten Zytokine führen neben der Aufrechterhaltung der Th1-Immunantwort, auch zu einer Inhibierung der Th2-Differenzierung[25]. Eine Dysregulation der Th1-Antwort ist mit immunpathologischen Erkrankungen wie Diabetes Typ 1 und Rheumatischer Arthritis assoziiert[26].

Im Gegensatz zu Tbx21 ist Transkriptionsfaktor Gata3 für die Th2- vermittelte Immunantwort zuständig. Über IL-4 und STAT6 wird Gata3 induziert, wobei die Th2-Differenzierung initiiert, und die Th1-Differenzierung gehemmt wird[27]. Th2 Zellen unterstützen u.a. die humorale Immunantwort und Rekrutierung von Eosinophilen[28]. Eine unkontrollierte Th2-Differenzierung kann ursächlich für atopische und allergische Erkrankungen wie Asthma sein[29].

Rorc kodiert für den Mastertranskriptionsfaktor ROR $\gamma$ t, der u.a. über einen Signalweg mit IL-6 und TGF- $\beta$  induziert wird[30]. Er ist ein wesentlicher Bestandteil der Differenzierung naiver T-Zellen zu Th17-Zellen. Über IL-23 und STAT3 wird die Th17-Immunantwort stabilisiert. Die erst kürzliche Entdeckung von

IL17-produzierenden Th17-Zellen als potenter pro-inflammatorischer T-Zell-Subtyp erweitert das Verständnis pathophysiologischer Vorgänge, die zuvor nicht nur durch die Th1/Th2 Dichotomie erklärt werden konnten[31].



**Abbildung 2 Schematische Abbildung von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren für die CD4+ T-Zelldifferenzierung[17, 19][17]**

Bezüglich der Differenzierung und Funktion der regulatorischen T-Zellen (Treg) spielt der Transkriptionsfaktor Foxp3 eine entscheidende Rolle[32]. Neben Foxp3, ist die Expression des Oberflächenmoleküls CD25 charakteristisch für Treg-Zellen. Die stabile Foxp3 Expression ist eine essentielle Voraussetzung der suppressiven Aktivität der Tregs. In einer Studie zeigten sich Foxp3-defiziente Mäuse („*scurfy mice*“) mit letalen lymphoproliferativen Erkrankungen[33]. Die Differenzierung von Treg-Zellen wird auf einen Signalweg über u.a. das Zytokin TGF- $\beta$  induziert[34]. Die dadurch ausgelöste Signalkaskade führt zur Expression von Foxp3 und Treg-Differenzierung. Es wird vermutet, dass die Entwicklung von Th1- und Th2-Zellen von den regulatorische T-Zellen inhibiert werden kann.

#### 1.2.4 Allergische Erkrankungen und Asthma bronchiale

Asthma bronchiale ist wie oben genannt eine der Krankheiten, die u.a. durch Rauchen in der Schwangerschaft bei den Nachkommen verursacht werden können. Es ist eine sehr häufig vorkommende chronische-inflammatorische Erkrankung der Bronchien, bei der eine Bronchialobstruktion ausgelöst wird. Die Prävalenz dieser Erkrankung ist in den letzten 20 Jahren drastisch angestiegen. Nach Schätzungen der Global Initiative for Asthma sind weltweit ca. 300 Millio-

nen Menschen erkrankt. Asthma ist durch wiederkehrende Episoden von Atemnot und Symptomen wie Pfeifen, Husten, und bronchiale Hyperreaktivität- bzw. -reagibilität charakterisiert[35]. Die chronische Entzündung verursacht den Umbau der Lunge. Das sogenannte „*airway remodelling*“ kann langfristig zu einer irreversiblen Lungenerkrankung führen.

Asthma ist eine multifaktorielle Erkrankung, welche wahrscheinlich durch genetische und umweltbedingte Faktoren begünstigt wird. Es werden unter anderem zwei Formen der Asthma Erkrankung unterschieden: die atopische (allergische) Form und die nicht- atopische Form. In der entwickelten Welt leiden circa 50% der Erkrankten an der atopischen Form[36], die einer erhöhten Th2-Immunantwort zu Grunde liegen soll. Die verstärkte Aktivierung von Th2-Zellen führt zu einer erhöhten Produktion der Th2-spezifischen Zytokine (IL-4, IL-5, und IL-13), verminderte Produktion der Th1-spezifischen Zytokinen (IFN- $\gamma$ ) und einer beeinträchtigten Funktion der regulatorischen T-Zellen[37]. Auch die proinflammatorischen Th17-Zellen sollen eine Rolle in der Entstehung von allergischen Erkrankungen wie Asthma eine Rolle spielen[38].

### **1.2.5 Th1/Th2/Th17/Treg Modell in der Schwangerschaft**

Während der Schwangerschaft steht das Immunsystem der Mutter einer Herausforderung gegenüber: der Fetus ist aus immunologischer Sicht ein semiallogenes Transplantat[39]. Eine Abstoßung des Fetus mit seiner Plazenta wird jedoch in einer erfolgreichen Schwangerschaft unterdrückt, in dem sich das mütterliche Immunsystem durch Anpassungsmechanismen adaptiert. Störende Einflüsse wie z.B. Rauchen können diese Anpassungsmechanismen beeinträchtigen und so zu negativen Auswirkungen auf die Schwangerschaft führen[40].

Über viele Jahre wurde die mütterliche Toleranz durch das Th2-Phänomen erklärt[41]: Um die Abstoßung des Fetus zu vermeiden wird die Th1-Immunantwort, die u.a. für zytotoxische Transplantatabstoßung zuständig ist, unterdrückt und die Th2-Immunantwort verstärkt. Seit dem jedoch die Th1/Th2-Dichotomie auf das Th1/Th2/Th17/Treg-Modell erweitert wurde[42], wird auch eine Veränderung hinsichtlich der zirkulierenden Th17- und regulatorischen T-Zellen durch die Schwangerschaft angenommen[43]. Regulatorische T-Zellen inhibieren die Proliferation und Zytokinproduktion in CD4-positiven T-Zellen und CD8-positiven zytotoxischen Zellen, Produktion von Immunglobulinen in B-Zellen, die zy-

totoxische Aktivität der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), sowie die Reifung von dendritischen Zellen, wodurch folglich immunologische Toleranz induziert wird[44]. Dies spielt eine wichtige Rolle in der Immunmodulation in der Schwangerschaft.

## **1.3 Plazenta**

### **1.3.1 Übersicht**

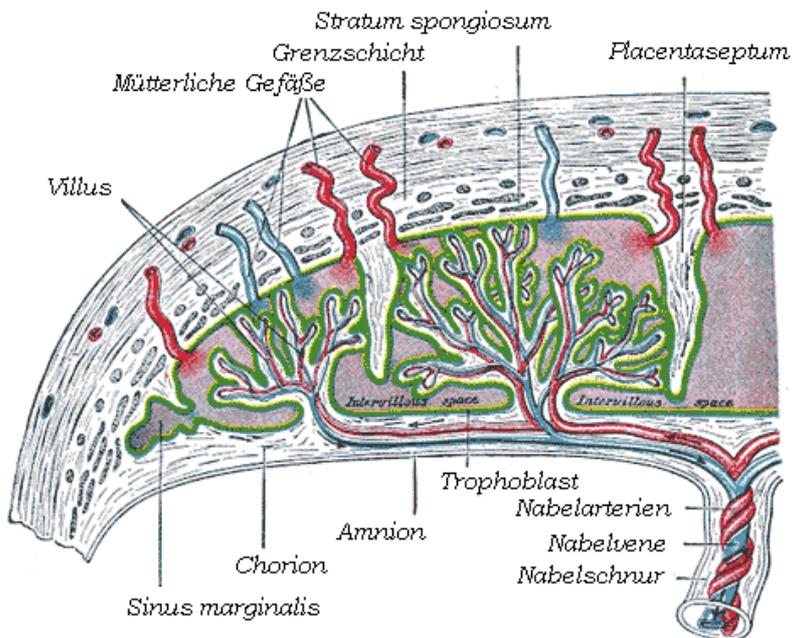
Die Plazenta ist als Schnittstelle zwischen mütterlichem und fetalem Kreislauf für den wechselseitigen Gas- und Stoffaustausch zuständig. Sie spielt eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft und das fetale Wachstum. Die Plazenta stellt auch einen Schutz gegenüber Pathogenen dar [45]. Die Plazenta produziert zudem wichtige Hormone: hCG, Östrogen, Progesteron und HPL[45]. Eine Störung der Plazenta kann zu Schwangerschaftsabbruch, sowie auch zu Entwicklungsstörungen des Fetus und später in der Kindheit führen[46]. Die einwandfreie Funktion der Plazenta ist von feinregulierten Genen abhängig, die das Wachstum und Entwicklung ihrer strukturellen Komponente beeinflussen[47].

### **1.3.2 Aufbau der Plazenta**

Die Plazenta ist ein Organ, welches während der Schwangerschaft im Uterus entsteht und aus einem mütterlichem (Pars materna) und einem kindlichem Anteil (Pars fetalis) besteht. Sie dient dem Stoffaustausch zwischen fetalem und mütterlichem Blut.

Im 4. Monat der Schwangerschaft nimmt die Plazenta ihre definitive Struktur an. Die reife Plazenta ist ein scheibenförmiges Organ mit einem Durchmesser von etwa 20cm, einer Dicke von 2-4cm, und wiegt 350-700g. Sie unterteilt sich in die Basalplatte (mütterlicher Teil), die Chorionplatte (zur Chorionhöhle gewandt) und die zwischen den beiden Platten gelegenen Zottenbäume mit dem intervillösen Raum (IVR). Die Zotten sind von einer undurchlässigen Zellschicht mit Synzytiotrophoblasten überzogen, wodurch fetales und mütterliches Blut streng getrennt sind und der Fetus immunologisch geschützt ist. Die Basalplatte begrenzt den intervillösen Raum zur Gebärmutterwand hin. Der IVR ist zur Amnionhöhle durch die Chorionplatte begrenzt. Die Zottenbäume hängen baumartig

ausgehend von der Chorionplatte in den IVR und enthalten die fetalen Blutgefäße. Der IVR ist das Zirkulationskompartiment für das mütterliche Blut.



**Abbildung 3 Anatomie der Plazenta (Grays Anatomy 1918).**

### 1.3.3 Epigenetische Veränderungen und Transgenerationenproblem

Prä- und perinatale Einflüsse spielen neben der epigenetischen Disposition eine entscheidende Rolle für Gesundheit und Krankheit im späteren Leben. Die zukünftige Funktionsweise von Organen und Organsystemen kann in bestimmten kritischen Entwicklungsphasen durch Einwirkungen von Außenfaktoren wie Drogen oder Ernährung dauerhaft verändert bzw festgelegt werden. Diesen Prozess bezeichnet man als fetale Programmierung[17]. Im Falle einer Störung dieser „Programmierung“, zum Beispiel durch maternales Rauchen in der Schwangerschaft, können im späteren Leben chronische Erkrankungen entstehen. Bereits vor vielen Jahren (1990) stellte David Barker in diesem Zusammenhang die „Barker-Hypothese“ auf, in der er die plazentare Minderversorgung und dadurch ein niedriges Geburtsgewicht mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung eines metabolisches Syndroms und von kardiovaskulären Erkrankungen in Verbindung brachte[48]. Die erfolgreiche Entwicklung der Plazenta ist entscheidend für das optimale Wachstum und die Reifung des Fetus/ Embryos. Maternales Rauchen und andere Einflüsse auf die Schwangerschaft

interferieren mit dem Wachstum und der Funktion der Plazenta, was zu negativen Schwangerschaftsausgängen wie niedrigem Geburtsgewicht führen kann. Es wird angenommen, dass dies durch eine Veränderung der plazentaren epigenetischen Muster erklärt werden könnte[49]. Bei der epigenetischen Veränderung wird der Genotyp nicht verändert[50]. Die Veränderungen lassen sich nur im Phänotyp beobachten. Epigenetische Regulationsmechanismen sind unter anderem die DNA-Methylierung und die Histon-Modifikation[51]. Solche Mechanismen steuern die Aktivität der Gene, ohne die Basensequenz des DNA-Moleküls zu verändern. Es wird angenommen, dass diese epigenetischen Veränderungen über Generationen vererbt werden können, und es womöglich so zu einem erhöhten Risiko für die Entwicklung chronischer Erkrankungen wie Asthma in nachkommenden Generationen führen kann[37]. Äußere Einflüsse, die die plazentare Genexpression durch epigenetische Veränderungen beeinflussen, können schädliche „downstream“ Effekte auf die Funktion der Plazenta haben, und somit auch auf den sich entwickelnden Fetus[52]. Veränderungen in den DNA-Methylierungsmustern der Plazenta könnten die Verbindung zwischen in utero Exposition und nachteiligen Gesundheitsfolgen bei den Nachkommen sein[53].

Es wird vermutet, dass großmütterliches- bzw. -väterliches Rauchen während der Schwangerschaft ausreicht, um die Gewichtsentwicklung von Enkelkindern zu beeinflussen, auch wenn die Mutter während der Schwangerschaft nicht geraucht hat[54, 55]. Außerdem glaubt man, dass großmütterliches Rauchen das Asthmarisiko bis in die dritte Generation beeinflussen kann[56-58]. Durch diese mögliche Transgenerationenvererbung würden auch hocheffektive Anti-rauchkampagnen Jahrzehnte brauchen, um effektiv zu sein.

