

Diplomarbeit

**Der Einfluss von IGF-2 auf die fetale
Lungenentwicklung**

eingereicht von

Marika Mang

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Geburtshilflich - Gynäkologische Universitätsklinik

LKH-Univ. Klinikum Graz

unter der Anleitung von

Ass.-Prof. PD Dr. Philipp Klaritsch

Dr. rer. nat. Ursula Hiden

Graz, am

(Marika Mang)

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am _____

(Marika Mang)

Meiner verstorbenen Uroma Anna gewidmet.

Danksagungen

Ich möchte mich an erster Stelle bei meiner Familie bedanken. Ich danke meinen Eltern für die finanzielle Unterstützung, die es mir erlaubt hat mich stets voll auf mein Studium zu konzentrieren. Ich bedanke mich auch für das Vertrauen meiner Eltern, die mir bei der Auswahl des Studiums meinen Willen ließen und mich nie gehindert hatten meinem Herzen zu folgen. Ich bin dankbar für die positiven und motivierenden Worte meiner Familie, die mir immer wieder Kraft und Motivation im Studium gegeben haben.

Ich möchte mich auch bei meinem Bruder Klemens bedanken, dessen bloße Anwesenheit, mein Leben zu etwas ganz Besonderem gemacht hat. Dein Dasein lieber kleiner Bruder hat mir geholfen, mich weiter zu entwickeln! Lieber Klemens, ich danke dir, dass du in mein Leben getreten bist und möchte auch immer für dich da sein, wie du für mich da warst! Du hast eine stolze große Schwester aus mir gemacht!

Einen besonderen Dank möchte ich meiner Oma Hilde aussprechen, die stets an mich geglaubt hat und mich in meinem bisherigen Leben immer unterstützt hat. Danke für alles liebe Oma!

Meinem besten Freund, und gleichzeitig jahrelangen Wegbegleiter, Stefan möchte ich für die gemeinsame Zeit in Graz danken. Lieber Stefan, du hast mich immer wieder motiviert weiter zu arbeiten, meine Ziele zu erreichen und mein Studium abzuschließen! Ich hoffe, dass unsere private und berufliche Zukunft uns weiterhin erlaubt eine schöne Freundschaft zu genießen.

Allen meinen engen Freunden, Studienkollegen und Verwandten, die hier namentlich unerwähnt blieben, gebührt mein Dank, da die Begegnung und der Dialog mit ihnen, die Wertschätzung die mir entgegen gebracht wurde und auch die Reflexion meiner Person mich dahin gebracht hat, wo ich jetzt stehe-nämlich zum Abschluss meines Medizinstudiums.

Daran ist auch mein Betreuer Ass.-Prof. PD Dr. Philipp Klaritsch maßgeblich beteiligt, der mich während des Verfassens meiner Diplomarbeit unterstützt hat. Ich bedanke mich für das Vertrauen, dass Sie bei der Vergabe des Themas der Diplomarbeit hatten. Ich danke Ihnen für die Möglichkeit ein wissenschaftliches Thema zu bearbeiten, was mir nicht immer leicht gefallen ist, mich aber für meine berufliche Karriere optimal vorbereitet hat. Ich habe durch das Bearbeiten des

Themas und dem Verfassen meiner Diplomarbeit viele neue Fähigkeiten erlernt und bin erstaunt, aber auch stolz, so viel dazu gelernt zu haben.

Dabei gebührt auch meiner Co-Betreuerin, Dr. Ursula Hiden, größter Dank. Ich bedanke mich für die Geduld, die du mir entgegen gebracht hast und die ausgezeichnete Unterstützung und Betreuung im Labor! Auch dem gesamten Team des Forschungslabors möchte ich meinen Dank aussprechen. Ich konnte mich bei Fragen und Unklarheiten stets an die Mitarbeiter wenden und wurde stets respektvoll behandelt.

Ich möchte auch Frau Anna-Maria Kuess nicht unerwähnt lassen, die viele Stunden in die Bearbeitung der Präparate investiert hat und unermüdlich an Protokollen und Färbeprozessen gearbeitet hat. Vielen Dank!

Herzlichen Dank auch die Forschungsgruppe in Argentinien, die freundlicher Weise die bereits behandelten Präparate zur Verfügung gestellt hat. Gracias!

Zusammenfassung

Hintergrund: Die Insulin-like growth factors (IGFs) spielen eine wesentliche Rolle in der fetalen Lungenentwicklung und sind wesentlich an der Proliferation und Differenzierung des Lungengewebes beteiligt. Ziel dieser tierexperimentellen Arbeit war es, den Einfluss von IGF-2 auf die Lungenentwicklung fetaler Ratten zu untersuchen.

Material und Methoden: Die Lungen von fetalen Ratten, die an Tag 19, 20 und 21 der Schwangerschaft mittels intraperitonealer IGF-2 Injektion unterschiedlicher Konzentration behandelt wurden, wurden mittels RT-PCR und Immunhistochemie analysiert. Den beiden Versuchsgruppen wurde rekombinantes humanes IGF-2 in einer Konzentration von entweder 0,0002 μ g beziehungsweise 0,2 μ g in 50 μ l Kochsalzlösung gelöst intraperitoneal appliziert, während Feten der Kontrollgruppe jeweils 50 μ l Kochsalzlösung verabreicht wurde. Untersucht wurde die Expression verschiedener Marker, die als spezifische Indikatoren für die Entwicklung der einzelnen Kompartimente in der fetalen Lunge gelten. Dies waren Ki-67, VEGF, BMP-4, tPA und FGF-10. Die statistische Auswertung wurde mittels Prism Graph Pad unter Anwendung von one-way ANOVA und TUKEY *post hoc* Test durchgeführt.

Ergebnisse: Die intraperitoneale Applikation von IGF-2 steigerte die mRNA-Expression von Ki-67 und tPA, während für VEGF nur ein Trend zur Expressionssteigerung festzustellen war und auch für die anderen Parameter keine signifikanten Unterschiede gefunden werden konnten. Die Proteinexpression der untersuchten Marker unterschied sich nicht signifikant von den Vergleichsgruppen, allerdings war ein Trend für eine vermehrte Expression von BMP-4 und VEGF zu beobachten.

Conclusio: Die fetale intraperitoneale IGF-2 Administration scheint die generelle Proliferation von Lungengewebe und die Ausbildung kleinerer Lungengefäße und damit die Lungenverzweigung zu fördern.

Abstract

Background: Insulin-like growth factors play a pivotal role in fetal lung development and are involved in proliferation and differentiation of lung tissue. Aim of this work was to investigate the effect of intraperitoneal IGF-2 administration on lung development of rat fetuses.

Materials and Methods: Fetal rats have been treated with intraperitoneal injection of recombinant human IGF-2 on embryonic day 19, 20 and 21. IGF-2 groups received either 0.0002 μ g or 0.2 μ g IGF-2 dissolved in 50 μ l saline while controls were treated with 50 μ l saline only. Rats were delivered at E 21.5 and lungs were dissected, weighed and frozen. The expression of markers specific for the development of different compartments in the fetal lung was investigated by real time-PCR and immunohistochemistry. Among those were Ki-67, VEGF, BMP-4, tPA and FGF-10. Statistical analysis was performed with Prism Graph Pad by using one-way ANOVA and TUKEY post hoc test.

Results: Intraperitoneal application of IGF-2 increased mRNA expression of Ki-67 and tPA while VEGF only showed a trend for increased expression. The other markers did not reveal any significant differences. However, there was a trend for an increased VEGF mRNA expression and BMP-4 and FGF-10 protein expression.

Conclusion: Fetal intraperitoneal administration of IGF-2 seems to advance general proliferation of lung tissue and formation of small lung vessels and thus may promote branching of airway structures.

Inhaltsverzeichnis

Inhalt

Danksagungen	4
Zusammenfassung	6
Abstract	7
Inhaltsverzeichnis	8
Glossar und Abkürzungen	10
Abbildungsverzeichnis	12
Tabellenverzeichnis	13
1 Einleitung	14
1.1 Arbeitshypothese	14
2 Allgemeine Grundlagen der Lunge	15
2.1 Aufbau der Lunge	15
2.1.1 Lungenlappen	15
2.1.2 Lungensegmente	16
2.1.3 Lungenläppchen	16
2.1.4 Endaufzweigung	17
2.2 Lungenentwicklung	17
2.2.1 Embryonale Phase	18
2.2.2 Pseudoglanduläre Phase	19
2.2.3 Kanalikuläre Phase	21
2.2.4 Sakkuläre Phase	21
2.2.5 Alveoläre Phase	21
2.3 Störungen der Lungenentwicklung	22
2.3.1 Embryonale Phase	22
2.3.2 Pseudoglanduläre Phase	23
2.3.3 Kanalikuläre Phase	23
2.3.4 Sakkuläre/Alveoläre Phase	23
2.4 Wachstumsregulierende Faktoren der Lungenentwicklung	23
2.4.1 Fetales Lungenvolumen, fetale Lungenflüssigkeit, Fruchtwasser und Atembewegungen des Feten	23
2.4.2 Hormone, Transkriptions- und Wachstumsfaktoren	24
2.4.3 Umweltfaktoren	25
2.5 Lungenerkrankungen	26
2.5.1 Angeborene Zwerchfellhernie und Lungenhypoplasie	26
2.5.2 Hypoplasie der Lunge	26
2.5.3 Chronische Lungenerkrankung bei Frühgeburtlichkeit	28
3 Das IGF-System	29
3.1 IGF-2	29
3.1.1 Genlokalisierung und IGF-2 Gen	29
3.1.2 Die Struktur des IGF-2 Proteins	30
3.1.3 Synthese und biologische Wirkung	31
3.1.4 Die Bedeutung von IGF-2 in der fetalen Lungenentwicklung:	31
3.2 IGF-Rezeptoren	32
3.2.1 Typ-1 Rezeptor	32
3.2.2 Typ-2 Rezeptor	33
3.3 IGFBPs (Insulin-like growth factor binding proteins)	34
3.3.1 Genlokalisierung und IGFBP-Genstruktur	34
3.3.2 IGFBP-Struktur	35

3.3.3	Korrelation zwischen Struktur und Funktion	35
3.3.4	Biologische Funktion der IGF-BPs	36
4	Material und Methoden.....	38
4.1	Ratten.....	38
4.1.1	IGF-2 Administration.....	39
4.2	Untersuchte Marker.....	40
4.2.1	Ki-67	40
4.2.2	VEGF (<i>vascular endothelial growth factor</i>)	40
4.2.3	BMP-4 (<i>bone morphogenetic protein 4</i>).....	41
4.2.4	tPA (<i>tissue plasminogen activator</i>)	42
4.2.5	FGF-10 (<i>fibroblast growth factor-10</i>).....	43
4.3	Real time-PCR	44
4.3.1	Quantifizierung der RNA-Proben	44
4.3.2	cDNA-Synthese	44
4.3.3	Real time-PCR.....	44
4.3.4	Auswertung der Ergebnisse der RT-PCR.....	45
4.4	Immunhistochemie	45
4.4.1	Anfertigung der Präparatschnitte	45
4.4.2	Immunhistochemische Färbung.....	46
4.4.3	Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	47
4.5	Verwendete Materialien und Geräte.....	48
4.5.1	Materialien und Chemikalien	48
4.5.2	Antikörper	49
4.5.3	Geräte.....	49
4.5.4	Lösungen.....	50
5	Ergebnisse	51
5.1	Ergebnisse der real time-PCR.....	51
5.1.1	Ki-67	51
5.1.2	VEGF.....	52
5.1.3	BMP-4.....	53
5.1.4	tPA.....	53
5.1.5	FGF-10	55
5.2	Ergebnisse Immunhistochemie	55
5.2.1	Ki-67	56
5.2.2	VEGF.....	57
5.2.3	BMP-4.....	58
5.2.4	tPA.....	59
5.2.5	FGF-10	59
6	Diskussion.....	61
7	Literaturverzeichnis	64