#### **1.4 Insulin-like growth factor (IGF) Achse**

Mütterliches Rauchen in der Schwangerschaft ist ein anerkannter Risikofaktor für intrauterine Wachstumsretardierung (IUGR), ein niedriges Geburtsgewicht (Small for Gestational Age, SGA)[59, 60] und einer eingeschränkten Lungenfunktion[61] bei den Nachkommen, die im späteren Leben zu einer COPD führen kann. Insulinähnliche Wachstumsfaktoren (Insulin-like growth factors, IGF) wirken auf Wachstum und Differenzierung von Zellen[62]. Diese Polypeptide weisen eine hohe Sequenzhomologie zu Insulin auf. Außerdem spielt das

IGF-System, vor allem Igf1, eine große Rolle in der Lungenentwicklung und fetalem Wachstum[62]. Das IGF-System inkludiert das Wachstumshormon (GH, Somatotropin), Igf1 und Igf2 Peptide, Membranrezeptoren (Igf1R, Igf2R), und verschiedene Insulin-like growth factor-Bindungsproteine (Igfbp). Die hier in der Arbeit untersuchten Igf1 und Igfbp3 sind Bestandteil der somatotropen GH-Igf-Achse. Igf1 wird hauptsächlich nach Stimulation von Somatotropin von der Leber synthetisiert und sezerniert, aber auch lokal können extrahepatische Zellen z.B. Plazentazellen Igf1 produzieren[63]. Bei Igfbp3 handelt es sich um eines von sechs Igf-Bindungsproteinen, welches die höchste Affinität zu Igf1 aufweist. Experimente mit Igf1-defizienten Mäusen haben nicht nur eine schlechtere Lungenentwicklung zeigen können, sondern auch beeinträchtigt fetales und plazentares Wachstum[64]. Zahlreiche Studien haben eine positive Beziehung zwischen der Igf1- und Igfbp3- Konzentration in Nabelschnurblut und dem Geburtsgewicht in regulär verlaufender Schwangerschaft feststellen können[65, 66]. Jedoch wurden in Schwangerschaften mit IUGR niedrigere Nabelschnurblutkonzentrationen von Igf1 als bei Schwangerschaften mit normalem Geburtsgewicht gefunden[67, 68]. *Pringle et al.* haben 2005 berichtet, niedrigere Konzentrationen an Igf1 und Igfbp3 im Nabelschnurblut rauchender Mütter im Vergleich nichtrauchender Mütter detektiert zu haben[69]. Pränatale Rauchexposition wird schon länger mit SGA Babies und IUGR verlinkt, was wiederum mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Asthma in Verbindung gebracht wird[70]. Aus diesen Gründen ist es naheliegend zu erforschen, in wie weit die Expression von Genen, die für die Wachstumsentwicklung (Igf1 etc.) des Fötus wichtig sind, durch die Rauchexposition in der Plazenta dereguliert werden.

## 2 Fragestellung/Zielsetzung

Die intrauterine Exposition mit Zigarettenrauch während der Schwangerschaft birgt viele Konsequenzen und gilt als eine der Hauptrisikofaktoren im späteren Leben eine Asthmaerkrankung zu entwickeln. Ein weiterer Effekt dieser Exposition ist ein verringertes Körper- und Lungengewicht der Nachkommen bei der Geburt. Diese initiale Beeinträchtigung der Lungenentwicklung könnte eine spätere Asthmaerkrankung begünstigen. Zum besseren Verständnis der zu Grunde liegenden Mechanismen hat unsere Arbeitsgruppe ein Model der in utero Rauchexposition in der Maus etabliert und die Genexpression am Ende einer Mausschwangerschaft am Tag 18.5 (Durchschnittliche Schwangerschaftsdauer einer Maus sind 20 Tage) in der Lunge von exponierten und nicht-exponierten Föten mittels Microarray-Chips untersucht.

Im hier untersuchten Teilprojekt habe ich mich mit der Frage befasst, wie sich die Rauchexposition auf die Expression bestimmter Gene in der Plazenta mit möglicherweise nachteiligen Folgen für den sich entwickelnden Fetus auswirkt. Zum einen wurde untersucht, ob es zu einer Veränderung immunologisch wichtiger Transkriptionsfaktoren Tbx21 (Th1), Gata3 (Th2), Rorc (Th17) und Foxp3 (Treg) kommt. Veränderungen dieser Gene könnten sich negativ auf das sich entwickelnde Immunsystem auswirken und somit das Risiko einer späteren Asthmaerkrankung erhöhen. Zum anderen wurde untersucht, inwiefern die Expression von Genen, die für die Wachstumsentwicklung des Fetus wichtig sind (Igf1, Igfbp3) durch die Rauchexposition dereguliert werden.

Hypothesen:

- 1) Rauchexposition beeinflusst immunologische und wachstumssteuernde Parameter in der Plazenta.
- 2) Rauch-induzierte Veränderungen in der mütterlichen Immunantwort und/oder im plazentalen Entwicklungsprogramm führen zu Veränderungen in der fötalen Entwicklung, die das Risiko für eine spätere Asthmaerkrankung erhöhen.



## 3 Material und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Geräte, Zusatzmaterialien, Software

Tabelle 1: Geräte und Verbrauchsgegenstände.

Geräte/Equipment	Name	Firma	Herkunft
Zentrifuge	5415R	Eppendorf	Hamburg (GER)
Tischzentrifuge			
Kühlschrank/Eis- fach	4°C	Liebherr	Biberach an der Riss (GER)
	-20°C	Liebherr	Biberach an der Riss (GER)
	-80°C	Eppendorf	Hamburg (GER)
Homogenisierer	MagnaLyser	Roche	Mannheim (GER)
Mastercycler	Mastercycler	Eppendorf	Hamburg (GER)
Real-time Thermo- cyclers	LightCycler 480	Roche	Mannheim (GER)
Spectrophotometer	Nanodrop1000	Thermo Fischer Scientific	Waltham (USA)
Rauchmaschine	TE-10	Teague Enterpri- ses	Davis (USA)
Zigaretten	3R4F Research Cigaret- tes	University of Ken- tucky	Kentucky (USA)
Tubes	1,5ml	Eppendorf	Hamburg (GER)
	0,5ml PCR Clean tubes	Eppendorf	Hamburg (GER)
PCR Platten	LightCycler480 Multiwell Plate 96	Roche	Mannheim (GER)
Abdeckfolie für PCR Platten	LightCycler 480 Sealing Foil	Roche	Mannheim (GER)
Pipetten	0,1-2,5µl	Eppendorf	Hamburg (GER)
	2-20µl	Eppendorf	Hamburg (GER)
	20-200µl	Eppendorf	Hamburg (GER)
	100-1000µl	Eppendorf	Hamburg (GER)
Pipettenspitzen	Diverse	Eppendorf	Hamburg (GER)

**Tabelle 2: Software.**

<b>Software</b>	<b>Firma</b>	<b>Herkunft</b>
GraphPad Prism version 7	GraphPad Software	San Diego (USA))
GenEx Software	MultiD Analyses AB	Göteborg (Schweden)
Microsoft Excel 2011	Microsoft	Redmond (USA)
NanoDrop Software	Thermo Fisher Scientific	Waltham (USA)
LightCycler480 Software	Roche	Mannheim (GER)

### 3.1.2 Substanzen

**Tabelle 3: Substanzen.**

<b>Substanzen</b>	<b>Firma</b>	<b>Herkunft</b>
RNA Later	Qiagen	Hilden (GER)
Phosphate buffered saline (PBS)	LifeTechnologies	Darmstadt (GER)
Tris	Carl Roth	Karlsruhe (GER)
Formamid, deionisiert	Carl Roth	Karlsruhe (GER)
SYBR Green II RNA	Lonza	Basel, (CHE)
QIAzol	Qiagen	Hilden (GER)
Chloroform		
Ethanol	Merck	Darmstadt (GER)
EDTA	Sigma-Aldrich	St.Louis (USA)
Borat		
Ketamin	CD-pharma	Quebec (CAN)
Agarose	Life Technologies	Darmstadt (GER)
Rnase AWAY Spray	Sigma-Aldrich	St.Louis (USA)
Destilliertes Wasser		
Rnase-freies Wasser	Qiagen	Hilden (GER)

### 3.1.3 Kits

Tabelle 4: Kits.

Name	Firma	Herkunft
<b>"RNeasy Mini Kit":</b> "Rneasy"-Mini-Spinsäulen Reaktionsgefäß "Collection Tubes 1,5ml" Reaktionsgefäß "Collection Tubes 2,0ml" "RNeasy Washing Buffer 1" (RW1-Puffer) "RNeasy Lysis Tissue Buffer" (RLT-Puffer) "RNeasy Purification Ethanol Buffer" (RPE-Puffer) Ribonuklease (Rnase)-freies Wasser	Qiagen	Hilden (GER)
<b>Quantitect Reverse Transcription Kit</b> "gDNA Wipeout Buffer" "Quantiscript Reverse Transcriptase" "Quantiscript RT Buffer" "RT Primer Mix"	Qiagen	Hilden (GER)
<b>LightCycler SYBR Green I MasterMix</b>	Roche	Mannheim (GER)

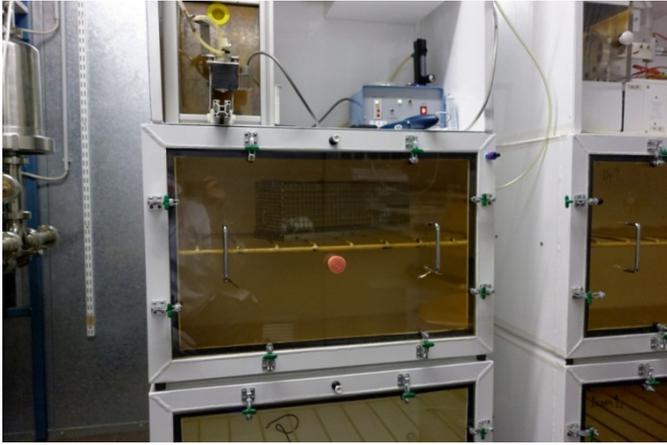
## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Das Rauchmodell**

Die Versuchsdurchführung am Rauchmodell erfolgte in Zusammenarbeit mit den Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Susanne Krauss-Etschmann. Die Tierversuche wurden durch die Regierung von Oberbayern genehmigt und entsprechend des geltenden Tierschutzgesetzes durchgeführt (TVA-AZ 91-11).

#### ***Die Rauchmaschine***

In unserem Rauchmodell wurde die Rauchmaschine TE-10 der Firma Teaque Enterprises (Davis, Ca, USA) benutzt. Die Rauchmaschine kann passives Rauchen (Rauch vom brennenden Ende der Zigarette, sog. ‚sidestream smoke‘) und aktives Rauchen (Rauch am Mundende der Zigarette, sog. ‚mainstream smoke‘) simulieren. Der Rauch wird über eine Membranpumpe in die Rauchkammer gezogen, wo die Mäuse dem Rauch exponiert sind. Um das menschliche aktive Rauchen zu simulieren, wurde die Maschine speziell eingestellt. Die Zigarette wird in Zügen geraucht, bestehend aus zwei Sekunden Rauch und vier Sekunden Luft. Es wurden Referenzzigaretten mit Standardfilter (3R4F) des Kentucky Tobacco Research und Development Center der University of Kentucky benutzt. Diese Zigaretten wurden Ende der 1960er speziell zu Forschungszwecken entwickelt[71]. Die durchschnittliche Partikel Konzentrationen (Total particulate matter) in der Expositions-kammer betrug im Durchschnitt 340 mg/m<sup>3</sup>. Es können maximal 60 Mäuse in der Expositions-kammer mit Zigarettenrauch exponiert werden (Abb. 4).



**Abbildung 4 Rauchmaschine (Teague Enterprises, CA, USA)**

### ***Versuchstiere***

8 Wochen alte Balb/c Mäuse wurden von *Charles River Laboratories* gekauft. Futter und Wasser war *ad libitum* vorhanden. Zur Verpaarung wurde eine männliche Maus mit ein oder zwei weiblichen Mäusen über Nacht in einen Käfig gesetzt. Männchen und Weibchen wurden nach einem Tag getrennt. Die potenzielle Schwangerschaft wurde visuell anhand des Vorhandenseins von koaguliertem Samen an der murinen Vagina geprüft. Der Tag der Verpaarung wurde als Tag -0,5 der Schwangerschaft festgelegt. Die weiblichen Mäuse wurden in zwei Gruppen eingeteilt: in CS Mäuse (cigarette smoke) und AIR Mäuse (Kontrollgruppe).

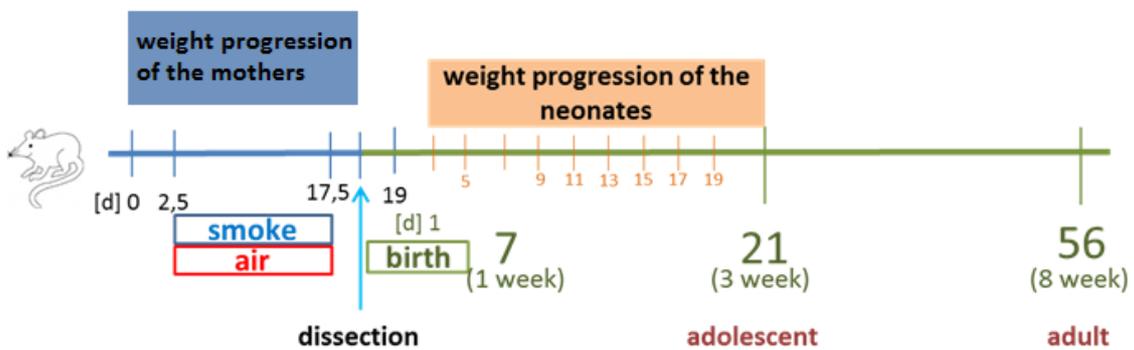
### ***Ablauf Rauchzyklus***

Die Rauchexposition der Mäuse wurde nach einer Ruhephase an Tag 2,5 begonnen. Die Gewichte der Mäuse wurden jeden Tag bis zum Ende der Schwangerschaft (Tag 18,5) bestimmt. Sowohl die CS Mäuse (mit Rauchexposition), als auch die Kontrollmäuse wurden jeweils in einen Gruppenkäfig umgesetzt. Die CS Mäuse wurden dann dem durch die Rauchmaschine simuliertem aktiven Rauchen in einem Zeitrahmen von circa 50 Minuten ausgesetzt. Dabei wurden zehn Zigaretten (Research cigarettes 3R4F, Kentucky University) pro Tag benutzt. Währenddessen wurden die Kontrollmäuse in normaler Raumluft gehalten, aber genau wie die CS Mäuse auch in einen baugleichen Käfig im Raum mit der Rauchmaschine umgesetzt, um Unterschiede zwischen den beiden Gruppen durch Handling/Stress auszuschließen. Nach dem Rauchzyklus

wurden die CS Mäuse noch für 20 Minuten in der Rauchkammer belassen, jedoch mit gefilterter Luft versorgt.

### **Sectio und Natürliche Geburt**

Am Tag 18,5 wurde bei den Mäusen eine Sectio durchgeführt (Abb. 5). Dazu wurden diese intraperitoneal mit einem Ketamin Cocktail, äquivalent zu 10% des Körpergewichts, anästhesiert. Neben den Plazenten, wurden auch die Milz und Lungen entnommen. Das Gewebe wurde in RNA Later® Flüssigkeit über Nacht bei 4°C gelagert und anschließend bei -20°C für RNA Isolation oder bei -80°C für längere Aufbewahrung gelagert.



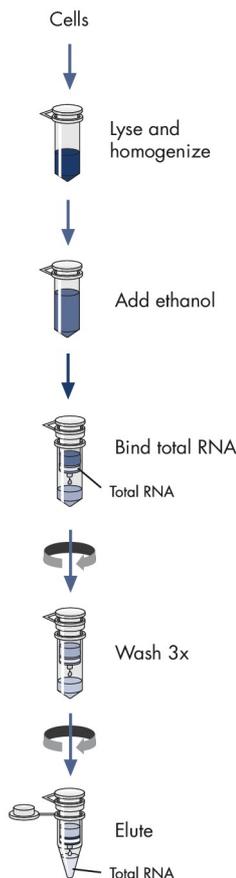
**Abbildung 5 Timeline**

In den Rauchrunden, bei denen eine natürliche Geburt anstatt der Sectio stattfand, wurden die Nachkommen das erste Mal nach 48h gewogen. Mutter und Nachkommen wurden für 2 Tage in Ruhe gelassen, um die natürliche Entstehung der Verbindung zwischen Mutter und Nachkommen nicht zu gefährden. Die Nachkommen wurden in den ersten drei Wochen nach Geburt jeden Tag gewogen

### 3.2.2 mRNA Isolierung aus murinem Plazentagewebe

Die RNA wurde mittels RNeasy Kit (QIAGEN) aus der Plazenta isoliert. Die Methode zur Isolierung von RNA beruht auf der Lyse der Zellen in einer chemischen Umgebung, in der RNasen denaturiert werden. Dieser Schritt erfolgte stets an einem RNA Arbeitsplatz.

#### RNeasy Mini Procedure



**Abbildung 6 RNA Isolierung[72]**

Das Gewebe wurde aus dem RNA Later® entnommen, mit einem sauberen Tuch abgetupft, und dann in spezielle Tubes mit Keramikkügelchen mit 700 µL QIAzol (Qiagen), ein Lysepuffer, transferiert. Anschließend erfolgte die Homogenisierung im Magna Lyser (Roche) nach festem Protokoll. Die Probe sollte nach der Homogenisierung 5 Minuten bei Raumtemperatur ruhen.

Zur mRNA-Isolation (Abb. 6) wurde 140µL Chloroform zugefügt und stark geschüttelt. Die Probe ruhte erneut für 3 min und wurde dann für 15 Minuten bei 4° in einer vorgekühlten Zentrifuge bei 12.000xg zentrifugiert. Die oberste wäss-

rige Phase mit der RNA wurde in ein neues Eppendorf Röhrchen mittels Pipette transferiert. Dem wurden 1,5 Volumen (525µL) 100% Ethanol hinzugefügt und gemischt. Es erfolgte der Transfer in die RNeasy Mini spin column (Qiagen) und Zentrifugation für 15 Sekunden bei Raumtemperatur bei 10.000xg. Die spin column sitzt dabei in einem Kollektionsröhrchen. In den nächsten Schritten wurden jeweils 700µL RWT Puffer (Qiagen), und 500µL RPE Puffer (Qiagen) zur Probe hinzugefügt und jeweils für 15 Sekunden bei 10.000xg zentrifugiert. Dann wurde nochmal 500µL RPE Puffer (Qiagen) beigemischt und für 2 Minuten bei 10.000xg zentrifugiert. Die Flüssigkeit im Kollektionsröhrchen wurde nach jeder Zentrifugation entfernt. Um die Säule zu trocknen wurde nochmal für 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Um die RNA aus der Membran der ‚spin column‘ zu extrahieren wurde noch zweimal 30µL RNase-freies Wasser der ‚column‘ hinzugefügt und nach einer Warteminute nochmal für je 1 Minute bei 10.000xg zentrifugiert. Die gewonnene RNA wurde in einem Eppendorf Röhrchen bis zur weiteren Analyse bei -80° aufbewahrt.

### **3.2.3 Quantifizierung und Überprüfung der Reinheit der mRNA**

Die RNA ist sehr empfindlich und durch die ubiquitär vorkommenden Nukleasen der ständigen Gefahr einer Degradierung unterworfen. Zur Überprüfung der Reinheit und Konzentrationsmessung der erzeugten RNA wurden spektrophotometrische und gelelektrophoretische Verfahren eingesetzt.

## **Spektrophotometrie**



**Abbildung 7 Thermo Fisher Scientific NanoDrop 1000 Spectrophotometer**

Der Nanodrop 1000 (ThermoFischer Scientific) (Abb. 7) ist ein Spektrophotometer für Mikrovolumen. Das Verfahren gibt Informationen über die Konzentration und die Reinheit der extrahierten RNA. Bei der Spektrophotometrie wird die optische Dichte (OD) bei dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren ( $\lambda=260\text{nm}$ ) sowie bei dem Absorptionsmaximum von Proteinen ( $\lambda=280\text{nm}$ ) gemessen. Eine Verunreinigung der Probe mit Proteinen wird durch den Quotienten der beiden optischen Dichten ermittelt. Eine A260/280 Ratio ist normalerweise zwischen 1,9 und 2,1 für RNA. Die 260/230 Ratio kann eine Verunreinigung mit anderen Molekülen wie Phenol anzeigen, die ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 230nm haben. Die Absorptionswerte wurde für jede RNA Probe (1 $\mu\text{L}$ ) mit dem Nanodrop ND-1000-Spektrophotometer gemessen. Der Vergleich der A260/A280- und A260/A230 Verhältnisse ist ein etabliertes Verfahren zur Bestimmung der Reinheit.

## **RNA Agarose Gelelektrophorese**

Bei der Agarose Gelelektrophorese werden die Nukleinsäuren entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Kleine Fragmente wandern schneller als größere Fragmente. Durch ihre Phosphatgruppe sind Nukleinsäuren negativ geladen, wodurch sie bei einer angelegten elektrischen Spannung in Richtung Pluspol (Anode) wandern. Die RNA wird durch den zugesetzten Farbstoff SYBR Green mit dem

Gel Doc TM System (Bio-Rad) sichtbar gemacht. Bei intakter RNA zeigen sich im Gel zwei deutliche Banden: die 18S- und 28S- Bande.

Das Agarose Gel (1,2%) wurde mit TBE Puffer (Tabelle 5) hergestellt. Die RNA Proben wurden vor der Elektrophorese mit einem Ladepuffer (Tabelle 6) versetzt, der einen Farbstoff (SYBR GreenII, Lonza) zur Markierung der Laufmittelfront erhält. Es wurde ein elektrisches Feld mit 90V für 45 Minuten angelegt. Im Anschluss wurden die RNA Banden im Agarose Gel mit dem Gel Doc System visualisiert.

**Tabelle 5: TBE: TRIS-Borat-EDTA-Puffer, TRIS: Tris-hydroxymethyl-aminomethan, Borat: Anion der Borsäure, EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure.**

<b>Material für TBE Puffer (für 1L)</b>		
450mM Tris base	(MW=121.14)	54.51g
445mM Borat	(MW=61.83)	27.51g
12.5mM EDTA-Na <sub>2</sub> (Titriplex III)	(MW=372.24)	4.65g

Der TBE Puffer wurde mit destilliertem Wasser auf 1000ml aufgefüllt.

**Tabelle 6: RNA Ladepuffer.**

<b>RNA Ladepuffer für Agarose Gel</b>	<b>1x</b>	<b>Finale Konzentration</b>
Formamid, deionisiert	18.0µl	60%
TBE Puffer	3.0µl	0.5x
SYBR Green II (1:100)	1,5µl	1:2000

Bei der RNA Gelelektrophorese ist das ungefähre 2:1-Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten der 28S- und 18S-RNA Bande ein Zeichen für eine gute RNA Qualität. Die 28S Bande sollte etwa doppelt so hell erscheinen wie die 18S-

Bande. Schlechtere Konzentrationen weisen auf eine Degradation der RNA Probe hin. Ein weiteres Zeichen einer Degradation wäre ein ausgeprägter, schmierartiger Verlauf innerhalb einer Bahn.

### 3.2.4 Reverse Transkription

Die reverse Transkription ist eine enzymatische Reaktion, bei der mRNA mittels des Enzyms Reverse Transkriptase in einzelsträngige cDNA (complementary Desoxyribonukleinsäure) umgeschrieben wird. Für die reverse Transkription wurde das Quantitect-Kit von Qiagen (Qiagen) benutzt. Im ersten Schritt wurde die noch vorhandene genomische DNA (gDNA) von den RNA Proben mit dem gDNA WipeOut Buffer (Tabelle 7) eliminiert. Für diese Reaktion wurde die Probe für 2 Minuten bei 42°C im MasterCycler (Eppendorf) inkubiert und anschließend auf Eis gelagert.

**Tabelle 7: gDNA Eliminationsschritt.**

<b>gDNA Eliminationsschritt für 1-2µg RNA/ für eine Probe</b>	
gDNA WipeOut Buffer, 7x	4,00µl
Template RNA (1-2µg) + Rnase-freies Wasser	24,00µl
<b>Total</b>	<b>28,00µl</b>

Der zweite Schritt war die reverse Transkription, wobei die mRNA in cDNA umgeschrieben wurde. Dazu wurde die jeweilige RNA Probe zu einem zuvor hergestellten Reverse Transkription Mastermix (Tabelle 8) pipettiert. Anschließend wurden die Proben bei 42°C für 30 Minuten, dann bei 95° für 3 Minuten im Mastercycler inkubiert und bei 4°C gelagert. Die enzymatische Reaktion findet bei 42°C statt, und die Inaktivierung bei 95°C.

**Tabelle 8: RT Mastermix (Kit der Firma QIAGEN).**

<b>Präparation Reverse Transkription Master Mix für 1-2µg RNA/eine Probe</b>	
QS Reverse Transkriptase	2,00µl
QS RT Puffer, 5x	8,00µl
RT Primer mix	2,00µl
<b>Total</b>	<b>12,00µl</b>

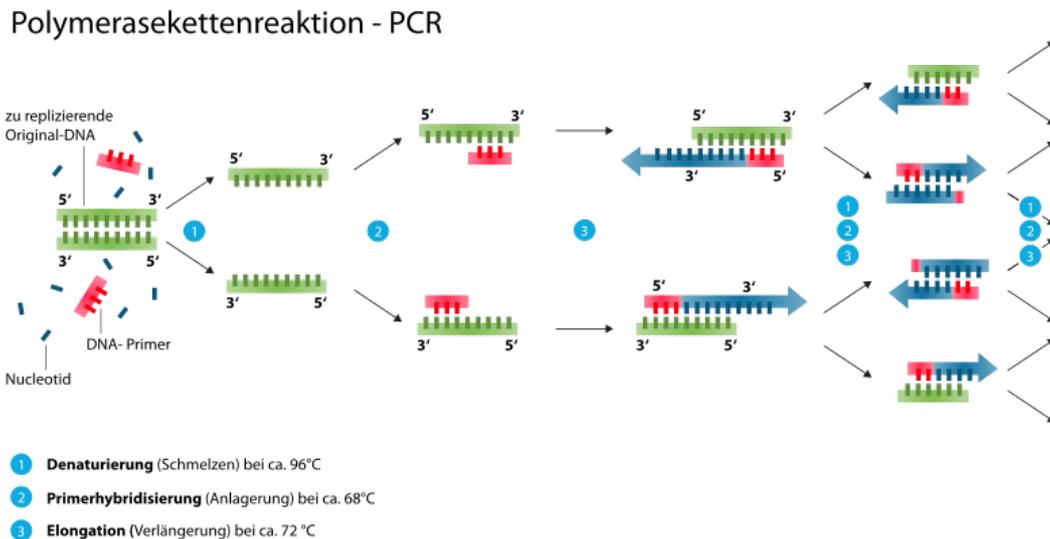
### **3.2.5 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)**

Die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) ist eine Methode zur Bestimmung der Genexpression. Sie beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die gewonnene DNA wird in Echtzeit quantifiziert, während andere quantitative PCR Methoden erst nach Beendigung des PCR-Ablaufes eine quantitative Auswertung vornehmen. Die Quantifizierung des PCR Produktes wird in der exponentiellen Phase mit Hilfe von der Messung von Fluoreszenz-Signalen durchgeführt. Die Fluoreszenzfarbstoffe wie SYBR Green oder Ethidiumbromid werden dem Reaktionsansatz hinzugefügt. Der Farbstoff interkaliert in die DNA, wodurch die Fluoreszenz des Farbstoffes zunimmt. Dementsprechend korreliert die Zunahme der Fluoreszenz proportional mit der Zunahme der Ziel-DNA von Zyklus zu Zyklus.

Ein Maß für die Quantität der vorliegenden DNA ist der  $C_T$ -Wert der qPCR. Der  $C_T$ -Wert bezeichnet hierbei den PCR-Zyklus (C="Cycle"), bei dem das Fluoreszenz-Signal erstmals einen festgelegten Schwellenwert (T="Threshold") übertrifft. Dies geschieht umso früher, je mehr von der zu amplifizierenden DNA im Probenmaterial vorhanden ist.

Die Polymerasekettenreaktion wird in einem Thermocycler durchgeführt und besteht aus etwa 20-50 Zyklen. Die zuvor revers transkribierte cDNA fungiert als Proben-DNA (Template-DNA) für die PCR. Ihr werden ein passendes Primerpaar, der Fluoreszenz Farbstoff und eine hitzestabile taq Polymerase hin-

zugegeben. Die Vervielfältigung einer der DNA beruht auf mehrfach wiederholten Zyklen bestehend aus der Denaturierung, der Primeranlagerung (Annealing) und der Verlängerung (Elongation) (Abb 8).



### Abbildung 8 Ablauf Polymerasekettenreaktion

Die Schmelzkurve folgt der Amplifikation und ist der letzte Programmpunkt der qPCR. Sie dient als Qualitätskontrolle der Reaktion. Die DNA wird bei hohen Temperaturen wieder aufgeschmolzen. Bei einer für das Amplikon spezifischen Schmelztemperatur zerfällt der Doppelstrang in zwei Einzelstränge und der Fluoreszenzfarbstoff (SYBR Green) wird freigesetzt. Die Änderung der Fluoreszenz wird registriert. Die Schmelzkurvenanalyse gibt Aufschluss darüber, ob Produkte einer bestimmten Länge gebildet wurden oder ob die Signale durch Verunreinigungen, zum Beispiel durch Primer-Dimere, verursacht wurden. Führen Verunreinigungen zu fehlerhaften Amplikons, erscheint der Peak nicht bei der für das Amplikon spezifischen Temperatur, sondern früher. Auch wenn die Primer nicht spezifisch genug sind, können sie mehrere verschiedene Sequenzen amplifizieren, somit würden sich mehrere Schmelzkurven für die Probe zeigen.

### **Housekeeping Gene**

Als Referenzgene („housekeeping genes“) werden Gene bezeichnet, die von Zellen immer in einer kontinuierlichen Menge exprimiert werden, und so in ihrer Konzentration gegenüber externen Einflüssen konstant bleiben. Die Ergebnisse

jeder Real-Time PCR können durch Störfaktoren beeinflusst werden. Diese reichen von Verfahrensvariationen, über unterschiedliche Ausgangsmengen durch Pipettierfehler und Qualitäten der cDNA, bis hin zu Effizienzunterschieden der Enzyme. Eine Korrektur dieser Faktoren ist für eine Quantifizierung notwendig. Die in dieser Arbeit durchgeführte Methode der Normalisierung der Expression des Target Gens zur Expression eines Referenzgens ist derzeit mit am Besten akzeptiert. Die Referenzgenkandidaten wurden vorher getestet, ob die Expression in der Plazenta durch Rauchexposition beeinflusst wurde. Die gebräuchlichen Referenzgene Hprt1, Tbp, Yhwaz, und 18S-rRNA wurden in dieser Arbeit getestet.