Glossar und Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
3D	dreidimensional
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Aqua destillata
BMP-4	<i>bone morphogenetic protein-4</i>
bp	<i>base pair</i>
BP	<i>binding protein</i>
ca.	circa
cDNA	<i>copy</i> Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
E	<i>embryotic day</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FGF-10	<i>fibroblast growth factor-10</i>
g	Gramm
H ₂ O	Wasser (Dihydrogen monoxide)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IGF-1	<i>insulin-like growth factor 1</i>
IGF-1R	Typ-1 <i>insulin-like growth factor</i> Rezeptor
IGF-2	<i>insulin like growth factor 2</i>
IGF-2R	Typ-2 <i>insulin-like growth factor</i> Rezeptor
IGFBP	<i>insulin-like growth factor binding protein</i>
kbp	<i>kilo base pair</i>
kDa	Kilodalton
M	Mol
min.	Minute
mm	Millimeter

mMol	Millimol
MN	<i>mean</i>
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NTC	<i>non template control</i>
O ₂	Sauerstoff (Dioxid)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pH	potentia hydrogenii
RDS	<i>respiratory distress syndrome</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RPL30	ribosomal protein L30
Rpm	<i>rounds per minute</i>
RT-PCR	<i>real time polymerase chain reaction</i>
Shh	<i>sonic hedgehog</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
β	beta
SSW	Schwangerschaftswoche
Tab.	Tabelle
TBS	Tris Buffered Saline
tPA	<i>tissue plasminogen activator</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>
ZNS	Zentralnervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der Lunge mit Lungenlappen.	15
Abbildung 2:	Aufzweigung des Bronchialbaumes	16
Abbildung 3:	Frühe Entwicklung der humanen Lunge.....	18
Abbildung 4:	Entwicklung des Brochialsystems.	19
Abbildung 5:	Veränderung des Lungenparenchyms während der pseudo- glandulären, kanalikulären und sakkulären Phase	20
Abbildung 6:	Schematische Darstellung der terminalen Lungenregionen in der alveolären Phase der Lungenentwicklung.....	22
Abbildung 7:	Schematische Darstellung des IGF-2 Proteins.....	30
Abbildung 8:	IGF-2 und Rezeptoren	32
Abbildung 9:	Expression von Ki-67 mRNA in fetalem Lungengewebe.....	51
Abbildung 10:	Expression von VEGF mRNA in fetalem Lungengewebe.	52
Abbildung 11:	Expression von BMP-4 mRNA in fetalem Lungengewebe	53
Abbildung 12:	Expression von tPA mRNA in fetalem Lungengewebe	54
Abbildung 13:	Expression von FGF-10 mRNA in fetalem Lungengewebe	55
Abbildung 14:	Expression Ki-67 positiver Zellen	56
Abbildung 15:	Expression VEGF positiver Zellen.....	57
Abbildung 16:	Expression BMP-4 positiver Zellen	58
Abbildung 17:	Expression tPA positiver Zellen	59
Abbildung 18:	Expression FGF-10 positiver Zellen	60

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Phasen der Lungenentwicklung bei Mensch und Ratte. 17

Tabelle 2: Genlokalisierung und Molekularmasse der IGFBPs..... 34

1 Einleitung

Die fetale Lungenentwicklung wird durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst (Silva et al., 2006). Dazu zählen unter anderem ausreichende Sekretion von Lungenflüssigkeit, Atembewegungen des Feten, Umweltfaktoren aber auch Hormone, Transkriptions- und Wachstumsfaktoren (Joshi & Kotecha, 2007). Es gibt Hinweise darauf, dass das Insulin-like growth factor (IGF)-System eine zentrale Rolle in der Entwicklung und Differenzierung der fetalen Lunge spielt. Die Peptide IGF-1 und -2 sind Wachstumsfaktoren, die mit bestimmten Membranrezeptoren interagieren um die Proliferation und Differenzierung von Zellen zu stimulieren. Diese Wirkung wird über die Bindung an den Typ-1 Rezeptor (IGF-1R) vermittelt. (Moats-Staats, 1994). Beide, also IGF-1 und -2, deren Rezeptoren und Bindungsproteine werden in der fetalen Lunge von Menschen, Nagern und anderen Gattungen exprimiert. Die Expression der messenger RNA (mRNA) von IGF-1 ist in mesenchymalen Zellen, besonders in jenen die das Epithel der Atemwege umgeben, gefunden worden. In Rattenlungen ist IGF-1 ab Tag 15 der Schwangerschaft nachweisbar wobei die Konzentration ab Tag 17 abfällt und bis zur Geburt auf diesem niedrigeren Level bleibt. IGF-2 hingegen kommt besonders in den Epithelzellen der Lunge vor, speziell im Bereich der leitenden Luftwege und wird vor allem gegen Ende der Schwangerschaft (Tag 19-21) exprimiert (Silva et al., 2006).

1.1 Arbeitshypothese

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von intrauterin appliziertem IGF-2 auf die fetale Lungenentwicklung zu untersuchen. Um diesen Effekt untersuchen zu können wurden Rattenfeten *in utero* durch intraperitoneale Administration von entweder Placebo oder IGF-2 (0,0002µg oder 0,2µg) an Tag 19, 20 und 21 der Schwangerschaft behandelt und die Expression spezieller Proliferationsmarker beziehungsweise Proteinen, die als Marker für Lungenreifeung assoziiert werden, mittels real time-PCR und Immunhistochemie auf mRNA- und Proteinebene untersucht.

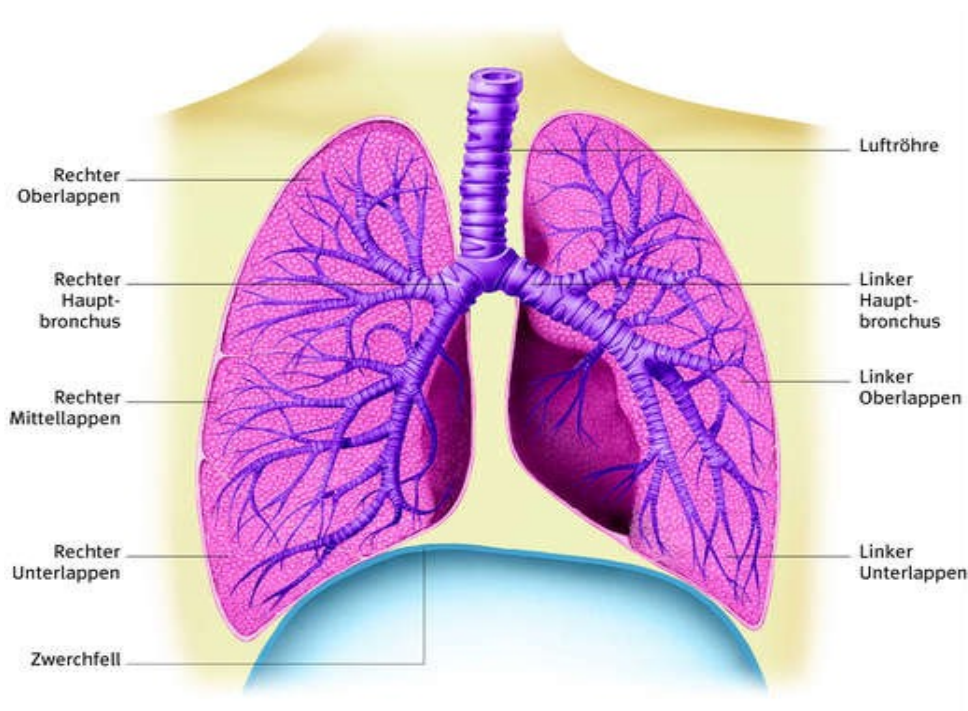
2 Allgemeine Grundlagen der Lunge

2.1 Aufbau der Lunge

Die Lunge liegt als paariges, in der Form halbkegeliges Organ im Thorax vor. Die Lunge hat auf Grund ihrer Lage Kontakt zu den Rippen, dem Diaphragma und dem Mediastinum. Die dem Mediastinum zugewandte Seite der Lunge beinhaltet den Lungenhilus, der als Eintritts- bzw. Austrittsstelle der großen Gefäße und der Bronchien dient (Fritsch & Kühnel, 2003). An der Oberfläche überzieht die Pleura pulmonalis als seröse Haut die Lunge (Hartmann et al., 2005).

2.1.1 Lungenlappen

Die rechte Lunge lässt sich durch Fissuren in drei Lungenlappen - einen Oberlappen, Unterlappen und Mittellappen - unterteilen, die linke Lunge kann in einen Oberlappen und einen Unterlappen unterteilt werden. Die Teilung des Hauptbronchus verläuft idem (Fritsch & Kühnel, 2003).

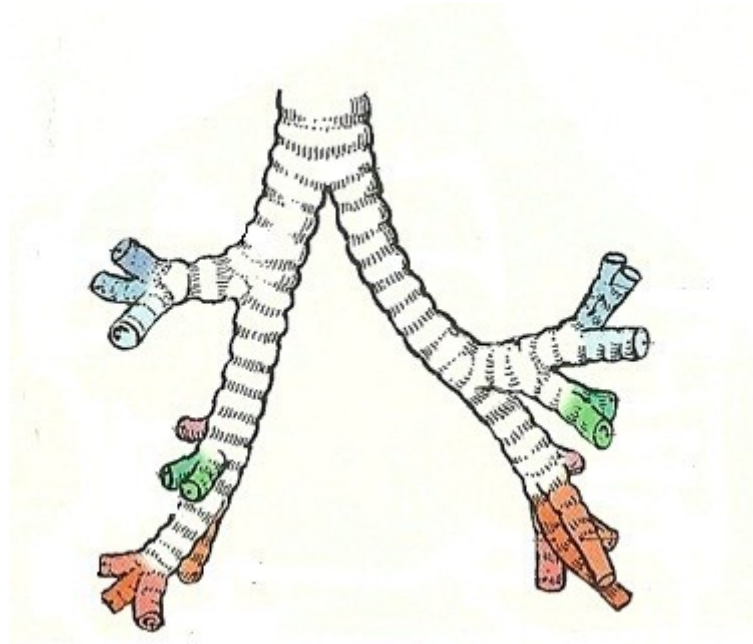


(Quelle: www.wissen.de)

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Lunge mit Lungenlappen (www.wissen.de).

2.1.2 Lungensegmente

Die weitere Gliederung der Lunge unterwirft sich dem Teilungsprinzip des Bronchialbaums (Abb. 2). Es entstehen somit als weitere Untereinheiten die Lungensegmente, gemäß der Teilung Lappenbronchi in Segmentbronchi. Es lassen sich rechts zehn Lungensegmente und links neun Lungensegmente darstellen (Fritsch & Kühnel, 2003).