### **Primer**

Primer sind Oligonukleotide. Sie dienen als Startpunkt für DNA-replizierende Enzyme wie die DNA-Polymerase. Sie stellen mit ihrem 3'-Ende eine Hydroxygruppe für das Enzym zur Polymerisation weiterer Nukleotide zur Verfügung. Bei der In-vitro-Amplifikation von DNA (zB bei der PCR) lässt sich der zu amplifizierende DNA-Abschnitt mit Hilfe eines Primers festlegen. Dies setzt voraus, dass die Sequenz des Abschnitts bekannt ist, da die Primer durch ihren komplementären Aufbau zu bestimmten DNA Sequenzen, die zu vermehrende DNA Sequenz flankieren. Primer sollten in etwa 18-25 Nukleotide lang sein und der T<sub>m</sub>-Wert (Schmelztemperatur) für die PCR sollte zwischen 55° und 65° liegen. Um die Amplifikation von DNA Kontaminationsprodukten zu vermeiden, sollten Primer „Intron-übergreifend“ und daher spezifisch für cDNA sein. Sie sollten während der PCR miteinander keine Dimer (Primerpaare) ausbilden. Die hier benutzten Primer wurden aus anderen Projekten (Tabelle 9, 10) der Arbeitsgruppe übernommen.

**Tabelle 9: Sequenzen der Zielgene.**

<b>Primer</b>	<b>Sequenz (5'-3')</b>
Tbx21 fwd	CTCAGCAACCACCTGTTGTG
Tbx21 rev	ACATCCTGTAATGGCTTGTGG
Gata3 fwd	CTTATCAAGCCCAAGCGAAG
Gata3 rev	CATTAGCGTTCCTCCTCCAG
Rorc fwd	TGCAAGACTCATCGACAAGG
Rorc rev	AGGGGATTCAACATCAGTGC
Foxp3 fwd	TCAAGTACCACAATATGCGACC
Foxp3 rev	TAGGCGAACATGCGAGTAAAC
Igf1 fwd	CTGAGCTGGTGGATGCTCT
Igf1 rev	CTCATCCACAATGCCTGTCT
Igfbp3 fwd	AGAACTTCTCCTCCAGTC
Igfbp3 rev	GACTCAGCACATTGAGGAACT

**Tabelle 10: Sequenzen der Referenzgene.**

<b>Primer</b>	<b>Sequenz (5'-3')</b>
Hprt fwd	CAGGCCAGACTTTGTTGGAT
Hprt rev	ACGTGATTCAAATCCCTGAAGT
Tbp fwd	AATTGTACCGCAGCTTCAAAT
Tbp rev	ATGATGACTGCAGCAAATCG
Rn18sfwd	GCAATTATTCCCATGAACG
Rn18s rev	AGGGCCTCACTAAACCATCC
Yhwaz fwd	CCCACTCCGGACACAGAA
Yhwaz rev	ATCATATCGCTCTGCCTGCT

### **Bestätigung der Effizienz (E<sub>amp</sub>>1,90) vorhandener Primer mit Plazenta-cDNA**

Bevor die vorhandenen Primer benutzt wurden, wurde deren Effizienz mit Plazenta-cDNA getestet. Das Erstellen einer Standardkurve ist eine der gängigsten Methoden zur Effizienzerfassung. Für eine Standardkurve wurde eine Verdünnungsreihe (1:5, 1:50, 1:500, 1:5000) der eingesetzten Plazenta cDNA Menge in Triplikaten analysiert, um so die Amplifikationsrate bei unterschiedlichen Konzentrationen zu vergleichen. Die Effizienz E der Reaktion kann dann aus der Steigung („slope“) der Standardkurve berechnet werden:

$$E=10^{-1/slope}$$

Die optimale Primereffizienz ist 2,0. Dieser Wert bedeutet, dass in jedem Zyklus einer PCR eine Verdopplung der DNA stattfindet. Eine schlechte Effizienz indiziert zum Beispiel ein schlechtes Primer Design oder Fehler beim Pipettieren.

### **Durchführung qPCR**

Die qPCR wurde in meinem Projekt mit dem LightCycler480 System (Roche) durchgeführt. Auf 96-well Platten wurde ein Reaktionsansatz (Tabelle 11) pro ‚well‘ pipettiert. Jede DNA Probe wurde in Triplikaten getestet. Kontrollgruppen bestanden aus Wasser (No Template Control/NTC) und nicht revers-transkribierten Proben (RT-, gleicher Ansatz Enzym durch Wasser ersetzt).

**Tabelle 11: Reaktionsansatz für die PCR.**

<b>Präparation für die ‚wells‘ mit 2,60µl cDNA template (10 µl pro Well)</b>	
2x SYBR Green MasterMix	5,00µl
Forward Primer (10pmol/µl)	0,30µl
Reverse Primer (10pmol/µl)	0,30µl
H2O	1,80µl
<b>Total für 1x</b>	<b>7,40µl</b>

Die PCR Platten wurden für 2 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert, bevor sie in den LightCycler eingelegt worden sind. Das Programm (Tabelle 12) dauerte im Durchschnitt etwa 1,5 Stunden.

**Tabelle 12: Ablauf des RT-qPCR Programms.**

<b>qPCR Programm LightCycler 480 Roche</b>			
Denaturierung & Aktivierung	1x	95°C	10:00 min
Amplifikation	45x	95°C	00:10 min
		60°C	00:15 min
		72°C	00:10 min
		76°C	00:01 min Zeitpunkt der Messung
Schmelzpunkt Kurve	1x	95°C	00:05 min
		60°C	01:00 min
		99°C	-
Abkühlen	1x	40°C	00:10 min

### ***Relative Quantifizierung der Genexpression nach der PCR***

Zur Auswertung der qPCR Ergebnisse wurde die Methode der relativen Quantifizierung benutzt. Bei der relativen Quantifizierung wird die Genexpression eines Zielgens auf ein konstantes Housekeeping/Referenz Gen bezogen. Dies wird auch Normalisierung genannt[17]. Die Rechnungen wurden mit den Effizienz-korrigierten Ct-Werten aus der PCR im Programm Microsoft Excel durchgeführt. Die relative Expression der zu untersuchenden Gene in den behandelten Proben (CS) wurde auf Kontrollprobenmaterial (AIR) bezogen. Die Berechnung des Expressionsunterschiedes erfolgte über die  $\Delta\Delta C_T$  Methode. Dabei wurden im ersten Schritt die  $C_T$  Werte der Triplikate pro Probe gemittelt und effizienz-korrigiert. Anschließend wurde für jede untersuchte Probe der  $C_T$  Wert des Housekeeping Gens vom  $C_T$  Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert:

$$\Delta C_T = C_{T\text{Zielgen}} - C_{T\text{Referenzgen}}$$

Um zum  $\Delta\Delta C_T$  Wert (delta-delta  $C_T$ ) zu kommen, wurde von dem  $\Delta C_T$  Wert der CS Proben der  $C_T$  Wert der AIR Proben subtrahiert.

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{Behandlung}(CS) - C_T \text{Kontrolle}(AIR)$$

Der relative Expressionsunterschied der behandelten Probe zur Kontrollprobe wurde aus folgender Formel berechnet:

$$\text{RelativeExpression} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

### **3.2.6 Statistische Methoden**

Die Daten wurden mit GraphPad Prism (Version 7) und Microsoft Excel 2011 berechnet und statistisch ausgewertet. Die Graphen repräsentieren Mittelwerte $\pm$ SD. Statistische Signifikanz wird angenommen, wenn  $p \leq 0,05$ . Daten wurden zum Teil mit Mann-Whitney U Test oder „unpaired“ t-Test analysiert.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Physiologische Konsequenzen des Zigarettenrauchens während der Schwangerschaft**

Die folgenden Parameter und Diagramme zu den physiologischen Konsequenzen des aktiven Rauchens während der Schwangerschaft wurden aus den verschiedenen Rauchrunden zusammengetragen und errechnet. Die Daten wurde von mehreren Mitgliedern der Arbeitsgruppe Krauss-Etschmann am Comprehensive Pneumology.

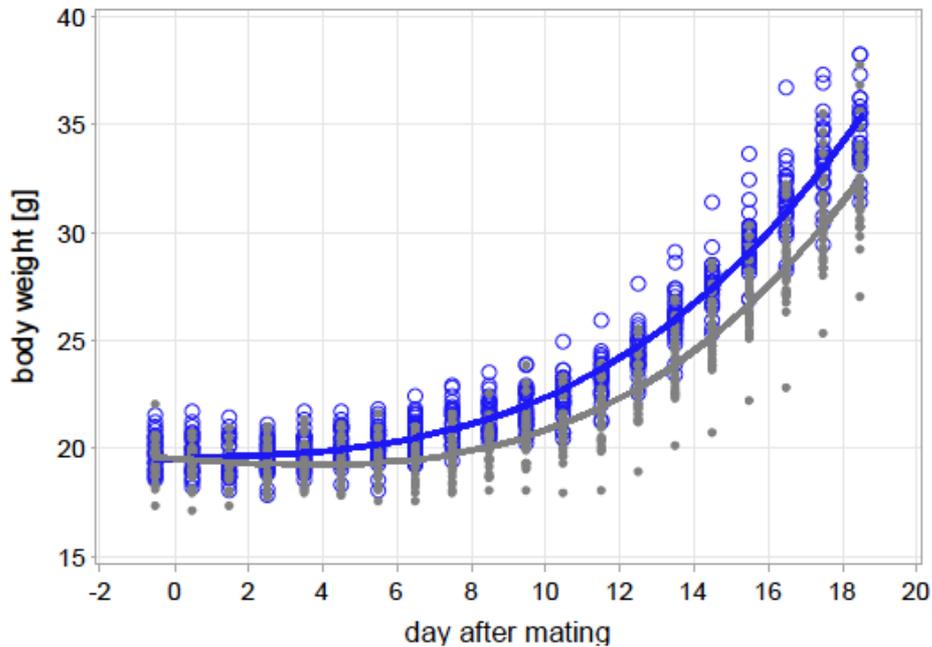
**Tabelle 13: Schwangerschaftscharakteristika. #Mean±SD, \*analysiert in nicht-schwangeren Mäusen**

	AIR	CS	p-Wert
# Urin Kotinin [mg/ml] * ± (n)	117± 26 7	600±25 15	<0.0001
# CO-Hb * (n)	1.3±0.2 17	6.3±0.6 22	<0.0001
Schwangerschaftsrate (%) (n)	13.1±8.8 32	9.6±6.9 29	0.3
Schwangerschaftsdauer (d) (n)	19.8±0.5 12	19.8±0.6 12	>0.99
Wurfgröße (n)	6.2±1.8 32	5.7±1.9 29	>0.99
Resorptionen (n)	0.5±0.6 77	1.0±0.5 72	0.1
Mütterliches Gewicht bei Sectio (g) (n)	34.4±2.1 15	32.8±2.4 8	0.1

Bei den Schwangerschaftsraten und der Schwangerschaftslänge, der Zahl der lebensfähigen Nachkommen, sowie bei den sichtlichen Fetusresorptionen, zeigten sich zwischen den beiden Gruppen CS und AIR keine signifikanten Unterschiede. (Tabelle 13). Daher sind keine indirekten Effekte durch Veränderungen der Schwangerschaftsparameter bei den Rauch-exponierten Tieren zu erwarten.

Die Urin-Kotinin-Konzentration wurde am Anfang zur Etablierung des Rauchmodells bestimmt. Die Konzentration des Kotinins im Urin, ein Abbauprodukt von Nikotin, und die Konzentration des CO-Hbs im peripheren Blut, wurden kontrolliert um die Exposition gegenüber Zigarettenrauch im Körper der Maus nachzuweisen. Beide Werte zeigten sich in den CS Mäusen signifikant ( $p < 0.0001$ ) erhöht, im Vergleich zu den AIR Mäusen (Tabelle 13).

#### 4.1.1 Gewichtsverlauf der CS Mäuse und Air Mäuse



**Abbildung 9 Gewichtsverlauf der schwangeren CS Mäuse (grau) und der Air Mäuse (blau) während der Schwangerschaft**

Die Versuchstiere wurden ab Tag 2,5 nach Paarung entweder Zigarettenrauch (CS, grau) oder gefilterter Luft (AIR, blau) ausgesetzt. Die Gewichtszunahme im Verlauf der Schwangerschaft zeigte sich bei den CS Mäusen gegenüber den Air Mäusen signifikant ( $p < 0,0001$ , multiple T-Test) vermindert (Abb. 9).

#### 4.1.2 Geburtsgewichte der Nachkommen

Die Nachkommen der CS und AIR Mäuse wurden am Tag 18,5 nach der Sectio gewogen. Die Mütter der CS Mäuse wurden kontinuierlich im Verlauf der Schwangerschaft Zigarettenrauch ausgesetzt.

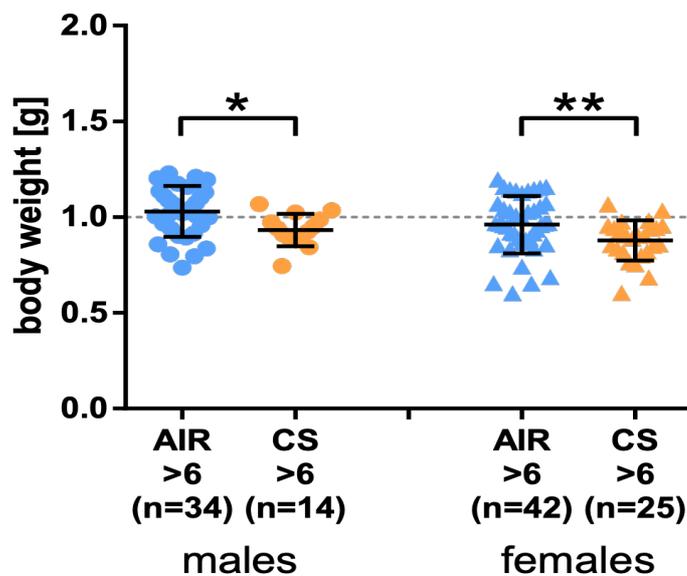


Abbildung 10 Geburtsgewicht der Nachkommen nach intrauteriner CS (orange) oder AIR (blau) Exposition nach Geschlechtern getrennt, statistischer Test durch unpaired t-Test (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ ; \*\*\* $p < 0,005$ ), Mittelwerte +/- SD.