(Quelle: modifiziert nach Fritsch & Kühnel, 2003)

Abbildung 2: Aufzweigung des Bronchialbaumes (Fritsch & Kühnel, 2003).

Die Blutversorgung der Segmente erfolgt über jeweils einen Ast der Arteria pulmonalis. Somit entspricht ein Lungensegment einer bronchoarteriellen Einheit. Der venöse Blutabfluss erfolgt durch Äste der Lungenvenen, welche an der Oberfläche eines Segments verlaufen und somit die Segmentgrenzen darstellen. Im weiteren Verlauf Richtung Lungenhilus vereinigen sich die Venenäste und bilden die großen Lungenvenen (Fritsch & Kühnel, 2003).

2.1.3 Lungenläppchen

Durch weitere Unterteilung der Bronchiolen der Lungensegmente in mittlere und kleinere Bronchien, der sogenannten Bronchioli, entstehen die Lungenläppchen. Ein Lungenläppchen wird einem Bronchiolus zugeteilt. Der bevorzugte Sitz der bis zu drei cm großen Läppchen befindet sich an der Lungenoberfläche (Fritsch & Kühnel, 2003).

2.1.4 Endaufzweigung

Der weitere Feinbau der Lunge kommt durch die nochmalige Aufzweigung der einzelnen Bronchiolen zustande. Dabei tritt eine 3-4malige Teilung eines Bronchiolus eines Lungenläppchens ein, die dann den Endaufzweigungen der Lunge entspricht. Zu den terminalen Lungenabschnitten zählen die Bronchioli respiratorii, sowie die Ductuli alveolares mit den Alveoli pulmonis (Fritsch & Kühnel, 2003). Die Alveolen zeichnen sich durch eine überwiegend polygonale Form aus und liegen beim Adulten in einer Größe von 0,2 bis 0,5 mm vor (Hartmann et al., 2005). In der Lunge befinden sich in etwa 300 Millionen Alveolen (Klinke & Silbernagl, 2003).

Alveolen, die benachbart vorliegen, teilen sich jeweils eine Alveolarwand, die ein Blutkapillarnetz enthält. Die Alveolen werden innen von Epithelzellen von Typ-1 und -2 ausgekleidet. Dabei kann deren Basalmembran mit der von den Kapillaren verschmolzen vorliegen (Hartmann et al., 2005). Die äußerst dünne Schicht des Gewebes zwischen Alveolen und Kapillaren dient einer möglichst reduzierten Diffusionsstrecke für O₂ und CO₂ (Klinke & Silbernagl, 2003).

2.2 Lungenentwicklung

Die Lungenentwicklung läuft in fünf Stadien ab.

	Mensch	Ratte
Embryonale Phase	0 -7 Wochen	Tag 11 - 13
Pseudoglanduläre Phase	7 -17 Wochen	Tag 13 - 18,5
Kanalikuläre Phase	17 - 27 Wochen	Tag 18,5 - 20
Sakkuläre Phase	28 - 36 Wochen	Tag 21 - 4. Tag post partum
Alveoläre Phase	36 Wochen bis 2 Jahre nach der Geburt	ab 4. postnatalem Tag

(Quelle basierend auf Joshi & Kotecha., 2007 und Schittny & Burri, 2007)

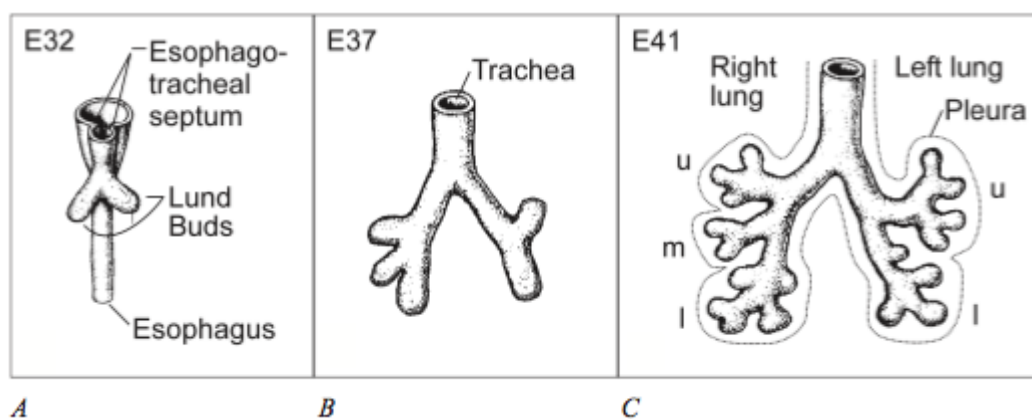
Tabelle 1: Phasen der Lungenentwicklung bei Mensch und Ratte.
Tabelle 1 zeigt eine Gegenüberstellung des Auftretens der verschiedenen Phasen der Entwicklung während der Schwangerschaft (Joshi & Kotecha, 2007; Schittny & Burri, 2007).

Die Entwicklung der Lunge beginnt bereits beim drei Wochen alten Embryo. Die Lunge ist ektodermaler Herkunft und entwickelt sich als Aussackung der ventralen Wand des Vorderdarmes (Joshi & Kotecha, 2007). Die vollständige Trennung der

luftleitenden Atemwege von der Speiseröhre wird durch die Ausbildung des Septum oesophagotracheale (siehe Abb. 3A) ausgeführt (Sadler, 1998).

2.2.1 Embryonale Phase

Die embryonale Phase der fetalen Lungenentwicklung beginnt beim drei Wochen alten Embryo und dauert bis zur siebenten intrauterinen Schwangerschaftswoche. Dabei bildet sich eine Aussackung der ventralen Wand des primitiven Vorderdarms. Die Trachea wird durch das Auswandern epithelialer Zellen ektodermaler Herkunft in das umgebende mesenchymale Gewebe geformt. In der ersten Phase der Lungenentwicklung findet bereits die Teilung in den rechten und linken Hauptbronchus sowie die weitere Entwicklung in lobuläre und segmentale Bronchiolen statt, welche um die fünfte Woche auftreten (Jeffery, 1998).



(Quelle: Schittny & Burri, 2007)

Abbildung 3: Frühe Entwicklung der humanen Lunge.

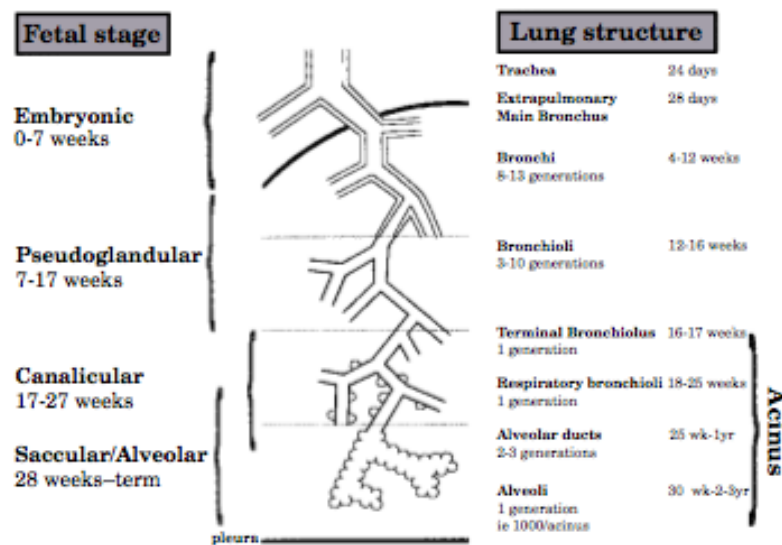
A zeigt die Trennung der Trachea zum Ösophagus durch die Ausbildung des Septum oesophagotracheale. An Tag 32 der Schwangerschaft lassen sich bereits die zwei Hauptbronchi erkennen. **B** stellt die fetale Lunge am 37. Tag der Schwangerschaft dar: die Aufteilung der Hauptbronchi in die Lappenbronchi. An Tag 41 der Schwangerschaft (**C**) ist die Entwicklung der Lunge in Segmentbronchi fortgeschritten. u=Oberlappen, m=Mittellappen, l=Untere Lappen (Schnitty & Burri, 2007).

Am Ende dieser Phase lassen sich 18 Läppchen erkennen. Die vaskuläre Versorgung beginnt zudem mit ihrer Entwicklung. Aus dem sechsten aortalen Bogen entwickelt sich eine Aussackung, aus der sich in der weiteren Entwicklung die Lungenarterien und Lungenvenen bilden (Joshi & Kotecha, 2007).

Bei Ratten beginnt die Lungenentwicklung in der embryonalen Phase ab Tag 11 der Schwangerschaft und dauert bis zu Tag 13 (Schittny & Burri, 2007).

2.2.2 Pseudoglanduläre Phase

Im Anschluss an die embryonale Phase findet die pseudoglanduläre Phase der Lungenentwicklung statt, die durch eine weitere Teilung der Lungenwege gekennzeichnet ist, welche in dieser Phase am raschesten voranschreitet.



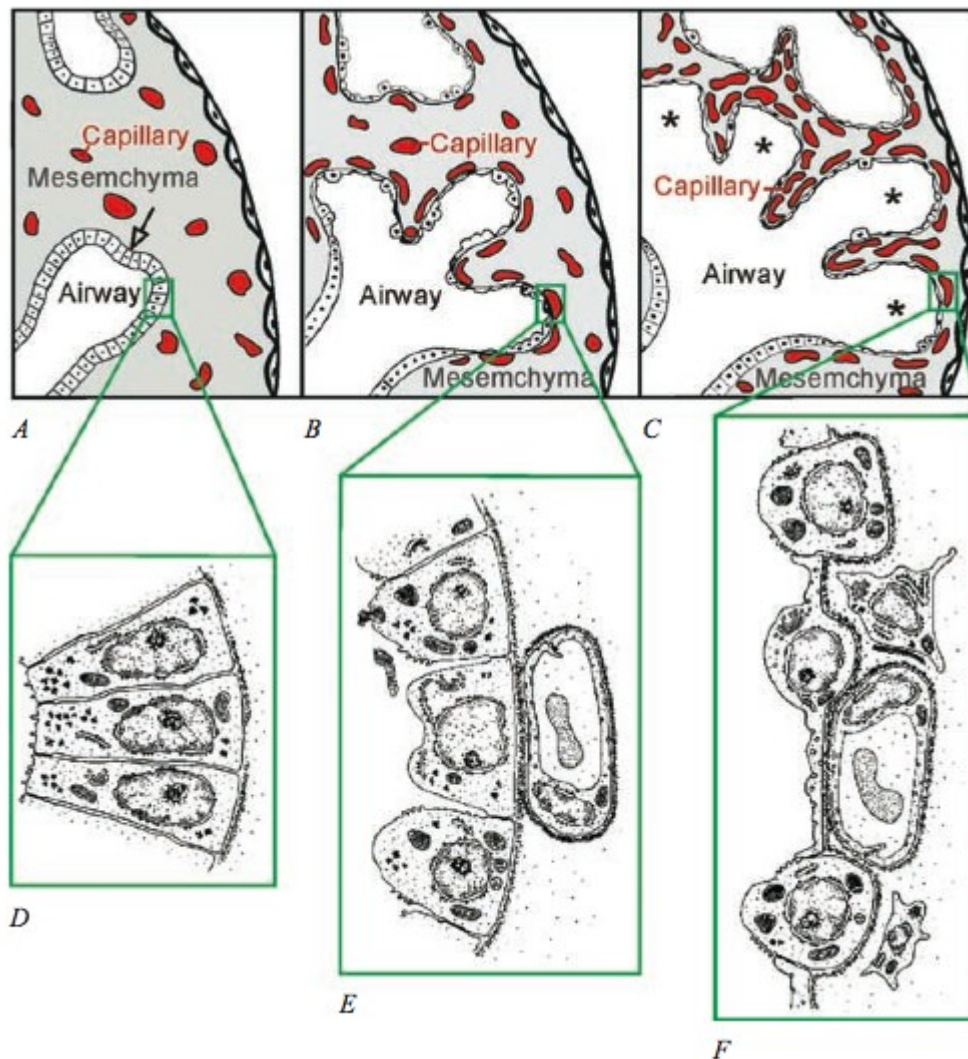
(Kotecha, 2000)

Abbildung 4: Entwicklung des Bronchialsystems. Stadien der normalen Lungenentwicklung mit Entwicklung der luftleitenden Strukturen innerhalb der einzelnen Stadien (Kotecha, 2000).

Nach 14 Wochen sind bereits 70% der bei der Geburt vorhandenen Lunge gebildet (Jeffery, 1998). Die Bildung leitender Luftwege und terminaler Bronchiolen ist am Ende von Woche 17 der Schwangerschaft abgeschlossen (Kotecha, 2000). Die weitere Entwicklung der Luftwege ist durch die Wechselwirkung epithelialer beziehungsweise mesenchymaler Einflüsse geprägt. Mesenchym in den Bronchien veranlasst die Verästelung des Luftweges, das Mesenchym in der Trachea hemmt dies hingegen (Mercus et al., 1996). Im weiteren Verlauf der zweiten Phase der Entwicklung entsteht aus dem primitiven Epithel im proximalen Abschnitt der Luftwege ein Zylinderepithel. Distal geschieht die Entwicklung von kubischem Epithel, welches sich durch einen hohen Gehalt an Glykogen auszeichnet und eine vorläufige Form von Typ-2 Zellen darstellt. Im Verlauf dieses

Entwicklungsstadiums kommt es zur Bildung der präacinären Strukturen. Die großen Gefäße sind gebildet (Joshi & Kotecha, 2007).

Bei Ratten findet die Entwicklung der Lunge im pseudoglandulären Stadium von Tag 13 – 18,5 der Schwangerschaft statt (Schittny & Burri, 2007).



(Quelle: Schittny & Burri, 2007)

Abbildung 5: Veränderung des Lungenparenchyms während der pseudoglandulären, kanalikulären und sakkulären Phase der Lungenentwicklung. A stellt die Lunge während der pseudoglandulären Phase dar: epitheliale Tubuluszellen wachsen in das umliegende Mesenchym ein. D zeigt das hochprismatische Epithel des Bronchialbaumes in dieser Phase der Lungenentwicklung. B: schematische Darstellung des Lungenparenchyms während der kanalikulären Phase. Das Epithel der luftleitenden Strukturen präsentiert sich in differenzierterer Form (E): Kapillaren lagern sich an das Epithel der luftleitenden Strukturen an. In der sakkulären Phase (C) findet die Ausbildung der sakkulären Strukturen (*) statt. Die Lungenkapillaren ordnen sich näher an das Lungenepithel an (F) (Schittny & Burri, 2007).

2.2.3 Kanalikuläre Phase

Die dritte Phase der Lungenentwicklung zeichnet sich durch zwei wesentliche Schritte aus. Einerseits geschieht die Differenzierung der Pneumozyten Typ-1 und -2, andererseits die Bildung der alveolar-kapillären Schranke. In der kanalikulären Phase kommt es zur weiteren Differenzierung des Bronchialsystems bis hin zu der Entstehung primitiver azinärer Strukturen. In der 24. Schwangerschaftswoche lässt sich Surfactant in der Lunge nachweisen, was einen Gasaustausch ermöglichen würde und einen wesentlichen Punkt in der Entwicklung der Lunge darstellt (Joshi & Kotecha, 2007).

Zwischen Tag 18,5 und 20 der Schwangerschaft kann bei Ratten die Lungenentwicklung in der kanalikulären Phase beobachtet werden (Schittny & Burri, 2007).

2.2.4 Sakkuläre Phase

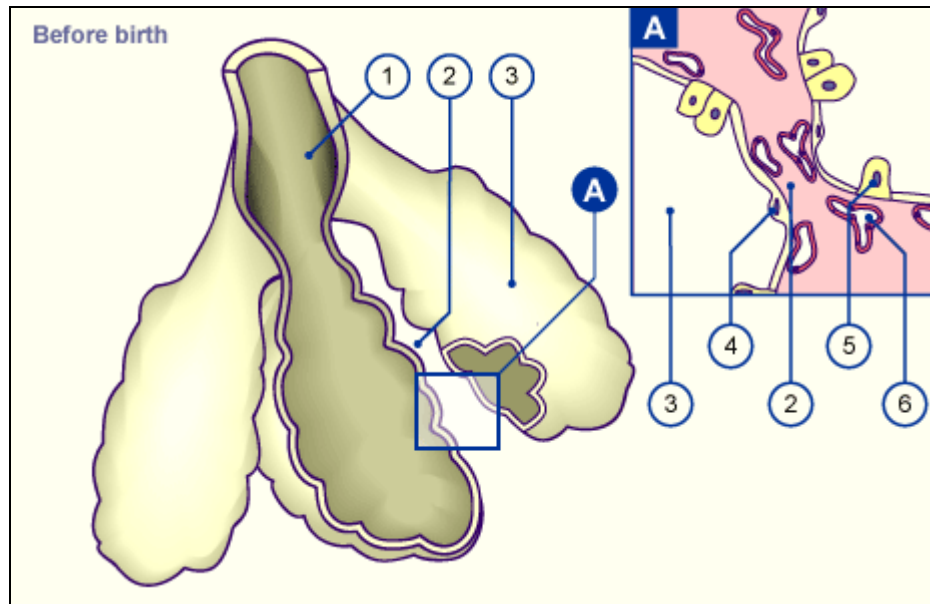
Im Zeitraum von der 28. bis zur 36. Schwangerschaftswoche kommt es zur Vergrößerung peripherer Lungenabschnitte, die Verästelung ist zu diesem Zeitpunkt schon allmählich abgeschlossen. Die azinären Tubulusstrukturen dilatieren zu sakkulären Formen. Weiters kommt es zu einer Abnahme der Wandstärke der Luftwege und somit einer Zunahme der Gasaustauschfläche. Epithelzellen von Typ-1 und -2 durchlaufen einer weiteren Differenzierung (Joshi & Kotecha, 2007). Typ-2 Epithelzellen entwickeln sich zu den zukünftigen Alveolen. Die Epithelzellen von Typ-1 unterlaufen hingegen einer Entwicklung hin zu Epithelzellen vom Phänotyp einer Zelle von Typ-2 (www.rdssyndrome.com).

Bei Ratten hingegen beginnt die sakkuläre Phase der Lungenentwicklung ab Tag 21 der Schwangerschaft und setzt sich bis vier Tage postpartum fort (Schittny & Burri, 2007).

2.2.5 Alveoläre Phase

Die alveoläre Phase der Lungenentwicklung beginnt ab der 36. Schwangerschaftswoche und setzt sich noch bis 24 Monate postpartum fort. Wesentliche Schritte dieser Entwicklungsphase (siehe Abb. 6) sind die Bildung sekundärer Septa im terminalen Abschnitt des Bronchialbaumes sowie die endgültige Ausbildung der Alveolen (Joshi & Kotecha, 2007).

Bei Ratten setzt die alveoläre Phase erst ab dem vierten postnatalen Tag ein. Die Lunge befindet sich bis zu Tag 14 *post partum* im alveolären Stadium (Schittny & Burri, 2007).



(Quelle: www.embryology.ch)

Abbildung 6: Schematische Darstellung der terminalen Lungenregionen in der alveolären Phase der Lungenentwicklung. Ductus alveolaris (1), primäre Septen (2), Saccus alveolaris (3). A zeigt einen schematischen histologischen Ausschnitt: Pneumozyt Typ-1 (4), Pneumozyt Typ-2 (5), Kapillaren (6). (www.embryology.ch)

2.3 Störungen der Lungenentwicklung

2.3.1 Embryonale Phase

Diese frühe Phase der Lungenentwicklung nimmt eine entscheidende Rolle bezüglich der postnatalen Mortalität beziehungsweise Morbidität des Feten ein. Sollte es in dieser Phase zu Störungen im Sinne einer Agenesie von Trachea oder Lunge kommen, ist diese mit dem Leben nicht vereinbar. Andere Formen von Anomalien wie Tracheomalazie oder Bronchomalazie, das Vorliegen ektooper Lappen oder angeborener Zysten in den Lobuli können zu deutlicher respiratorischer Morbidität führen. Während der Vaskularisation in dieser Phase der Lungenentwicklung kann es zur Ausbildung arterio-venöser Malformationen kommen (Joshi & Kotecha, 2007).

2.3.2 Pseudoglanduläre Phase

Bei Defekten der normalen Teilung der Luftwege in der pseudoglandulären Phase der Lungenentwicklung kann es zur Lungenhypoplasie oder Sequestration sowie zur Ausbildung von zystischen adenomatoiden Malformationen kommen. Beim Vorliegen von Verschlussproblemen der pleuro-peritonealen Membran in der pseudoglandulären Phase kann es zum Auftreten einer angeborenen Zwerchfellhernie kommen (Joshi & Kotecha, 2007).

2.3.3 Kanalikuläre Phase

Störungen der Lungenentwicklung in der kanalikulären Phase können zu Lungenhypoplasie, *respiratory distress syndrome* (RDS) oder zur Dysplasie azinärer Strukturen führen (Joshi & Kotecha, 2007).

2.3.4 Sakkuläre/Alveoläre Phase

Beim Vorliegen von Störungen der Lungenentwicklung in diesen beiden Phasen kann es zum Auftreten einer pulmonalen Hypoplasie, RDS beziehungsweise zu einer chronischen Lungenerkrankung bei Frühgeburtlichkeit kommen. Die Dysplasie von azinären Strukturen oder von Alveolarkapillaren ist in dieser Phase bei Fehlentwicklungen möglich (Joshi & Kotecha, 2007).

2.4 Wachstumsregulierende Faktoren der Lungenentwicklung

2.4.1 Fetales Lungenvolumen, fetale Lungenflüssigkeit, Fruchtwasser und Atembewegungen des Feten

Das Aufrechterhalten des fetalen Lungenvolumens durch kombinierte Mechanismen von Sekretion von Lungenflüssigkeit und Atembewegungen des Feten ist vermutlich der bestimmende Faktor fetalen Lungenwachstums. Experimente am Schaf haben gezeigt, dass eine Dehnung des Lungengewebes durch vermehrte intrapulmonale Flüssigkeit zu einer Zunahme des Lungenwachstums führt, während ein verringerter intrapulmonaler Druck in einer Lungenhypoplasie resultiert (Moessinger et al., 1990). Ratten, die ein

Oligohydramnion aufwiesen, zeigten eine verzögerte Entwicklung der Lunge und von Typ-1 Zellen. Typ-2 Zellen hingegen und die Produktion von Surfactant zeigten sich dadurch jedoch nicht negativ beeinflusst (Kitterman et al., 2002).