Die Geburtsgewichte der CS Nachkommen im Vergleich zu den Air Nachkommen am Tag 18,5 sind signifikant vermindert (Abb 10). Geschlechtsspezifisch besteht vor allem ein enormer Unterschied bei den männlichen Nachkommen mit einem Signifikanzniveau von  $p < 0,0005$  (unpaired t-Test) Auch bei den weiblichen rauchexponierten Nachkommen sind die Geburtsgewichte signifikant ( $p < 0,05$ , unpaired t-Test) kleiner im Vergleich zu der Kontrollgruppe.

## 4.2 Genexpressionsstudien

Für die Genexpressionstudien wurden 20 Plazenten von Sectios am Tag 18,5 der Schwangerschaft untersucht. Davon waren 11 von CS Müttern und 9 von AIR Müttern.

**Tabelle 14: Auflistung der Tiere für die Genexpressionsstudien.**

<b>Name</b>	<b>Sectio Datum</b>	<b>Exposition</b>	<b>Gewebe</b>
Balb/c 23	25.04.13	SMOKE	Plazenta
Balb/c 29	25.04.13	SMOKE	Plazenta
Balb/c 30	25.04.13	SMOKE	Plazenta
Balb/c 31	25.04.13	SMOKE	Plazenta
Balb/c 32	21.03.13	AIR	Plazenta
Balb/c 33	21.03.13	AIR	Plazenta
Balb/c 34	21.03.13	AIR	Plazenta
Balb/c 35	21.03.13	AIR	Plazenta
Balb/c 36	21.03.13	AIR	Plazenta
Balb/c 38	21.03.13	AIR	Plazenta
Balb/c 39	21.03.13	AIR	Plazenta
Balb/c 42	21.03.13	AIR	Plazenta
Balb/c 43	21.03.13	AIR	Plazenta
Balb/c 45	21.03.13	SMOKE	Plazenta
Balb/c 46	21.03.13	SMOKE	Plazenta
Balb/c 47	21.03.13	SMOKE	Plazenta
Balb/c 49	21.03.13	SMOKE	Plazenta
Balb/c 50	21.03.13	SMOKE	Plazenta
Balb/c 51	21.03.13	SMOKE	Plazenta
Balb/c 52	21.03.13	SMOKE	Plazenta

#### **4.2.1 Qualitätskontrolle der extrahierten mRNA**

##### ***Nanodrop***

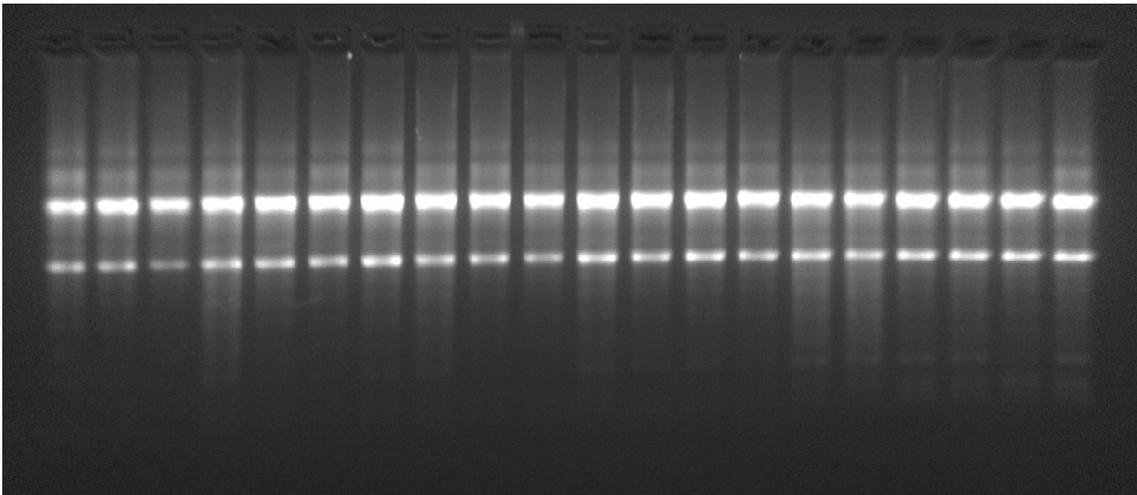
Mit dem Nanodrop 1000 wurden Konzentration und Reinheit der isolierten RNA überprüft. RNA Proben mit einem Quotienten außerhalb 1,8 bis 2,2 wurden wiederholt, oder bei mehrmaligen schlechten Ergebnissen nicht mehr weiter verarbeitet. Diese sind auch nicht mehr in der Tierauflistung gelistet. Die RNA Proben, mit denen weiter gearbeitet wurde, zeigten sich alle rein (Tabelle 15).

**Tabelle 15: NanoDrop Werte für die extrahierten RNAs.**

Name	Exposition	Gewebe	RNA Konz ng/ $\mu$ l	260/280	260/230
RNA32	AIR	Plazenta	659,50	2,00	2,11
RNA33	AIR	Plazenta	373,00	2,04	2,04
RNA34	AIR	Plazenta	534,70	2,05	1,99
RNA35	AIR	Plazenta	646,30	2,05	1,80
RNA36	AIR	Plazenta	790,00	2,01	1,80
RNA38	AIR	Plazenta	432,50	2,05	1,92
RNA39	AIR	Plazenta	317,50	2,06	1,90
RNA42	AIR	Plazenta	434,40	2,07	1,90
RNA43	AIR	Plazenta	617,80	2,00	2,00
RNA23	SMOKE	Plazenta	389,50	2,10	1,87
RNA29	SMOKE	Plazenta	322,00	2,05	1,84
RNA30	SMOKE	Plazenta	286,10	2,08	1,97
RNA31	SMOKE	Plazenta	705,90	2,04	2,01
RNA45	SMOKE	Plazenta	567,50	2,10	1,89
RNA46	SMOKE	Plazenta	526,60	2,08	2,00
RNA47	SMOKE	Plazenta	292,40	2,08	1,89
RNA49	SMOKE	Plazenta	754,50	2,06	1,91
RNA50	SMOKE	Plazenta	838,30	2,09	2,00
RNA51	SMOKE	Plazenta	649,00	2,08	1,88
RNA52	SMOKE	Plazenta	577,10	2,07	2,01

### ***Gelelektrophorese***

Eine weitere Qualitätskontrolle der RNA Proben erfolgte über die Betrachtung der Agarose-Gelelektrophorese. Die Qualität wurde als gut bewertet, wenn die 28S – und die 18S- Bande deutlich erkennbar waren und etwa in einem Verhältnis von 2:1 vorlagen.



**Abbildung 11 Gelelektrophorese zur Überprüfung der RNA Qualität von RNA 32-52 (Tabelle 15).**

Alle benutzten RNA Proben zeigten in der Gelelektrophorese eine gute Qualität (Abb.11) und keine Degradierungen.

#### **4.2.2 Primereffizienzen**

Die Primereffizienzen wurden wie im Methodenteil beschrieben ermittelt. Sie sind in der Tabelle 16 aufgezeigt. Alle verwendeten Primer für die Zielgene bis auf Foxp3 zeigten eine Effizienz zwischen 1,9 und 2,1. Für Foxp3 wurden verschiedene Primer getestet, jedoch zeigte keiner eine akzeptable Effizienz. Deswegen konnte die weitere Genexpressionstudie mit Foxp3 nicht durchgeführt werden.

Der Primer des Housekeeping Gens Hprt zeigte die beste Qualität bezüglich Effizienz und Schmelzkurve, weswegen es als Normalisator in der Auswertung benutzt wurde. Seine Expression wurde nicht von der Rauchexposition beeinflusst.

**Tabelle 16: Primer-Effizienzen.**

<b>Primer</b>	<b>Effizienz</b>
Tbx21	1,965
Gata3	2,086
Rorc	1,967
Hprt	2,085
Igf1	2,013
Igfbp3	2,027

#### **4.2.3 mRNA Expression der Transkriptionsfaktoren**

Der Fokus der Genexpressionsstudien lag auf der Plazenta, da das Plazentagewebe die immunologische Barriere zwischen Mutter und Nachkommen bildet. Die Genexpression wurde durch die qPCR untersucht. Die Normalisierung des PCR Experimentes wurde mit den CT Werten des Haushaltsgens Hprt als Normalisator durchgeführt. Alle Werte sind effizienzkorrigiert.

## Tbx21

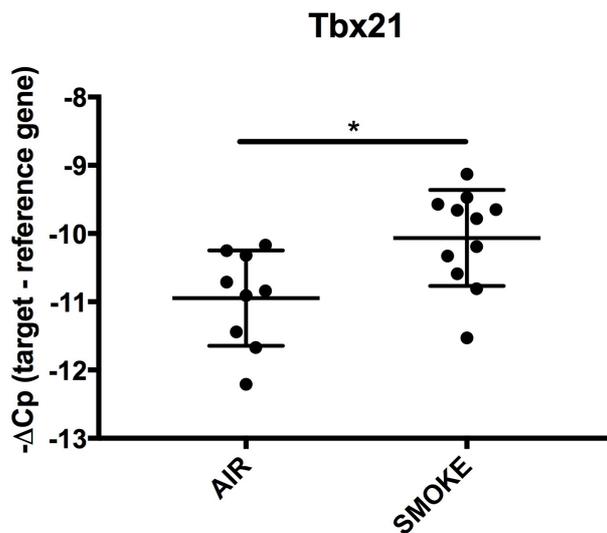


Abbildung 12 Tbx21 mRNA Expression in der Plazenta;  $p < 0.05$ ; unpaired t-Test; Mittelwerte ( $\pm$ -SD).

Die Tbx21 Expression in der Plazenta von Smoke Mäusen ist signifikant ( $p = 0.01$ ) erhöht im Vergleich zu den Kontrollmäusen. Tbx21 ist auf mRNA-Ebene in Plazenten von Mäusen mit Rauchexposition 1.84 stärker exprimiert als in Plazenten von Kontrolltieren ( $p = 0.01$ ).

## Gata3

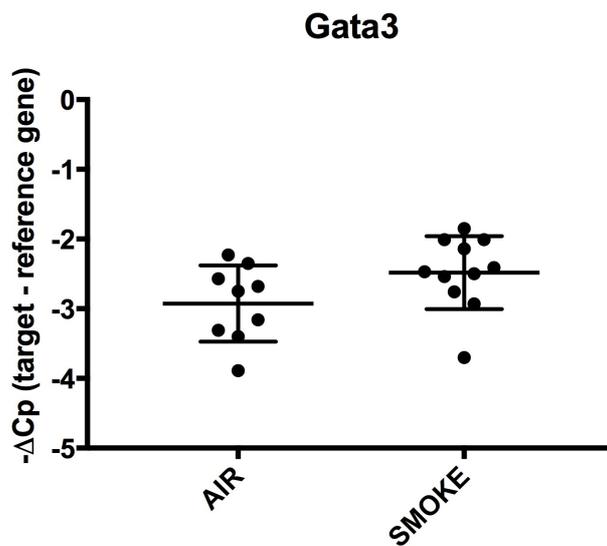


Abbildung 13 Gata3 mRNA Expression in der Plazenta; unpaired t-Test; Mittelwerte (+/-SD)

Die Gata3 Expression in der Plazenta von Smoke Mäusen ist nicht signifikant ( $p=0.08$ ) verändert im Vergleich zu den Kontrollmäusen. Die FC beträgt im 1.36. Es zeigt sich jedoch ein Trend zu einer erhöhten Expression von Gata3 bei nikotinexponierten Mäusen.

## Rorc

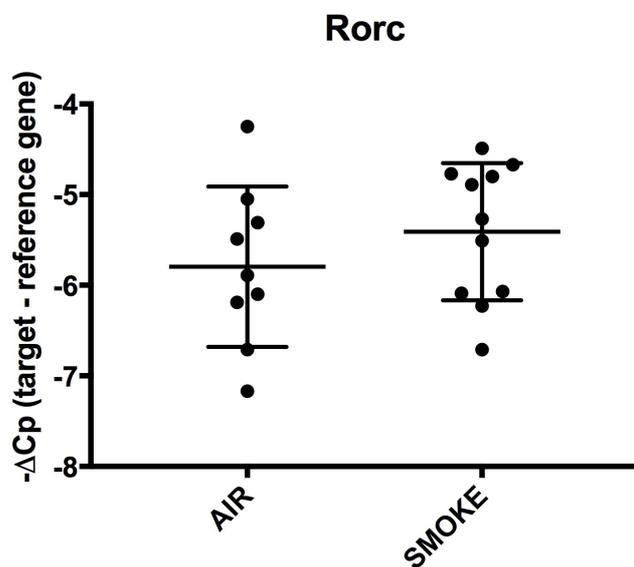


Abbildung 14 Rorc mRNA Expression in der Plazenta; unpaired t-Test; Mittelwerte (+/-SD).

Die Rorc Expression in der Plazenta von Smoke Mäusen ist nicht signifikant ( $p=0,31$ ) verändert im Vergleich zu den Kontrollmäusen. Die FC beträgt 1,31.

## Igf1

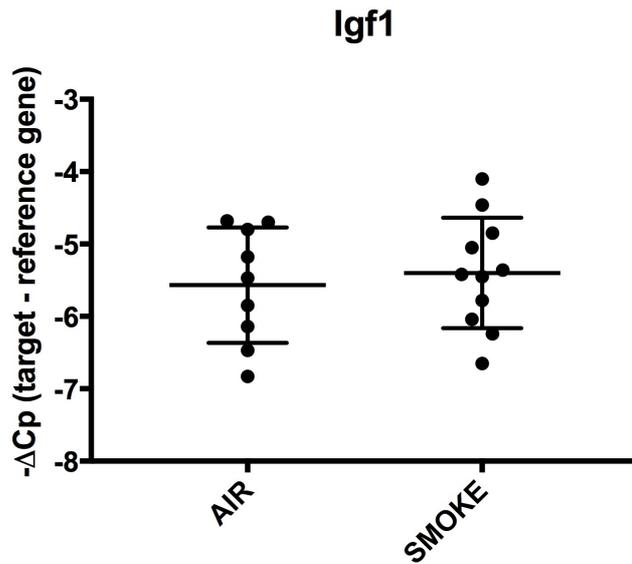


Abbildung 15 Igf1 mRNA Expression in der Plazenta; unpaired t-Test; Mittelwerte (+/-SD).

Die Igf1 Expression in der Plazenta von Smoke Mäusen ist nicht signifikant ( $p=0,64$ ) verändert im Vergleich zu den Kontrollmäusen. Die FC beträgt im 1,12.