Das Lungenwasser selbst wird in den distalen Lungenabschnitten von Epithelzellen gebildet. Bei Schafen konnte beobachtet werden, dass die Menge an sezernierter Flüssigkeit zum Ende der Schwangerschaft hin zunimmt und unmittelbar zum Termin hin reduziert wird um die postpartale Adaption bewältigen zu können. Vasopressin, Katecholamine, Kortison, Prostaglandin E2 und atriales natriuretisches Hormon werden mit der reduzierten Bildung des Lungenwassers zum Zeitpunkt der Geburt in Verbindung gebracht (Kotecha, 2000).

Einen weiteren wichtigen Faktor in Hinblick auf die fetale Lungenentwicklung stellen die fetalen Lungenbewegungen dar. Beim Menschen können erste Atembewegungen um die elfte SSW beobachtet werden. Ab der 30. SSW treten Atembewegungen ungefähr zu einem Drittel der Zeit auf. In verschiedenen Tierexperimenten konnte durch Ausschalten des Phrenikusnerves eine Lungenhypoplasie verursacht werden. Zu den steigenden Faktoren der Lungenbewegungen des Feten werden unter anderem erhöhte Glukosespiegel, Azidose oder Koffein sowie Theophyllin gezählt. Eine Abnahme der Bewegungen wird durch Rauchen, Alkohol oder Drogenabusus bewirkt. Auch Hypoglykämie, Hypoxie sowie intrauterine Infektionen zeigen negative Auswirkungen in Bezug auf die fetalen Atembewegungen (Joshi & Kotecha, 2007).

Die fetale Tracheaokklusion, die derzeit im Rahmen internationaler Studien bei Feten mit kongenitaler Zwerchfellhernie durchgeführt wird, nutzt die beschriebenen Effekte um das fetale Lungenwachstum zu verbessern. Studien an Schafen, Hasen, Ratten und Mäusen haben gezeigt, dass die Okklusion der Trachea während der kanalikulären und sakkulären Phase nicht nur das Trockengewicht der Lunge verbessert, sondern auch eine vermehrte Verzweigung des Bronchialbaumes, gesteigerte Alveolisierung und Zunahme der alveolären Oberfläche sowie Steigerung von Typ-2 Pneumozyten und Lungengefäßwachstum bewirkt (Khan et al., 2007).

2.4.2 Hormone, Transkriptions- und Wachstumsfaktoren

In den letzten Jahren wurde das komplexe Zusammenspiel verschiedener Hormone, Transkriptions- und Wachstumsfaktoren im Rahmen der

Lungenentwicklung zunehmend untersucht (Joshi & Kotecha, 2007). Die Lungenentwicklung unterliegt einer komplexen Kaskade von Vorgängen, die durch gewebs- und zellspezifische Faktoren reguliert werden um Proliferation und Differenzierung von Zellen zu bewirken. Den Insulin-like growth factors (IGF-1 und -2) wird eine wesentliche Rolle bei diesen Prozessen zugeschrieben. Die IGFs entfalten ihre Wirkung vor allem durch Interaktion mit dem Typ-1 IGF Rezeptor (Moats-Staats et al., 1994). Silva et al. konnten zeigen, dass ein Mangel an IGF-2 zu einer verzögerten Lungenreife bei Mäusen führte (Silva et al., 2006). Auch Schilddrüsenhormone spielen eine wichtige Rolle in der Differenzierung von epithelialen und mesenchymalen Zellen sowie der Verzweigung der Luftwege in frühen Stadien der Lungenentwicklung. Sie haben zu einem späteren Zeitpunkt Einfluss auf die Differenzierung von Typ-2 Zellen und Surfactantsekretion. Hypophysenhormone und Hormone der Nebenniere werden mit Lungenreife in Verbindung gebracht. FGFs und Shh beeinflussen die Verzweigungsmuster der Luftwege. In der späteren Lungenentwicklung bewirkt FGF die Differenzierung von Typ-2 Zellen und Sekretion von Surfactant Protein C. Bei der Angiogenese und Vaskulogenese spielt VEGF eine zentrale Rolle. VEGF hat überdies auch positiven Effekt auf die Differenzierung von Typ-2 Zellen (Joshi & Kotecha, 2007).

2.4.3 Umweltfaktoren

Der Einfluss von Umweltfaktoren, wie beispielsweise die Exposition der wachsenden Lunge mit Nikotin (intrauterin und postnatal) ist mit einem ungünstigen respiratorischen Outcome assoziiert. Die genauen Mechanismen, die zu vermindertem Lungenvolumen, reduzierter Anzahl an Alveolen, vergrößerten Alveolen oder abnormer Bildung von Septen und somit einer reduzierten Gasaustauschfläche führen, sind nicht vollständig geklärt. In den letzten Jahren hat auch das Interesse an weiteren Schadstoffen, wie Ozon oder kleinen Partikeln zugenommen (Joshi & Kotecha, 2007).

2.5 Lungenerkrankungen

2.5.1 Angeborene Zwerchfellhernie und Lungenhypoplasie

Die angeborene Zwerchfellhernie kommt mit einer Häufigkeit von einem Fall pro 3000 Lebendgeburten vor. Trotz intensiver Studien und moderner prä- und postnataler Interventionen, betragen die durchschnittlichen Überlebensraten nur rund 70% (Kinane, 2007). Die hohe Mortalität kommt auf Grund der häufig schweren Lungenhypoplasie zustande, die mit der angeborenen Zwerchfellhernie assoziiert ist (Ruttenstock et al., 2009). Ein weiterer Grund für die hohe Morbidität und Mortalität bei angeborener Zwerchfellhernie ist ein persistierender pulmonaler Hypertonus (Nagata et al., 2007). Störungen der Lungenentwicklung in der pseudoglandulären Phase, die pleuro-peritoneale Membran betreffend, kann zum Ausbilden einer Zwerchfellhernie führen (Joshi & Kotecha, 2007).

2.5.2 Hypoplasie der Lunge

Unter Lungenhypoplasie versteht man die unzureichende Entwicklung der Lunge die meist in einer respiratorischen Insuffizienz mündet. Die mangelnde Entwicklung der Lunge ist durch einen reduzierten Anteil von Lungenzellen, Luftwegen und Alveolen bedingt, die zu einer reduzierten Größe und verringertem Lungengewicht führt. Die Lungenhypoplasie kann primär oder sekundär, unilateral oder bilateral auftreten. Die Hypoplasie der Lunge tritt am häufigsten sekundär auf. Angeborene Anomalien sowie Schwangerschaftskomplikationen, die die Lungenentwicklung verhindern zählen zu den Auslösern (Biard et al., 2010).

Eine Beeinträchtigung der Lungenentwicklung während der pseudoglandulären Phase führt zu einer Reduktion der Aufzweigung von Bronchiolen sowie reduzierter Knorpelentwicklung. Die Komplexität der azinären Strukturen und deren Reifung können ebenso betroffen sein. Auch eine verzögerte Vaskularisation und verspätete Ausbildung der Blut-Luft-Schranke kann bei Störungen der Lungenentwicklung in der pseudoglandulären Phase auftreten. Störungen in der Lungenentwicklung ab der 17. Schwangerschaftswoche äußern sich durch negative Auswirkungen auf die Reifung und Komplexität der Azini (Biard et al., 2010).

2.5.2.1 Epidemiologie

Die Lungenhypoplasie tritt mit einer Inzidenz von 9 – 11 pro 10000 Lebendgeburten auf. Betrachtet man alle Geburten liegt diese bei 14 pro 10000. Diese Zahlen entsprechen einer schätzungsweisen Annäherung, weil milde Formen der Lungenhypoplasie in der neonatalen Phase überlebt werden (Biard et al., 2010).

2.5.2.2 Ursachen und Pathogenese

Die Pathogenese der Lungenhypoplasie ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch sind für eine unauffällige intrauterine Lungenentwicklung eine regelrecht geformte Brusthöhle, regelmäßige Atembewegungen des Feten, ausreichend intrapulmonale Flüssigkeit mit positivem Druck und normale Fruchtwasservolumina erforderlich (Porter, 1999). Die primäre Lungenhypoplasie im Sinne einer angeborenen Störung, also ohne Assoziation mit anderen kongenitalen Anomalien ist selten und tritt mit einer Häufigkeit von 0,8 – 1,6 pro 10000 Geburten auf. Die meisten Fälle der Lungenhypoplasie treten hingegen sekundär auf. Bedingt ist die sekundäre Lungenhypoplasie durch angeborene Anomalien und Komplikationen in der Schwangerschaft, die die Lungenentwicklung verhindern (Thurlbeck & Chung, 2005).

Dazu zählen:

- Mangelnder intrathorakaler Platz: bei angeborener Zwerchfellhernie, intrathorakalen Raumforderungen (z.B. Zyste, thorakales Neuroblastom)
- Oligohydramnion: von renalem (Nierenagenesie, oder -dysplasie) oder nichtrenalem Ursprung (vorzeitigem Blasensprung)
- Hydrops fetalis
- Anomalien am Skelettsystem: Osteogenesis imperfecta
- Anomalien des ZNS: Anenzephalus, Arnold-Chiari Malformation
- Bauchwanddefekt: Omphalozele, Gastroschisis
- Syndromassoziiert: beispielsweise bei Trisomie 13, 18 & 21 (Thurlbeck & Chung, 2005)

2.5.2.3 Komplikationen

Nach der Geburt kann sich eine Lungenhypoplasie je nach Schweregrad klinisch als respiratorische Insuffizienz bis hin zum völligen Atemversagen manifestieren, oder auch mild verlaufen. Eine respiratorische Insuffizienz ist häufig mit einem pulmonalen Hypertonus assoziiert und kann mit persistierendem fetalen Kreislauf, pulmonaler Hämorrhagie, bronchopulmonaler Dysplasie oder subakuten Lungenerkrankungen einhergehen (Biard et al., 2010).

2.5.3 Chronische Lungenerkrankung bei Frühgeburtlichkeit

Im Gegensatz zu Säuglingen, die termingerecht geboren werden, befinden sich die Lungen frühgeborener Kinder noch in unreifen Entwicklungsstadien. Die Lungenunreife, die meist mit einem Surfactantmangel einhergeht, macht häufig eine prolongierte mechanische Ventilation nötig, was in weiterer Folge in chronischen Lungenerkrankungen resultieren kann. Hyperoxie und Barotrauma können Lungenschäden und Entzündungen bewirken, die zu einer verminderten Ausbildung von Alveolen führen können. Eine Hyperoxie führt zu schweren Schäden an den Septen und verursacht einen vergrößerten Durchmesser terminaler Alveolarsäcke und verminderter Gasaustauschfläche (Kotecha, 2000).

3 Das IGF-System

Die IGFs wurden erstmals von Salmon und Daughaday beschrieben. Im Rahmen eines Experiments, in dem Mediatoren für die Aktivität von Wachstumsfaktoren untersucht wurden fand man diese Proteine (Salmon & Daughaday, 1957), die Somatomedin A und Somatomedin C genannt wurden. Heute werden sie als IGF-1 und IGF-2 bezeichnet (Maki, 2010).

Die IGFs stellen Polypeptide mit einer Strukturhomologie zu Insulin dar. Auch das Spektrum ihrer biologischen Funktionen ist dem Insulin sehr ähnlich (O'Dell & Day, 1998). IGFs spielen eine wesentliche Rolle im Wachstum und der Differenzierung von Geweben (Wallen et al., 1997). Sie übernehmen eine Schlüsselrolle im präadoleszenten Wachstum und üben wachstumsfördernde Wirkung als autokrine Regulatoren der Zellproliferation aus. Die Hauptquelle der in den Kreislauf abgegebenen IGFs stellt die Leber dar (O'Dell & Day, 1998).

Die im Blut präsenten IGFs sind an Transportproteine, *IGF binding proteins* (IGFBP), gebunden (Lallemand et al., 1995). Die sechs IGFBPs modulieren die Wirkung und Verfügbarkeit der IGFs gegenüber deren Rezeptoren (Moats-Staats et al., 1994). So können diese die Wirkung der IGFs entweder steigern oder auch inhibieren, abhängig von der Natur des IGFBP (Stiles & D'Ercole, 1990).

Die Wirkung der IGFs wird über drei verschiedene Rezeptoren - dem Typ-1 Rezeptor (IGF-1R), Typ-2 Rezeptor (IGF-2R) und Insulinrezeptor (IR) – vermittelt. Der IR und IGF-1R sind ähnliche Rezeptoren und sind für Insulin, IGF-1 und IGF-2 zugänglich. Der IGF-2R stellt einen Mannose-6-Phosphat Rezeptor dar und kann Insulin nicht, IGF-1 nur schwach binden (Silva et al., 2006).

Die IGFs, deren IGFBPs und Rezeptoren ergeben zusammen das IGF-System (Moats-Staats et al., 1994).

3.1 IGF-2

3.1.1 Genlokalisierung und IGF-2 Gen

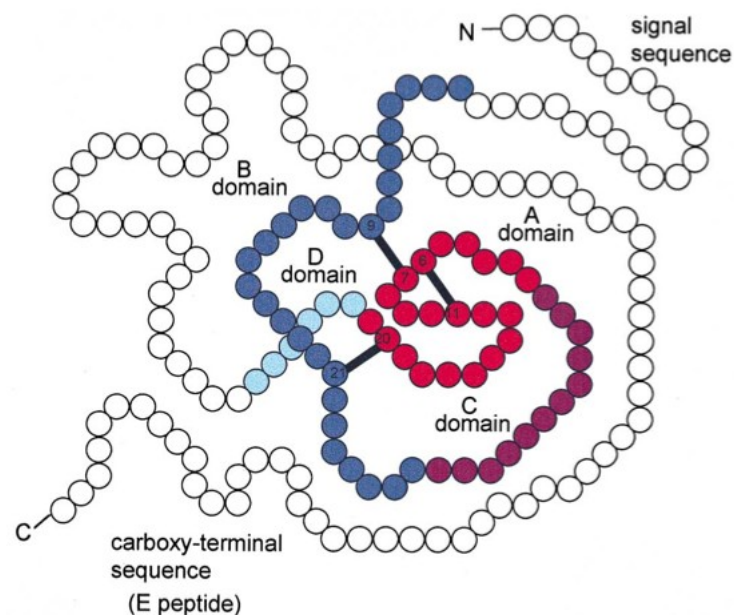
Das 30kbp große IGF-2 Gen befindet sich auf Chromosom 11. Es besteht aus neun Exons, wobei die Exons 1-6 nichtkodierend agieren, hingegen Exons 7-9 für

die Kodierung des Präpro-IGF-2 Proteins zuständig sind. Weiters beinhaltet das Gen vier Promotoren (O'Dell & Day, 1998).

3.1.2 Die Struktur des IGF-2 Proteins

Das Präpro-IGF-2 besteht aus 180 Aminosäuren und besitzt eine Masse von 20,1kDa. Es enthält ein aus 89 Aminosäuren bestehendes Carboxy-terminales Peptid (E-Kette) und ein aus 24 Aminosäuren gebildetes Signal-Peptid (N), welche sich nach Translation spalten und ein monomeres Plasmaprotein, das IGF-2 Protein, produzieren. IGF-2 selbst kann, dem Proinsulin ähnlich, in mehrere Ketten unterteilt werden (Abb. 7). Neben einer A- und B-Kette besitzt das IGF2-Protein noch eine C-Domäne, die hingegen beim Insulin im Rahmen des Reifungsprozesses proteolytisch abgespalten wird. Weiters besitzt das IGF-2 eine D-Kette, die beim Insulin gar nicht vorkommt. Der Insulinrezeptor und der IGF-1 Rezeptor erkennen jeweils die gleiche Region am IGF-Protein. Es handelt sich dabei um die Residuen Phe B26 und Tyr27. Der IGF-2R hingegen erkennt einige Residuen der A-Kette des Proteins (O'Dell & Day, 1998).

Das IGF-2 Protein besteht aus 67 Aminosäuren und entspricht zu 47% der Anordnung der Aminosäuren von Insulin. Auf Grund der Erhaltung von drei Disulfidbrücken und Resten im hydrophoben Core, besitzt es eine ähnliche 3D-Struktur (O'Dell & Day, 1998).



(Quelle: O'Dell & Day, 1998)

Abbildung 7: Schematische Darstellung des IGF-2 Protein (O'Dell & Day, 1998).

3.1.3 Synthese und biologische Wirkung

Die Leber stellt die Hauptquelle der in die Zirkulation abgegebenen Plasma-IGFs dar. Die IGFs sind in den meisten Geweben nachweisbar und üben sowohl organspezifische, wie auch systemische Wirkung aus. IGF-2 scheint durch plazentares Laktogen induziert zu werden. Bereits *in utero* sind hohe Konzentrationen von IGF-2 Peptiden und mRNA nachweisbar, was auf eine wesentliche Rolle in der fetalen Entwicklung schließen lässt (O'Dell & Day, 1998). Transkripte von IGF- konnten bereits am 18. Tag der Schwangerschaft in fetalem Gewebe gezeigt werden. Im frühen zweiten Trimester konnte das Peptid in Serum und Gewebe des Feten nachgewiesen werden, was bestätigt, dass zu diesem Zeitpunkt der Schwangerschaft eine Translation stattfindet (Stiles & D'Ercole, 1990).

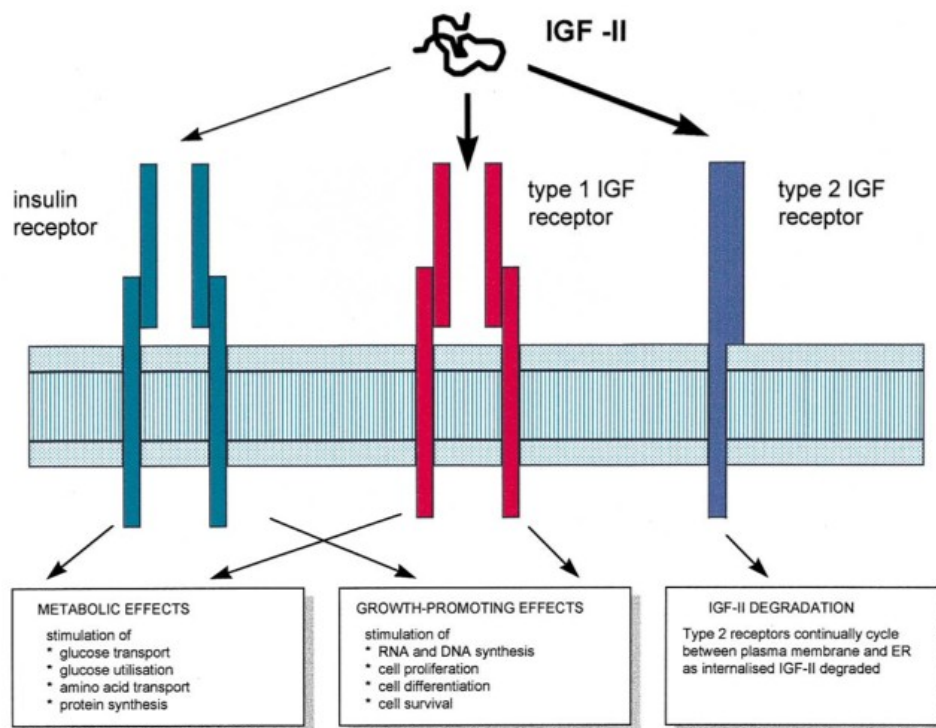
IGF-2 übt seine Wirkung über den Insulinrezeptor und - mit wesentlich höherer Affinität - über die IGF-Rezeptoren von Typ-1 und -2 aus. Vorwiegend werden darüber metabolische und wachstumsfördernde Effekte vermittelt (O'Dell & Day, 1998).

3.1.4 Die Bedeutung von IGF-2 in der fetalen Lungenentwicklung:

Das IGF-System scheint eine zentrale Rolle sowohl in der Entwicklung als auch in der Differenzierung der Lunge zu spielen. IGF-1 und -2 sowie deren Rezeptoren und *BPs* werden in der fetalen Lunge von Menschen, Nagern und anderen Spezies exprimiert. IGF-2 wird vor allem in Epithelzellen der Lunge exprimiert, hauptsächlich in den leitenden Luftwegen. Ein Mangel an IGF-2 scheint jedenfalls zu Störungen der Lungenentwicklung zu führen. So zeigte eine Studie an IGF-2 *knockout* Feten eine verzögerte Reifung der Lunge an Tag 17,5 der Schwangerschaft, jener Zeit, zu welcher die Entwicklung von der frühen kanalikulären Phase in die Spätere stattfindet. Die IGF-defizienten Lungen wiesen anstelle definierter primärer azinärer Strukturen lediglich ein blasenfreies, pseudoglanduläres Aussehen und eine deutliche Abnahme der Luftwegebildung im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (Silva et al., 2006).

3.2 IGF-Rezeptoren

Obwohl es bis zu einem gewissen Grad zu einer kreuzweisen Interaktion zwischen den verschiedenen Liganden und deren Rezeptoren kommt, unterstützen aktuelle Erkenntnisse die Ansicht, dass die meisten Effekte beider Liganden - also IGF-1 und IGF-2 - in Bezug auf Wachstum und Differenzierung durch Bindung und Aktivierung des IGF-1R hervorgerufen werden (Roberts & Rosenfeld, 1999). Beide Rezeptoren konnten in embryonalem und fetalem Gewebe nachgewiesen werden und wiesen auch eine hohe Dichte in der Plazenta auf, was darauf schließen lässt, dass die parakrine Abgabe der IGF-Peptide das Wachstum und/oder die Funktion der Plazenta und der fetalen Entwicklung beeinflusst (O'Dell & Day, 1998).



(Quelle: O'Dell & Day, 1998)

Abbildung 8: IGF-2 und Rezeptoren (O'Dell & Day, 1998).

3.2.1 Typ-1 Rezeptor

Der IGF-1R ist strukturell dem IR sehr ähnlich und vermittelt vorwiegend metabolische und wachstumsfördernde Wirkung. Er bindet IGF-1 mit einer wesentlich höheren Affinität als IGF-2, obwohl viele biologische Effekte des IGF-2 über diesen Rezeptor mediiert werden (O'Dell et al., 1998).