## Igfbp3

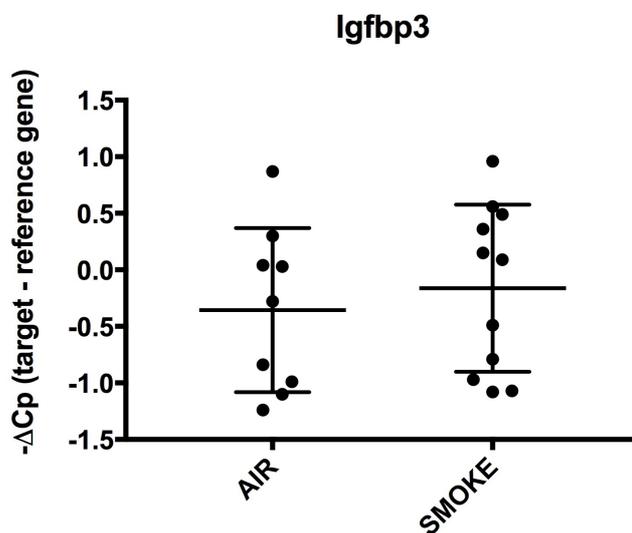


Abbildung 16 Igfbp3 mRNA Expression in der Plazenta; unpaired t-Test; Mittelwerte (+/-SD).

Die Igfbp3 Expression in der Plazenta von Smoke Mäusen ist nicht signifikant ( $p=0,56$ ) erhöht im Vergleich zu den Kontrollmäusen. Die FC beträgt im 1.14.

## **5 Diskussion**

### **5.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse**

In dieser Studie wurde ein von unserer Arbeitsgruppe etabliertes Mausmodell benutzt, um pränatale Rauchexposition durch aktives Rauchen der Mutter zu simulieren. Es wurden physiologische, und mögliche Veränderungen auf Genexpressionsebene untersucht. Die Nachkommen von CS Mäusen zeigten ein retardiertes intrauterines Wachstum, was durch das niedrigere Geburtsgewicht gegenüber den AIR Nachkommen gekennzeichnet war. Auch bei den CS Müttern wurde während der Schwangerschaft eine verminderte Gewichtszunahme und Endgewicht am Tag der Sectio festgestellt. Ansonsten wurden keine signifikanten Veränderungen bei der Länge der Schwangerschaft, bei der Zahl der Nachkommen, sowie Zahl der sichtlichen Fetusresorptionen gefunden.

Die Genexpressionsuntersuchungen wurden an der Plazenta durchgeführt, als Schnittstelle zwischen Mutter und Kind. Die Expression des Transkriptionsfaktors Tbx21, der bei der Th1-Differenzierung eine Rolle spielt, zeigte sich signifikant erhöht bei CS Mäusen. Bei den anderen Transkriptionsfaktoren der T-Zell-Differenzierung Gata3 und Rorc konnten keine signifikanten Veränderungen gemessen werden. Foxp3 musste aufgrund von Primerproblemen aus der Studie ausgeschlossen werden. Auch bei Igf1 und Igfbp3 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression in der Plazenta zwischen CS und AIR Mäusen.

### **5.2 Stärken, Schwächen und Limitationen**

Ein Ziel der Studie war es Konsequenzen gezielt nur von pränatalem Rauchen in der Schwangerschaft zu erforschen und nicht andere Faktoren einer beeinträchtigten Schwangerschaft. Deswegen wurde das Modell so gewählt, dass bestimmte Parameter einer erfolgreichen Schwangerschaft in der Mutter unverändert belassen. Bei Frauen im reproduktiven Alter wird Rauchen mit reduzierter Fertilität und erhöhten Raten von Fehlgeburten in Verbindung gebracht[73]. Um diese Komplikationen zu umgehen, wurden die CS Mäuse erst nach einer Ruhephase nach der Paarung am Tag 2,5 das erste Mal der Rauchexposition ausgesetzt.

Die Urin-Kotinin-Konzentration und das CO-Hb wurden bei der anfänglichen Etablierung des Rauchmodells gemessen, um die Rauchexposition im Körper der Maus nachzuweisen. Die Urin-Kotinin-Level zeigten sich dabei signifikant im Vergleich zu den Kontrollmäusen erhöht. Dementsprechend reflektiert unser Protokoll moderates Rauchen im Vergleich mit Daten von schwangeren Frauen[74]. Die CO-Hb-Konzentrationen für CS Mäuse nach der Rauchexposition waren vergleichbar mit der CO-Hb-Anteil von ca. 6,1%, die in Menschen detektiert wurden, die zwischen 11 und 20 Zigaretten pro Tag rauchen. Dies indiziert, dass unser murines Rauchmodell mit einem mittleren CO-Hb von 6,3% eine vergleichbare Exposition mit Zigarettenrauch simuliert, wie in Menschen.

In unserem Rauchmodell wird eine Rauchmaschine (s.o.) benutzt, in der die Zigarette ohne Filter geraucht wird. Ein Großteil der Raucher jedoch, raucht mittlerweile Filterzigaretten. Der Betrag von Teer, Nikotin und anderen Giftstoffen, die sonst zum Teil im Filter hängenbleiben, wurden nicht beachtet.

Frühere Studien wie von *Pincus-Knackstedt* (2006) haben gezeigt, dass pränatal gestresste Mäuse ein höheres Risiko gegenüber Entzündungen von Atemwegen im Erwachsenenleben haben[75]. Die tägliche Handhabung der Mäuse, unter anderem mit der Umbettung in andere Käfige, dem Wiegen und den lauten Geräuschen, könnte daher als stressbringende Störvariable gesehen werden. Um jedoch den Effekt zu minimieren, wurde die Kontrollgruppe AIR mitgeführt, die bis auf die Rauchexposition, unter den gleichen täglichen Bedingungen gehalten wurden.

Eine weitere Limitation ist die niedrige Anzahl an Versuchstieren in den Genexpressionsanalysen (CS=11, AIR=9). Der Großteil der schwangeren Versuchstiere wurde normal entbunden, um mit den Nachkommen weitere Studien durchzuführen.

### **5.3 Vergleich mit anderen Studien**

In dieser Studie wurde mütterliches Rauchen in der Schwangerschaft im Zusammenhang mit der Genexpression in der Plazenta der Maus untersucht. Frühere Studien aus unserer Arbeitsgruppe haben sich in diesem Kontext unter anderem mit der Genexpression in der Lunge und der Milz beschäftigt. Die Plazenta wurde für diese Arbeit ausgesucht, weil sie die Verbindung zwischen Mut-

ter und Kind darstellt. Als immunologisch aktive Schnittstelle hat die Plazenta ein hohes Potenzial das fetale Immunsystem zu beeinflussen. *Prins JR, Hylkema MN, Erwich JJHM et al* analysierten einerseits humanes Dezidua- und peripheres Blut von rauchenden und nicht-rauchenden Müttern mit RT-qPCR und Durchflusszytometrie sowie murines Dezidua- und Plazentagewebe aus einem ähnlichen Rauchmodell[76]. Neben der RT-qPCR, wurden hier jedoch auch noch die Durchflusszytometrie und immunhistochemische Methoden benutzt. *Luppi et al.* haben den Effekt von Zigarettenrauch auf das Immunsystem untersucht, indem sie zirkulierende maternale Leukozyten mittels Durchflusszytometrie aus peripherem Blut analysierten[77]. Die Studie kommt zu dem Schluss, dass Rauchen in der Schwangerschaft sichtbar im Blut der Mutter verschiedene Immunparameter stört und das Gleichgewicht dieser verändert, was z.B. wiederum zum Abort führen kann. Wie oben beschrieben, gibt es einige Studien, die weiterführende labortechnische Methoden neben der PCR und mehrere Materialien untersucht haben. In dieser Arbeit wurde nur murines Plazenta-, jedoch kein Dezidua- oder menschliches Gewebe analysiert.

Die Genexpression von Foxp3 konnte in der Plazenta in dieser Studie nicht untersucht werden, da die Primer nicht die nötige Effizienz und Schmelzkurve für die PCR hatten. Foxp3 und Treg-Zellen sind bedeutend in der Suppression von Immunantworten zwischen Mutter und Fetus, die weitreichende Konsequenzen haben können. Im Jahr 2011 *Prescott et al.* eine Studie veröffentlichen, die Foxp3 Expression in humaner Plazenta in der real-time PCR nachweisen konnten[78]. Dort konnte Foxp3 auch auf Proteinebene durch immunhistochemische Färbung in der Plazenta dargestellt werden[78].

Ähnlich wie in vielen anderen Studien zu pränataler Rauchexposition konnte unser Mausmodell eine intrauterine und postnatale Wachstumsretardierung zeigen[79].

#### **5.4 Rauchen beeinflusst das mütterliche Immunsystem in der Schwangerschaft**

Das mütterliche Immunsystem hat eine Schlüsselrolle für den Erfolg der Schwangerschaft. Es adaptiert sich lokal an der Implantationsseite und systemisch in der peripheren Zirkulation. Rauchen führt zu diversen negativen Konsequenzen, wodurch auch die Plazentaentwicklung beeinträchtigt sein kann. In

dieser Arbeit zeigte sich die Expression des Transkriptionsfaktors Tbx21 in der Plazenta von CS Mäusen erhöht. Dies weist daraufhin, dass Rauchen in der Schwangerschaft das Immunsystem lokal beeinflussen kann. Eine Änderung der Balance und Korrelation zwischen Th1-, Th2-, Th17- und Treg-Zellen in der Schwangerschaft kann zu Aborten, Prä-Eklampsie und weiteren Pathologien führen.

In Aborten wurde eine prädominante Th1-Immunität beobachtet, aber auch eine prädominante Th2-Immunität wurde schon mit Aborten in Verbindung gebracht [41]. Die Tbx21 Erhöhung, die durch das Rauchen in der Schwangerschaft hervorgerufen wurde, könnte zu einer vermehrten lokalen Produktion von Th1-Zellen und deren spezifischen pro-inflammatorischen Zytokinen führen. Jedoch konnte in dieser Arbeit keine erhöhte Rate von Resorptionen bei den CS Mäusen, im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden. *Prins et al.* wiederum konnten erhöhte Resorptionsraten bei CS Mäusen nachweisen[76]. Es wird zu dem vermutet, dass ein inverses Verhältnis von Th17-Zellen und Treg-Zellen eine bedeutende Rolle bei Aborten spielt. *Wang et al* und *Nakashima et al.* haben von einer erhöhten Prävalenz von Th17-Zellen in Dezidua-Gewebe und gesteigerten Expression des Th17-Transkriptionsfaktors Rorc bei Aborten berichtet[80] [81]. *Prins et al* konnten 2012 keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression von Tbx21, Gata3, Foxp3 und Rorc in der murinen Plazenta nachweisen. Jedoch wurde im Deziduagewebe von schwangeren CS Mäusen eine erhöhte Rorc- und IL10- Expression (Th17-Antwort) und niedrigere Foxp3+/CD3+ (Treg) detektiert, sowie verminderte Prozentsätze von Treg-Zellen im peripheren Blut rauchender schwangerer Frauen[76]. Den Treg-Zellen wird eine enorme Rolle in dem Erhalt der Schwangerschaft zugewiesen. In einer Studie von *Santner Nanan et al.* wurde in gesunden Schwangerschaften ein erhöhter Quotient aus Foxp3 und Th-17 Zellen aufgezeigt[82]. Eine veränderte Verteilung der T-Zellen, durch verminderte Treg-Zellen, erhöhte Th1- und Th17-Zellen durch Rauchen in der Schwangerschaft, und ein daraus entstehendes Ungleichgewicht von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen, könnte einen Teil der Mechanismen sein, die zu negativen Schwangerschaftsergebnissen wie Aborten führen.

## 5.5 Entwicklung von Asthma und Allergien

Eine steigende Anzahl an Studien hat in den letzten Jahren gezeigt, dass die Anfälligkeit für bestimmte Erkrankungen intrauterin oder in der frühen Kindheit festgelegt wird[83]. Allergische Erkrankungen wie Asthma können ihren Ursprung schon in dieser Zeit haben[84]. Verschiedene bevölkerungsbasierte Studien haben Umweltverschmutzung und Rauchen während der Schwangerschaft, mit retardiertem fetalem Wachstum, niedrigem Geburtsgewicht[85], Asthma, reduzierter Lungenfunktion und Allergien in Verbindung gebracht[86, 87]. Das mütterliche Rauchen in der Schwangerschaft ist als Risikofaktor für die schädigende Entwicklung der Lungenfunktion in der Kindheit bestens belegt [88, 89]. Der allergische Phänotyp von Asthma ist durch eine erhöhte Anzahl von Th2-Zytokinen wie IL-4, IL-5, und IL-13, sowie ein erniedrigtes Level an Th1-Zytokinen wie IFN $\gamma$  charakterisiert. Zudem nimmt die gestörte Funktion von Treg-Zellen, und Th17-Zellen eine wichtige Rolle ein. *Finotto et al.* zeigten mit Hilfe von Immunhistocheie, dass die Expression von Tbx21 in Lungen von Asthma-Erkrankten signifikant reduziert ist als im Vergleich zu nicht-Asthmatikern[90]. Außerdem konnten sie in einem Mausmodell bei Tbx21 Knockout Mäusen verschiedene Asthma-typische Symptome wie bronchiale Hyperreagibilität, Th2-Zytokininduktion, und pulmonale Umbauprozesse nachweisen[90]. In der Plazenta von CS Mäusen zeigten sich in dieser Arbeit widersprüchliche Ergebnisse mit einer Erhöhung der Tbx21 Expression, welche in Richtung einer erhöhten Th1-Antwort schließen lässt. *Singh et al.* haben im Mausmodell mit pränataler Passivrauchexposition eine erhöhte Expression von Gata3 und Th2-Zytokinen so wie eine supprimierte Th1-Antwort in Lungengewebe von Nachkommen gezeigt[91]. Bis auf die Studie von *Prins et al.*, die auch keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression von Tbx21, Rorc, Gata3 und Foxp3 nachweisen konnten, gibt es keine Studien, die den Effekt von mütterlichem Rauchen in der Plazenta mit diesen Genen untersucht haben.

Allergische Erkrankungen entwickeln sich schon sehr früh im Leben. Studien haben gezeigt, dass Treg-Zellen eine essentielle Rolle in der Immunregulation von atopischen Krankheiten spielen und in der Entstehung von Asthma beteiligt sind[92, 93]. In dieser Arbeit konnten keine Daten zur Veränderung der Foxp3-Expression durch pränatale Rauchexposition ermittelt werden. Interessanterweise konnten *Hinz et al.* eine reduzierte Anzahl an Treg-Zellen in Nabelschnur-

blut von Neugeborenen nachweisen, welche pränatal mütterlichem Rauchen ausgesetzt waren im Vergleich zu nicht-rauchexponierten Kindern[94]. In der Studie wurde darüber hinaus eine Assoziation zwischen einer niedrigen Anzahl an Treg-Zellen in Nabelschnurblut mit dem erhöhten Vorkommen von atopischer Dermatitis und allergischen Nahrungsmittelunverträglichkeiten im ersten Lebensjahr demonstriert[94]. *Hamzaoui et al* haben in ihren Daten auch eine erniedrigte Anzahl von Treg-Zellen im peripheren Blut sowie eine reduzierte Foxp3 Expression in asthmatischen Kindern zeigen können[95]. Auch *Provoost et al* haben über einen Mangel in der Foxp3-Expression in T-Zellen asthmatischer Patienten berichtet[96]. Treg-Zellen, vor allem die Anzahl der Treg-Zellen bei Geburt, scheinen daher eine potenzielle Relevanz in der Entstehung von allergischen Erkrankungen in der Kindheit zu haben. Die Mechanismen wie Rauchen und äußere Einflüsse wie mütterliche Atopie die fetale Foxp3-Expression und Treg-Zell-Entwicklung beeinträchtigen, müssen noch mehr erforscht werden.