Der IGF-1R entspricht einem Tetramer und zählt zu den Tyrosinkinase-Rezeptoren, bestehend aus zwei komplett extrazellulären, ligandbindenden α -Untereinheiten und zwei β -Untereinheiten, die eine Transmembrandomäne bilden. Weiters kann dem IGF-1R eine intrazelluläre Tyrosinkinaseeinheit, die der β -Untereinheit angehört, sowie eine terminale C-Domäne zugeordnet werden (Sehat et al., 2006). Die Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor löst spezifische Tyrosinkinaseaktivität und eine Kaskade an Proteinphosphorylierung aus, die zu einer Aktivierung intrazellulärer *Second messenger* führen kann (O'Dell & Day, 1998).

Während die IGFs selbst für das Überleben nicht notwendig sind, zeigte sich, dass die Signalwirkung von IGF-1R für die Lebensfähigkeit bei Mäusen entscheidend ist. IGF-1R defiziente Mäuse starben bei der Geburt und waren durchschnittlich um 55% kleiner als die anderen Nachkommen des Wurfs (Maki, 2010). In der fetalen Lunge zeigt sich eine ausgedehnte Expression des IGF-1R dessen Expression gegen Ende der Schwangerschaft, sowie im frühen postnatalen Leben zunimmt (Silva et al., 2006).

3.2.2 Typ-2 Rezeptor

Der IGF-2R entspricht einem Mannose-6-Phosphat Rezeptor, ein Polypeptid aus einer einzelnen Kette (Stiles & D'Ercole, 1990). Der 270kDa Rezeptor besteht aus einer extrazellulären Domäne, einer transmembranösen Kette bestehend aus 23 Aminosäuren und einer kleinen zytoplasmatischen Einheit (LeRoith, 2003). Dieser Rezeptor besitzt keine Tyrosinkinaseaktivität. Als Liganden am IGF-2R binden IGF-2 und IGF-1, nicht aber Insulin (Stiles & D'Ercole, 1990). Der IGF-2R ist am Transport lysosomaler Enzyme vom Golgi Apparat zu den Lysosomen, sowie an der Verbreitung und dem Abbau von IGF-2 beteiligt. Der Rezeptor ist auch im peripheren Kreislauf zu finden und kann dort einen signifikanten Anteil an IGF2 binden und somit als IGFBP fungieren. Dies kommt im Speziellen in der fetalen Zirkulation vor (O'Dell & Day, 1998).

Die Expression des IGF-2R ist hauptsächlich im Mesenchym und der mittleren Schicht der intrapulmonalen Blutgefäßen zu finden und nimmt gegen Ende der Schwangerschaft ab (Silva et al., 2006).

3.3 IGFbps (Insulin-like growth factor binding proteins)

Die IGFs sind im Plasma an Transportproteine, *IGFBPs* genannt, gebunden (Lallemand et al., 1995). Die Interaktion zwischen den IGFs und deren Rezeptoren wird durch diese IGFbps moduliert (Wallen et al., 1997). Es können sechs Bindungsproteine mit hoher Bindungsaffinität zu den IGFs beschrieben werden. Diese werden als IGFBP-1, -2, -3, -4, -5 und -6 bezeichnet (Hwa et al., 1990). Zu den vermuteten Aufgaben der IGFbps zählt einerseits die Bereitstellung von IGFs in der Zirkulation und in Gewebsflüssigkeiten, das Bewahren unbeschränkter IGF-Aktion sowie negative oder positive Modulation der IGF-Wirkung (Wallen et al., 1997).

3.3.1 Genlokalisierung und IGFBP-Genstruktur

Die Genstruktur der humanen IGFbps ist sehr ähnlich, während deren Größe deutlich differiert (siehe Tabelle 2).

	Genlokalisierung	Molekularmasse [kDa]
IGFBP-1	7p	25,3
IGFBP-2	2q	31,4
IGFBP-3	7p	28,7
IGFBP-4	17q	26
IGFBP-5	2q	28,6
IGFBP-6	12	22,8

(Quelle basierend auf Hwa et al., 1999)

Tabelle 2: Genlokalisierung und Molekularmasse [kDa] der IGFbps (Hwa et al., 1999)

Alle IGFbps werden durch vier Exons kodiert. Eine Ausnahme bildet das IGFBP-3, das ein weiteres untranslatiertes Exon 5 besitzt. Die unter den IGFbps korrespondierenden Exons sind sich in der Größe sehr ähnlich. Die Exons korrelieren weiters mit den drei Domänen der gebildeten Proteine. Exon 1 (ca. 600 bp) kodiert für die N-terminale Domäne, die untranslatierte 5'-Region sowie einige Aminosäuren der mittleren Region. Exon 2 (< 230bp) kodiert für die Mittelregion. Für die C-terminale Region des Proteins kodieren Exon 3 (ca. 230bp) sowie Exon 4, das sich variabler in seiner Größe präsentiert (Hwa et al., 1999).

3.3.2 IGFBP-Struktur

Die primäre Struktur der IGFBPs besteht aus drei unterschiedlichen Domänen mit annähernd gleicher Größe. Zu diesen zählen die N-terminale und die C-terminale Domäne sowie die in ihrer Größe sehr variable Mittelregion (Hwa et al., 1999).

3.3.2.1 N-terminale Domäne

Diese Domäne bildet ein Drittel der reifen Proteine und beinhaltet zwischen 80 und 93 Aminosäuren nach den Signalpeptiden. Die N-terminalen Domänen zeichnen sich durch ungefähr 58% Gleichartigkeit aus (Hwa et al., 1999).

3.3.2.2 Mittelregion

Die Mittelregion befindet sich zwischen der N- und C-terminalen Domäne und fungiert funktionell als Gelenk zwischen den beiden. Diese Domäne zeichnet sich bei den menschlichen IGFBPs durch eine Größenvariabilität zwischen 55 und 95 Aminosäuren aus. Die Sequenz der Aminosäuren in den einzelnen Segmenten ist durch eine Einzigartigkeit jedes Proteins geprägt und weist lediglich eine Ähnlichkeit von 15% zwischen den einzelnen IGFBPs auf. Im Gegensatz zu den beiden terminalen Domänen kann es in der Mittelregion zu Abänderungen kommen, die aber erst posttranslational auftreten. Zu den betroffenen Proteinen zählen IGFBP-1, -3 und -5, die durch Phosphorylierung modifiziert werden können. Zellen nutzen diesen Mechanismus um intrazelluläre Vorgänge zu regulieren (Hwa et al., 1999).

3.3.2.3 C-terminale Domäne

Wie auch die N-terminale Domäne weist die C-terminale Domäne bei den IGFBPs einen hohen Grad an Strukturkonservierung auf. Menschliche IGFBPs ähneln sich in Bezug auf diese Domäne bis zu 34% (Hwa et al., 1999).

3.3.3 Korrelation zwischen Struktur und Funktion

Die IGFBPs wurden nach ihrer Fähigkeit benannt, IGFs mit hoher Affinität zu binden. Die genaue Wechselwirkung ist aber noch nicht restlos geklärt. Offensichtlich können die IGFBPs aber auch mit weiteren Proteinen wie Insulin

oder anderen Komponenten von Zelloberflächen interagieren. Eine hohe Bindungsaffinität zu IGFs wurde der C-terminalen und N-terminalen Domäne zugeschrieben. *In vivo* Beobachtungen ergaben, dass IGFBPs in biologischen Flüssigkeiten in gespaltenem Zustand vorliegen können und dadurch mit geringerer Affinität zu IGFs binden. Die Bildung von IGFBP-Fragmenten *in vitro* konnten diese Angaben befürworten (Hwa et al., 1999). So konnte für IGFBP-4 gezeigt werden, dass ein durch Proteolyse entstandenes 16kDa schweres Fragment zwar an IGF-1 und -2 gebunden werden kann, dies jedoch mit einer 20-fach reduzierten Affinität (Cheung et al., 1994). Ähnliches konnte bei einem IGFBP-5 Fragment beobachtet werden (Andress & Birnbaum, 1992; Andress et al., 1993). Die Bestandteile der Fragmente setzten sich aus der N-terminalen Domäne und einem kleinem Abschnitt der mittleren Region zusammen (Hwa et al., 1999). Weitere *in vitro* Forschungen von Spencer und Chan ergaben, dass IGFBP-3 Fragmente, die jeweils eine Hälfte der N-terminalen Domäne und der C-terminalen Domäne enthielten, eine geringere Bindungsaffinität zu den IGFs aufwiesen (Spencer & Chan, 1995). Die C-terminale Domäne ist offenbar für die hochaffine Bindung der IGFs verantwortlich, allerdings existieren auch Daten, die deren nicht-bindende Eigenschaften beschreiben (Hwa et al., 1999). So kam es durch Austausch der C-terminalen Domäne zwischen IGFBP-2 und -3 zu keinem Affinitätsverlust von IGF-2. Das Auswechseln der Mittelregion der beiden BPs führte aber zu einer Reduktion der Bindungsaffinität um 37%, darauf hindeutend, dass die Mittelregion bindungssteigernde Wirkung aufweist (Hashimoto et al., 1997).

3.3.4 Biologische Funktion der IGFBPs

3.3.4.1 IGF-abhängige Aktivität der IGFBPs

IGF-abhängige Aktivitäten umfassen jene Funktionen der IGFBPs, die direkt mit der Bioaktivität von IGFs in Verbindung stehen, da sie die IGFs binden können und somit die Interaktion zwischen IGFs und deren Rezeptoren beeinflussen. Die Bindung von IGF an die IGFBPs bewirkt eine reduzierte Wechselwirkung zwischen Ligand und Rezeptor, was anhand eines mutierten IGFBP-4 demonstriert werden konnte, welches normalerweise die mitogenen Eigenschaften der IGFs auf das

Knochenzellwachstum blockiert. Das mutierte IGFBP-4 wies eine geringere Bindungsaffinität zu IGF-2 auf, wodurch die proliferierende Wirkung des IGF-2 nicht blockiert werden konnte. Die Abgabe der IGFs erfolgt durch eine Reduktion der Bindungsaffinität von IGFFBPs, die dadurch zustande kommt, dass es zur Proteolyse der *binding proteins* kommt. Als weiterer Mechanismus der IGF-Abgabe wird die Konformationsänderung der IGFFBPs angenommen, die dadurch auftritt, dass diese an die Oberfläche von Zellen oder an die Extrazellulärmembran binden (Hwa et al., 1999).

3.3.4.2 IGF-unabhängige Aktivität der IGFFBPs

IGF-unabhängige Aktivität der IGFFBPs wird als jene biologische Aktivität definiert, die ohne Bindung, Aktivierung oder Hemmung von IGFs verläuft. Dies wurde für IGFBP-3 und -5, seltener auch für IGFBP-1 beschrieben, wobei IGFBP-3 und -5 in den Nukleus verlagert werden und dort wirken. Vermutlich werden diese Funktionen über die C-terminale Domäne und wahrscheinlich die Mittelregion der IGFFBPs vermittelt. So konnte gezeigt werden, dass IGFBP-3 durch das Binden an Zelloberflächenmoleküle eine Wachstumshemmung von Brustkrebszellen hervorruft. Für IGFBP-5 wurde ein 420kDa Protein, das vermutlich als Membranrezeptor fungiert, beschrieben, das nach Binden der C-terminalen Domäne phosphoryliert wird (Hwa et al., 1999).