Trotz einer Reihe von Mausmodellen zur Rauchexposition in der Schwangerschaft, gibt es nur wenige Arbeiten zu den zu Grunde liegenden Mechanismen. *Blacquiere et al*, zeigten in einem Mausmodell, dass pränatale Rauchexposition durch mütterliches Rauchen auch die Expression von Genen des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs verändert[97]. Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg ist bedeutend für die Entwicklung der Lunge, und wurde in einer Studie von *Sharma et al* mit zwei Kohorten bestehend aus asthmatischen Kindern, mit einer eingeschränkten Lungenfunktion in Verbindung gebracht[98]. Um die Lungenentwicklung zu schützen, müssen zunächst die der Lungenfehlentwicklung zu Grunde liegenden Mechanismen erforscht und verstanden werden. Die Genuntersuchung in der Plazenta konnte dazu keine neuen Daten hervorbringen. Jedoch gibt es neue Untersuchungen zu den RUNX (runt-related proteins) Transkriptionsfaktoren, die unter anderem bei der Entwicklung des Immunsystems beteiligt sind. So haben *Haley et al* in Untersuchungen mehrere Varianten des RUNX1-Gens mit Atemwegshyperreagibilität bei Kindern assoziiert. Die RUNX1- Expression in der Lunge war im Mausmodell mit pränataler Rauchexposition in postnatalen Stadien signifikant reduziert[99]. Auch in humanem Lungengewebe intrauterin rauchexponierter Säuglinge zeigte sich kurz nach der Geburt eine veränderte RUNX1-Expression[99]. Die gestörte Expression dieses Gens, etwa durch Rau-

chen in der Schwangerschaft, könnte ein Risikofaktor für die Entwicklung von Asthma sein.

Man geht derzeit davon aus, dass die Interaktion von Umwelteinflüssen, genetischer Veranlagung sowie epigenetischer Faktoren ursächlich für die Steigerung der Asthma-Prävalenz in den letzten Jahrzehnten ist. Es wird postuliert, dass das Erkrankungsrisiko über Generationen hinweg weitergegeben wird, auch wenn der ursprünglich auslösende Umweltfaktor nicht mehr vorhanden ist. So wird vermutet, dass Rauchen der Großmutter in der Schwangerschaft ausreicht, um eine Asthmaerkrankung des Enkelkindes zu begünstigen[57]. Epigenetische Veränderungen an der DNA sind sehr anfällig gegenüber exogenen und endogenen Faktoren, und finden überwiegend in der pränatalen Periode statt. *Runyon et al* konnten in einer Zwillingsstudie mit asthmatischen Kindern verschiedene Methylierungsgrade von Foxp3 und IFN $\gamma$  Promotor-Regionen in peripheren T-Zellen demonstrieren. Ein höherer Methylierungsgrad beider Gene war mit reduzierter mRNA Expression assoziiert. Interessanterweise waren Foxp3-Level in den asthmatischen Zwillingen am niedrigsten, die auch gegenüber Zigarettenrauch exponiert waren[100]. Wie zuvor beschrieben gibt es einige intergenerationale Tiermodelle über pränatale Rauchexposition, und Asthmarisiko [97, 101], jedoch gibt es einen Mangel an Studien, die die zu Grunde liegenden epigenetischen Mechanismen untersuchen. Bis Dato gibt es auch nur ein Modell von *Rehan et al*, das die transgenerationale Übertragung des Asthmarisikos, d.h. über mehrere Generationen, untersucht hat[58]. Es konnte die Weitergabe von asthma-ähnlichen Veränderungen der Lungenfunktion und epigenetische Veränderungen in Lunge und Hoden von der F1 auf F2 Generation demonstriert werden, obwohl diese zu keiner Zeit nikotinexponiert war. Die F1 Generation stammte von der F0 Generation ab, die in der Schwangerschaft nikotinexponiert war[58]. Zusätzlich gibt es leider neben den epidemiologischen Studien über intergenerationale Risikovererbung, keine epidemiologischen Studien, die Transgenerationenvererbung von Krankheitsrisiko bezüglich Asthma und Lungenerkrankungen betrifft[37].

In Bezug auf epigenetische Veränderungen, könnte der Einfluss von pränataler Nikotinexposition auf plazentare Methylierungsmuster mit der Veränderung der fetalen Programmierung und erhöhtem Krankheitsrisiko assoziiert sein. Epigenetische Alterationen wie Methylierung von CpG Inseln, können die Genexpres-

sion in der Plazenta verändern und so nicht nur negativ Einfluss auf die Funktion der Plazenta, sondern auch die Gesundheit des sich entwickelnden Kindes nehmen. Laut Epigenom-weiten Assoziationsstudien von *Maccani et al* und *Suter et al* wurden in der Plazenta mehrere Gene entdeckt, die durch Rauchen in der Schwangerschaft epigenetisch verändert worden sind[102, 103]. Eines dieser Gene war RUNX3, welches wie auch oben beschrieben, mit Asthma und bronchialer Hyperreagibilität assoziiert wird[103]. Dies zeigt, dass pränatale Rauchexposition unter anderem auch die Genexpression in der Plazenta beeinflussen kann, und epigenetische Mechanismen zu den negativen Gesundheitsfolgen bezogen auf Rauchen in der Schwangerschaft führen könnten.

## 5.6 IGF

Pränatale Rauchexposition hat negative Auswirkungen auf das Geburtsgewicht und die Gewichtsentwicklung von Neugeborenen. IGF1 ist ein wichtiger Regulator für somatisches Wachstum und Zelldifferenzierung[104], sowie für die Lungenentwicklung. Die Bedeutung des IGF-Systems für die Lungenentwicklung wurde in der Studie von *Liu et al* demonstriert, in der Mäuse ohne IGF1, Probleme in der Lungenentwicklung und reduziertes Wachstum zeigten[64]. In unserer Studie zeigten sich die Geburtsgewichte von männlichen und weiblichen CS-Nachkommen signifikant vermindert im Vergleich zu der Kontrollgruppe. *Meyer et al* haben Gewichte der Nachkommen am Tag 30 verglichen als Parameter für eine abnormale Entwicklung nach Rauchexposition in der Schwangerschaft, und konnten auch eine 10% Gewichtsverminderung im Vergleich zu nicht-exponierten Kontrollmäusen zeigen. Jedoch konnte kein geschlechtsspezifischer Unterschied bei den Gewichten gesehen werden[105]. Auch *Larcombe et al* haben ähnliche Ergebnisse demonstriert[79]. Des Weiteren wurde pränatales Rauchen auch schon früher mit intrauteriner Wachstumsretardierung (IUGR) in Menschen verlinkt, was wiederum mit einem erhöhten Risiko verbunden ist, eine Asthmaerkrankung zu entwickeln[70]. Genauso wie die pränatale Beeinflussung der Lungenentwicklung durch Rauchen in der Schwangerschaft mit der Entwicklung einer COPD im späteren Leben in Verbindung gebracht wird[106]. In einer Studie von *Pringle et al* war die IGF1-Konzentration in Nabelschnurplasma von Babys, deren Mütter in der Schwangerschaft geraucht hatten, signifikant vermindert und könnte zur fetalen IUGR beigetragen haben[69]. Daher könnte man vermuten, dass Rauchen in der Schwangerschaft einen

schwächenden Effekt auf die Wachstumsentwicklung des Feten bzw. des Nachkommens hat, durch eine reduzierte Igf1- Konzentration, was jedoch auf mRNA Ebene in dieser Studie nicht belegt werden konnte.

Zusammenfassend konnte die Studie den Einfluss von pränataler Rauchexposition auf klinische Parameter wie Geburtsgewicht und mütterliche Gewichtsentwicklung, sowie auf die Genexpression der Plazenta zeigen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Rauchen in der Schwangerschaft die immunologischen Vorgänge bereits in der Plazenta beeinträchtigt und die Entwicklung der Nachkommen schädigt. Weitere Untersuchungen auf Proteinebene sind notwendig, um diese Resultate zu bestätigen.



## 6 Literaturverzeichnis

1. Scholz, R., et al., *Analysis of the German Perinatal Survey of the Years 2007-2011 and Comparison with Data From 1995-1997: Maternal Characteristics*. Geburtshilfe Frauenheilkd, 2013. **73**(12): p. 1247-1251.
2. Tong, V.T., et al., *Trends in smoking before, during, and after pregnancy--Pregnancy Risk Assessment Monitoring System, United States, 40 sites, 2000-2010*. MMWR Surveill Summ, 2013. **62**(6): p. 1-19.
3. Smedberg, J., et al., *Characteristics of women who continue smoking during pregnancy: a cross-sectional study of pregnant women and new mothers in 15 European countries*. BMC Pregnancy Childbirth, 2014. **14**: p. 213.
4. Cdc. *Preventing Smoking and Exposure to Secondhand Smoke Before , During , and After Pregnancy*. Dep Heal Hum Serv USA 2007;2.
5. Leone, F.T., et al., *An official American Thoracic Society research statement: current understanding and future research needs in tobacco control and treatment*. American journal of respiratory and critical care medicine, 2015. **192**(3): p. e22-e41.
6. Hoffmann, D., I. Hoffmann, and K. El-Bayoumy, *The less harmful cigarette: a controversial issue. a tribute to Ernst L. Wynder*. Chem Res Toxicol, 2001. **14**(7): p. 767-90.
7. Luck, W., et al., *Extent of nicotine and cotinine transfer to the human fetus, placenta and amniotic fluid of smoking mothers*. Dev Pharmacol Ther, 1985. **8**(6): p. 384-95.
8. Mund, M., et al., *Smoking and pregnancy--a review on the first major environmental risk factor of the unborn*. Int J Environ Res Public Health, 2013. **10**(12): p. 6485-99.
9. Health, U.D.o. and H. Services, *The health consequences of smoking: a report of the Surgeon General*. 2004, Atlanta, GA.
10. General, U.S., U.D.o. Health, and H. Services, *How tobacco smoke causes disease: the biology and behavioral basis for smoking-attributable disease: a report of the Surgeon General*. Rockville, MD: US Department of Health and Human Services, 2010.
11. Dietz, P.M., et al., *Infant morbidity and mortality attributable to prenatal smoking in the U.S*. Am J Prev Med, 2010. **39**(1): p. 45-52.

12. Schuetze, P. and R.D. Eiden, *The association between prenatal exposure to cigarettes and infant and maternal negative affect*. *Infant Behav Dev*, 2007. **30**(3): p. 387-98.
13. Fu, X.W., K. Wood, and E.R. Spindel, *Prenatal nicotine exposure increases GABA signaling and mucin expression in airway epithelium*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011. **44**(2): p. 222-9.
14. Lannero, E., et al., *Maternal smoking during pregnancy increases the risk of recurrent wheezing during the first years of life (BAMSE)*. *Respir Res*, 2006. **7**: p. 3.
15. Svanes, C., et al., *Early life origins of chronic obstructive pulmonary disease*. *Thorax*, 2010. **65**(1): p. 14-20.
16. Haustein, K., *Rauchen, Nikotin und Schwangerschaft*. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, 2000. **60**(01): p. 11-19.
17. ; Available from: <https://journals.plos.org/ploscompbiol/article?id=10.1371/journal.pcbi.1003027>
18. Kaufmann, S.H., *T-Zellen*, in *Basiswissen Immunologie*. 2014, Springer. p. 63-83.
19. Potsdam, I.f.m.D.B. *Zytokindiagnostik TH1/TH2/TH17-Profil*. . Available from: <http://www.imd-berlin.de/leistungsschwerpunkte/immundefekte/untersuchungsverfahren/th1th2th17-zytokinprofil.html>.
20. Potsdam, I.f.m.D.B. *Zytokindiagnostik TH1/TH2/TH17-Profil*.; Available from: <http://www.imd-berlin.de/leistungsschwerpunkte/immundefekte/untersuchungsverfahren/th1th2th17-zytokinprofil.html>.
21. Gershon, R.K., et al., *Contrasuppression. A novel immunoregulatory activity*. *J Exp Med*, 1981. **153**(6): p. 1533-46.
22. Bromberg, J. and J.E. Darnell, *The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function*. *Oncogene*, 2000. **19**(21): p. 2468.
23. Romagnani, S., *Th1 and Th2 in human diseases*. *Clinical immunology and immunopathology*, 1996. **80**(3): p. 225-235.
24. Szabo, S.J., et al., *A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment*. *Cell*, 2000. **100**(6): p. 655-669.
25. Mikhalkevich, N., et al., *Responsiveness of naive CD4 T cells to polarizing cytokine determines the ratio of Th1 and Th2 cell differentiation*. *The Journal of Immunology*, 2006. **176**(3): p. 1553-1560.

26. Dolhain, R.J., et al., *Shift toward T lymphocytes with a T helper 1 cytokine-secretion profile in the joints of patients with rheumatoid arthritis*. Arthritis & Rheumatism, 1996. **39**(12): p. 1961-1969.
27. Rao, A. and O. Avni, *Molecular aspects of T-cell differentiation*. British medical bulletin, 2000. **56**(4): p. 969-984.
28. Resnick, M.B. and P.F. Weller, *Mechanisms of eosinophil recruitment*. American journal of respiratory cell and molecular biology, 1993. **8**: p. 349-349.
29. Magnan, A.O., et al., *Assessment of the Th1/Th2 paradigm in whole blood in atopy and asthma: increased IFN- $\gamma$ -producing CD8+ T cells in asthma*. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2000. **161**(6): p. 1790-1796.
30. Mangan, P.R., et al., *Transforming growth factor- $\beta$  induces development of the TH17 lineage*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 231-234.
31. Leipe, J., A. Skapenko, and H. Schulze-Koops, *Th17-Zellen—eine neue proinflammatorische T-Zell-Population und ihre Bedeutung für rheumatologische Autoimmunerkrankungen*. Zeitschrift für Rheumatologie, 2009. **68**(5): p. 405-408.
32. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. Science, 2003. **299**(5609): p. 1057-61.
33. Brunkow, M.E., et al., *Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse*. Nature genetics, 2001. **27**(1): p. 68-73.
34. Chen, W., et al., *Conversion of peripheral CD4+ CD25- naive T cells to CD4+ CD25+ regulatory T cells by TGF- $\beta$  induction of transcription factor Foxp3*. Journal of Experimental Medicine, 2003. **198**(12): p. 1875-1886.
35. Holgate, S.T., et al., *A new look at the pathogenesis of asthma*. Clinical Science, 2010. **118**(7): p. 439-450.
36. Pearce, N., J. Pekkanen, and R. Beasley, *How much asthma is really attributable to atopy?* Thorax, 1999. **54**(3): p. 268-272.
37. Krauss-Etschmann, S., et al., *Inter- and transgenerational epigenetic inheritance: evidence in asthma and COPD?* Clin Epigenetics, 2015. **7**: p. 53.

38. Orihara, K., et al., *Role of regulatory and proinflammatory T-cell populations in allergic diseases*. World Allergy Organ J, 2008. **1**(1): p. 9-14.
39. Guerin, L.R., J.R. Prins, and S.A. Robertson, *Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment?* Human reproduction update, 2009. **15**(5): p. 517-535.
40. Munoz-Suano, A., A.B. Hamilton, and A.G. Betz, *Gimme shelter: the immune system during pregnancy*. Immunological reviews, 2011. **241**(1): p. 20-38.
41. Wegmann, T.G., et al., *Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon?* Immunol Today, 1993. **14**(7): p. 353-6.
42. Peck, A. and E.D. Mellins, *Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example*. Immunology, 2010. **129**(2): p. 147-53.
43. Saito, S., et al., *Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy*. Am J Reprod Immunol, 2010. **63**(6): p. 601-10.
44. Sakaguchi, S., et al., *Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in self-tolerance and autoimmune disease*. Curr Top Microbiol Immunol, 2006. **305**: p. 51-66.
45. Pape, H.-C., A. Kurtz, and S. Silbernagl, *Physiologie*. 2014: Georg Thieme Verlag.
46. Majewska, M., et al., *Transcriptome profile of the human placenta*. Funct Integr Genomics, 2017.
47. Mikhchev, A.M., et al., *Profiling gene expression in human placentae of different gestational ages: an OPRU Network and UW SCOR Study*. Reprod Sci, 2008. **15**(9): p. 866-77.
48. Hales, C.N. and D.J. Barker, *Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis*. Diabetologia, 1992. **35**(7): p. 595-601.
49. Maccani, J.Z. and M.A. Maccani, *Altered placental DNA methylation patterns associated with maternal smoking: current perspectives*. Adv Genomics Genet, 2015. **2015**(5): p. 205-214.
50. Prescott, S. and R. Saffery, *The role of epigenetic dysregulation in the epidemic of allergic disease*. Clin Epigenetics, 2011. **2**(2): p. 223-232.
51. Bird, A., *Perceptions of epigenetics*. Nature, 2007. **447**(7143): p. 396-8.

52. Maccani, M.A. and C.J. Marsit, *Epigenetics in the placenta*. Am J Reprod Immunol, 2009. **62**(2): p. 78-89.
53. Wilhelm-Benartzi, C.S., et al., *In utero exposures, infant growth, and DNA methylation of repetitive elements and developmentally related genes in human placenta*. Environ Health Perspect, 2012. **120**(2): p. 296-302.
54. Miller, L.L., et al., *Is the growth of the fetus of a non-smoking mother influenced by the smoking of either grandmother while pregnant?* PLoS One, 2014. **9**(2): p. e86781.
55. Golding, J., et al., *The anthropometry of children and adolescents may be influenced by the prenatal smoking habits of their grandmothers: a longitudinal cohort study*. Am J Hum Biol, 2014. **26**(6): p. 731-9.
56. Li, Y.-F., et al., *Maternal and grandmaternal smoking patterns are associated with early childhood asthma*. Chest Journal, 2005. **127**(4): p. 1232-1241.
57. Magnus, M.C., et al., *Grandmother's smoking when pregnant with the mother and asthma in the grandchild: the Norwegian Mother and Child Cohort Study*. Thorax, 2015. **70**(3): p. 237-243.
58. Rehan, V.K., et al., *Perinatal nicotine-induced transgenerational asthma*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2013. **305**(7): p. L501-7.
59. Benjamin-Garner, R. and A. Stotts, *Impact of smoking exposure change on infant birth weight among a cohort of women in a prenatal smoking cessation study*. nicotine & tobacco research, 2013. **15**(3): p. 685-692.
60. Bjerg, A., et al., *A strong synergism of low birth weight and prenatal smoking on asthma in schoolchildren*. Pediatrics, 2011. **127**(4): p. e905-e912.
61. Moshhammer, H., et al., *Parental smoking and lung function in children: an international study*. American journal of respiratory and critical care medicine, 2006. **173**(11): p. 1255-1263.
62. Langford, K.S., et al., *Serum insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) levels and IGFBP-3 protease activity in normal, abnormal, and multiple human pregnancy*. J Clin Endocrinol Metab, 1995. **80**(1): p. 21-7.
63. Lee, H., et al., *Targeting insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-3 signaling pathways. A novel therapeutic approach for asthma*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2014. **50**(4): p. 667-77.

64. Liu, J.P., et al., *Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r)*. Cell, 1993. **75**(1): p. 59-72.
65. Bennett, A., et al., *Levels of insulin-like growth factors I and II in human cord blood*. J Clin Endocrinol Metab, 1983. **57**(3): p. 609-12.
66. Vatten, L.J., et al., *Insulin-like growth factor I and leptin in umbilical cord plasma and infant birth size at term*. Pediatrics, 2002. **109**(6): p. 1131-5.
67. Lassarre, C., et al., *Serum insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in the human fetus. Relationships with growth in normal subjects and in subjects with intrauterine growth retardation*. Pediatr Res, 1991. **29**(3): p. 219-25.
68. Leger, J., et al., *Growth factors and intrauterine growth retardation. II. Serum growth hormone, insulin-like growth factor (IGF) I, and IGF-binding protein 3 levels in children with intrauterine growth retardation compared with normal control subjects: prospective study from birth to two years of age*. Study Group of IUGR. Pediatr Res, 1996. **40**(1): p. 101-7.
69. Pringle, P.J., et al., *The influence of cigarette smoking on antenatal growth, birth size, and the insulin-like growth factor axis*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(5): p. 2556-62.
70. Turner, S., et al., *First- and second-trimester fetal size and asthma outcomes at age 10 years*. Am J Respir Crit Care Med, 2011. **184**(4): p. 407-13.
71. Roemer, E., et al., *Mainstream Smoke Chemistry and in Vitro and In Vivo Toxicity of the Reference Cigarettes 3R4F and 2R4F*. 2012. **25**(1): p. 316.
72. Qiagen. Available from: <https://www.qiagen.com/us/shop/sample-technologies/rna/total-rna/rneasy-mini-kit/-productdetails>.
73. Castles, A., et al., *Effects of smoking during pregnancy. Five meta-analyses*. Am J Prev Med, 1999. **16**(3): p. 208-15.
74. Spector, L.G., et al., *Prenatal tobacco exposure and cotinine in newborn dried blood spots*. Pediatrics, 2014. **133**(6): p. e1632-8.
75. Pincus-Knackstedt, M.K., et al., *Prenatal stress enhances susceptibility of murine adult offspring toward airway inflammation*. J Immunol, 2006. **177**(12): p. 8484-92.

76. Prins, J.R., et al., *Smoking during pregnancy influences the maternal immune response in mice and humans*. Am J Obstet Gynecol, 2012. **207**(1): p. 76 e1-14.
77. Luppi, P., et al., *The effects of cigarette smoking on circulating maternal leukocytes during pregnancy*. Clin Immunol, 2007. **122**(2): p. 214-9.
78. Prescott, S.L., et al., *Reduced placental FOXP3 associated with subsequent infant allergic disease*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **128**(4): p. 886-887 e5.
79. Larcombe, A.N., et al., *In utero cigarette smoke exposure impairs somatic and lung growth in BALB/c mice*. Eur Respir J, 2011. **38**(4): p. 932-8.
80. Wang, W.J., et al., *Increased prevalence of T helper 17 (Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion patients*. J Reprod Immunol, 2010. **84**(2): p. 164-70.
81. Nakashima, A., et al., *Accumulation of IL-17-Positive Cells in Decidua of Inevitable Abortion Cases*. American Journal of Reproductive Immunology, 2010. **64**(1): p. 4-11.
82. Santner-Nanan, B., et al., *Systemic increase in the ratio between Foxp3+ and IL-17-producing CD4+ T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia*. The Journal of Immunology, 2009. **183**(11): p. 7023-7030.
83. Gluckman, P.D., et al., *Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease*. New England Journal of Medicine, 2008. **359**(1): p. 61-73.
84. Annesi-Maesano, I., D. Moreau, and D. Strachan, *In utero and perinatal complications preceding asthma*. Allergy, 2001. **56**(6): p. 491-497.
85. Windham, G., A. Eaton, and B. Hopkins, *Evidence for an association between environmental tobacco smoke exposure and birthweight: a meta-analysis and new data*. Paediatric and perinatal epidemiology, 1999. **13**(1).
86. Karwowska, W., J. Rachtan, and E. Wieczorek, *Effect of cigarette smoking on IgE levels and circulating lymphocytes in cord blood*. Centr Eur J Immunol, 2008. **33**(4): p. 228-231.
87. Wang, L. and K.E. Pinkerton, *Detrimental effects of tobacco smoke exposure during development on postnatal lung function and asthma*. Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews, 2008. **84**(1): p. 54-60.

88. Cook, D.G. and D.P. Strachan, *Summary of effects of parental smoking on the respiratory health of children and implications for research*. Thorax, 1999. **54**(4): p. 357-366.
89. Upton, M.N., et al., *Permanent effects of maternal smoking on offsprings' lung function*. Lancet, 1998. **352**(9126): p. 453.
90. Finotto, S., et al., *Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet*. Science, 2002. **295**(5553): p. 336-338.
91. Singh, S.P., et al., *Prenatal secondhand cigarette smoke promotes Th2 polarization and impairs goblet cell differentiation and airway mucus formation*. The Journal of Immunology, 2011. **187**(9): p. 4542-4552.
92. Koyasu, S. and K. Moro, *Innate Th2-type immune responses and the natural helper cell, a newly identified lymphocyte population*. Current opinion in allergy and clinical immunology, 2011. **11**(2): p. 109-114.
93. Palomares, O., et al., *Role of Treg in immune regulation of allergic diseases*. European journal of immunology, 2010. **40**(5): p. 1232-1240.
94. Hinz, D., et al., *Cord blood Tregs with stable FOXP3 expression are influenced by prenatal environment and associated with atopic dermatitis at the age of one year*. Allergy, 2012. **67**(3): p. 380-9.
95. Hamzaoui, A., et al., *Transcriptional characteristics of CD4 T cells in young asthmatic children: RORC and FOXP3 axis*. J Inflamm Res, 2011. **4**(1): p. 139-146.
96. Provoost, S., et al., *Decreased FOXP3 protein expression in patients with asthma*. Allergy, 2009. **64**(10): p. 1539-1546.
97. Blacquiere, M.J., et al., *Maternal smoking during pregnancy decreases Wnt signalling in neonatal mice*. Thorax, 2010. **65**(6): p. 553-4.
98. Sharma, S., et al., *A role for Wnt signaling genes in the pathogenesis of impaired lung function in asthma*. American journal of respiratory and critical care medicine, 2010. **181**(4): p. 328-336.
99. Haley, K.J., et al., *RUNX transcription factors: association with pediatric asthma and modulated by maternal smoking*. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 2011. **301**(5): p. L693-L701.
100. Runyon, R.S., et al., *Asthma discordance in twins is linked to epigenetic modifications of T cells*. PloS one, 2012. **7**(11): p. e48796.

101. Rehan, V.K., et al., *Perinatal nicotine exposure induces asthma in second generation offspring*. BMC Med, 2012. **10**: p. 129.
102. Suter, M., et al., *Maternal tobacco use modestly alters correlated epigenome-wide placental DNA methylation and gene expression*. Epigenetics, 2011. **6**(11): p. 1284-94.
103. Maccani, J.Z., et al., *Placental DNA methylation alterations associated with maternal tobacco smoking at the RUNX3 gene are also associated with gestational age*. 2013.
104. Kruis, T., et al., *Heterozygous mutation within a kinase-conserved motif of the insulin-like growth factor I receptor causes intrauterine and postnatal growth retardation*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2010. **95**(3): p. 1137-1142.
105. Meyer, K.F., et al., *Prenatal exposure to tobacco smoke sex dependently influences methylation and mRNA levels of the Igf axis in lungs of mouse offspring*. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 2017: p. ajplung. 00271.2016.
106. Coultas, D.B., *Passive smoking and risk of adult asthma and COPD: an update*. Thorax, 1998. **53**(5): p. 381-387.

## Affidavit



LUDWIG-  
MAXIMILIANS-  
UNIVERSITÄT  
MÜNCHEN

Promotionsbüro  
Medizinische Fakultät



### Eidesstattliche Versicherung

\_\_\_ Sarica, Louisa \_\_\_\_\_  
Name, Vorname

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

### **Untersuchung des Effekts von Zigarettenrauch auf die plazentale Genexpression im Mausmodell**

.....  
.....

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.

\_\_\_ Meerbusch, 13.02.2024 \_\_\_\_\_ Louisa Sarica \_\_\_\_\_

Ort, Datum  
Doktorand

Unterschrift Doktorandin bzw.



## 8 Danksagung

Zunächst möchte ich Frau Prof. Dr. med. Krauss-Etschmann ganz herzlich danken, für die Möglichkeit meine Doktorarbeit unter Ihrer Betreuung durchzuführen. Vor allem bedanke ich mich auch für Ihre Geduld und Hilfestellung.

Bei Herrn Dr. med. Stefan Dehmel bedanke ich mich ganz herzlich für die Einarbeitung in das spannende Thema, für die Hilfe bei der Versuchsdurchführung und Auswertung, für die Unterstützung und Beantwortung meiner vielen Fragen, für die wertvollen Ratschläge und die wiederholte Korrektur.

Mitarbeitern aus dem CPC (ehemalig und aktuell), speziell Dr. rer. nat Raphael Prunghaud, Dr. rer. nat Sabine Bartel, Dr. rer. nat. Petra Nathan, sowie Dr. med. Maria Fauth und Rabea Imker danke ich für die Einarbeitung, Unterstützung und Zusammenarbeit.

Insbesondere möchte ich mich bei meiner Familie für die großzügige Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung bedanken. Zudem möchte ich speziell meinen Eltern danken, die mich in den letzten Jahren immer wieder gepusht haben, meine Doktorarbeit fertig zustellen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Emin, der mich immer dabei unterstützt, meine beruflichen Ziele zu verfolgen.