4 Material und Methoden

Die vorangehenden Tierversuche wurden an der *University of Buenos Aires (UBA)* durchgeführt. Die isolierte DNA der gewonnenen Rattenlungen und die in Paraffin eingebetteten Lungen wurden für die vorliegende Studie zur Verfügung gestellt. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der *UBA* genehmigt. Die Zucht der Tiere, die Behandlung, Gewinnung der Proben, bis hin zur Isolierung der DNA sowie die Einbettung der Rattenlungen in Paraffin wurden in Buenos Aires vorgenommen. Die Bearbeitung und Auswertung der Proben wurde an der Universitätsklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe sowie am Zentrum für Medizinische Forschung der Medizinischen Universität Graz vorgenommen.

4.1 Ratten

Wistar Ratten waren im *Animal House der Biology School der UBA* untergebracht. Die weiblichen Ratten wiesen ein Alter von 2 bis 3 Monaten auf und wurden mit männlichen Tieren im Alter von 3 bis 4 Monaten verpaart. Der Konzeptionszeitpunkt wurde anhand des vaginalen Nachweises von Spermatozyten ermittelt und als Tag 0 bezeichnet. Die trächtigen Tiere wurden laparotomiert und die Feten mittels intraperitonealer Injektion (BD Precision Glide 30G x 1/2, Brasilien) von IGF-2 an Tag 19, 20 und 21 der Schwangerschaft behandelt. Den Feten eines Uterushorns wurden 0.0002µg bzw. 0.2µg rekombinantes humanes IGF-2 (Gentaur, Brüssel) verabreicht, während die Feten des anderen Horns ein Placebo (physiologische Kochsalzlösung) erhielten. Die Menge der applizierten Flüssigkeit betrug jeweils 50µl. Für diesen Eingriff wurden die Ratten mit CO₂ und Ether narkotisiert, unter sterilen Bedingungen laparotomiert und die Injektionen unter Sicht durchgeführt. Abschließend wurde die Bauchdecke mittels Einzelknopfnähten genäht. Drei Stunden nach der letzten Injektion (Tag 21) wurden die Feten *per sectionem* entbunden und gewogen. Die Lungen wurden entnommen, gewogen und zur weiteren Verarbeitung geteilt, sodass jeweils eine Seite für die spätere RNA-Extraktion gefroren und die andere formalinfixiert und in einem Paraffinblock konserviert wurde. Zur RNA-Isolierung wurden die Gewebestücke homogenisiert und mit 1ml TriReagent (MRC, Cincinnati, OH) nach den Angaben des Herstellers behandelt.

Die Gewebestücke wurden nach HOPE®-Technik konserviert. Dafür wurden die Lungen zunächst in HOPE®-1 Lösung (DCS Innovative Diagnostik-System, Deutschland) für 48 Stunden bei 4 °C inkubiert und anschließend in mit Aceton verdünnter HOPE®-2 Lösung (DCS Innovative Diagnostik-System, Deutschland) für 2 Stunden bei Raumtemperatur gelagert. Danach erfolgte dreimaliges Spülen mittels eisgekühlten Acetons. Im Anschluss erfolgte die Einbettung in Paraffin nach weiterem Protokoll des Herstellers.

4.1.1 IGF-2 Administration

Im vorliegenden Tierversuch wurde die IGF-2 Administration durch intraperitoneale Injektion an den Rattenfeten vorgenommen.

Die intraperitoneale Gabe von Stoffen stellt jene Applikationsform bei Ratten dar, die die größte Menge an zu infundierender Flüssigkeitsmenge erlaubt. So kann bei intraperitonealer Applikation eine Menge von bis zu 20ml/kg KG verabreicht werden (<http://www.gv-solas.de/auss/tie/index.html>).

Die intraperitoneale Applikation von Substanzen stellt bei der Ratte ein Verfahren dar, das sich durch mäßige Belastung für das Versuchstier im Vergleich zu anderen Methoden auszeichnet und einen raschen Wirkungseintritt bietet (www99.mhhannover.de/institute/tierlabor/vorlesungen/appl_II.pdf).

Medikamente, die intraperitoneal verabreicht werden, können die Bauchhöhle über drei mögliche Wege verlassen:

- 1) Diffusion des Stoffes über die Oberfläche des Peritoneums,
- 2) durch Absorption der Substanz durch das lymphatische System, oder
- 3) durch Aufnahme der Wirksubstanz in die Vena portae (Dorr & Von Hoff, 1994).

Über die Zirkulation wird das IGF-2 auch zur Lunge transportiert. Hier kann es an Rezeptoren der Blutgefäße in den Alveolen binden. Unklar ist aber, ob das IGF-2 dort die Sekretion endokriner Faktoren mediiert, die wiederum das Lungenepithel beeinflussen, oder ob IGF-2 als pro-angiogener Wachstumsfaktor die Proliferation und Angiogenese der Lungenkapillaren anregt, was wiederum durch die bessere Versorgung das Lungenwachstum stimulieren könnte.

4.2 Untersuchte Marker

Um den Effekt von IGF-2 beurteilen zu können wurden folgende Marker mittels real time-PCR und Immunhistochemie untersucht:

4.2.1 Ki-67

Ki-67 stellt einen exzellenten Parameter dar um Proliferation beurteilen zu können (Muskhelishvili et al., 2003). Ki-67 ist ein nukleäres Antigen, das nur in den proliferativen Phasen des Zellzyklus nachweisbar ist, also in der G1-, S-, G2- und M-Phase. In ruhenden Zellen, also in Phase 0, fehlt es (Gerders et al., 1984).

Während der Interphase kann das Antigen ausschließlich im Nukleus auffindig gemacht werden (Scholzen & Gerders, 2000). Verheijen et al. haben durch Elektronenmikroskopie gezeigt, dass sich das Ki-67 Antigen während der Interphase vorwiegend im nukleären Kortex und in den dichten fibrillären Komponenten aufhält (Verheijen et al., 1989a). Während der Mitose ist das Protein meist wieder an der Oberfläche von Chromosomen zu finden (Scholzen & Gerders , 2000). Zum Zeitpunkt der Metaphase scheint Ki-67 in retikulären Strukturen, die die Chromosomen umgeben, verteilt zu sein (Verheijen et al., 1989b).

4.2.2 VEGF (*vascular endothelial growth factor*)

VEGF stellt ein starkes Mitogen endothelialer Zellen dar. Es fördert Chemotaxis bei endothelialen Zellen und die Permeabilität von Kapillaren. Diese Eigenschaften tragen zu physiologischer aber auch pathologischer Angiogenese bei (Brown et al., 2001). Die biologische Wirkung von VEGF wird durch Bindung an zwei Tyrosinkinaserzeptoren, VEGFR-1 und -2 mediiert (Ferrara et al., 2003). Viele physiologische Effekte von VEGF betreffen speziell die Lunge, die eines der Organe mit der höchsten VEGF-Expression darstellt. VEGF wird vor allem vom Alveolarepithel gebildet und bewirkt in den endothelialen Zellen der Lungenkapillaren die Produktion von NO und die Synthese von Prostazyklin, was sich hoch relevant auf die Funktion sowie vaskulären Eigenschaften der Lunge auswirkt. Der angiogenesefördernde Effekt von VEGF beruht auf der Aktivierung der NO-Synthase in endothelialen Zellen. Auch viele nichtendotheliale Zellen können einen VEGFR exprimieren, VEGF binden und dadurch Zellwachstum und

Zellüberleben triggern. Beispielsweise zeigen Pneumozyten von Typ-2, die den VEGFR-2 exprimieren, in der Anwesenheit von VEGF Wachstum und Differenzierung (Voelkel et al., 2006). Die Expression von VEGF und dem VEGFR-2 konnte in den sich verzweigenden tubulären Luftwegen und in vaskulären mesenchymalen Zellen während der fetalen Entwicklung gezeigt werden (Gebb & Shannon, 2000). Isolierte mesenchymale Elemente zeigen überdies eine Regression und einen Mangel an Wachstum, die mit dem Kollabieren der sich aufzweigenden pulmonalen Arterien einhergeht (Waltenberger et al., 1994). Ein koordinierter Aufbau des Epithels der Luftwege erfordert aber einen VEGF Gradienten, der an den Spitzen der wachsenden tubulären Strukturen der Luftwege produziert wird (Healy et al., 2000). Der Level des pulmonal produzierten VEGF ist aber von entscheidender Wichtigkeit. So führt eine Überexpression von VEGF in der Lunge, im Speziellen in den peripheren Epithelzellen, zur Dymorphogenese und eine Abnahme des VEGF in der Lunge zu mangelnder Formation von Septen und einem emphysematösen Muster (Voelkel et al., 2006). Die Gefäßentwicklung in der sich noch entwickelnden jungen Lunge bestimmt die Reifung der Lungenstruktur. Eine störungsfreie Angiogenese sowie Vaskulogenese ist wichtig für einen einwandfreien Aufbau des Organs (Healy et al., 2000). So führt die Hemmung des VEGF-Rezeptors zur Inhibition von Angiogenese und Alveolarisation (Jakkula et al., 2000). Störungen in der Signalwirkung von VEGF führen während der fetalen und perinatalen Lungenentwicklung zu respiratorischem Distress und bronchopulmonaler Dysplasie (Bhatt et al., 2001).

4.2.3 BMP-4 (*bone morphogenetic protein 4*)

BMP-4 zählt zu den Schlüsselmediatoren während der Lungenentwicklung und entfaltet seine Wirkung über spezielle Rezeptoren (Minoo, 2000. Liu et al., 1995). Es handelt sich dabei um zwei Typen von transmembranen Serin/Tyrosin Kinasen, auch Rezeptor I und II genannt (Liu et al., 1995). BMP-4 spielt in jener Phase der Lungenentwicklung eine maßgebliche Rolle, in der es zur Entwicklung und Differenzierung von hoch spezialisierten Zelltypen entlang der proximo-distalen Achse kommt, die zur Ausbildung des Parenchyms führen. Transkriptionsfaktoren, wie BMP-4, zählen zu den entscheidenden Komponenten bei epithelial-mesenchymalen Interaktionen. Unter diesen Interaktionen versteht man den

Austausch von Entwicklungssignalen, zwischen dem epithelialen und mesenchymalen Kompartiment, die die Information der Position auf dem Level von individuellen Zellen festlegen. BMP-4 zählt zu jenen Signalmolekülen, die eine etablierte Rolle im Lungenepithel spielen. Aber auch im Mesenchym ist BMP-4 in der späten embryonalen Phase der Lungenentwicklung zu finden (Minoo, 2000). In einer Studie von Weaver et al. wurde an Mäusen die Wirkung von BMP-4 auf die fetale Lungenentwicklung untersucht und eine zentrale Rolle in der proximo-distalen Differenzierung des respiratorischen Epithels nachgewiesen. Dabei wurde die Signalwirkung von BMP-4, das in den Epithelzellen an den Spitzen der wachsenden Lungenknospen exprimiert wird, inhibiert. Dies führte bei den Lungen zu einer starken Reduktion von distalen epithelialen Zelltypen und gleichzeitig zu einer Zunahme von Zellen vom proximalen Typ. Im Gegensatz dazu, behielten - beziehungsweise nahmen - entodermale Zellen in der Peripherie der Lunge, die einer großen Menge an BMP-4 ausgesetzt waren, distalen Zellcharakter an (Weaver et al., 1999).

4.2.4 tPA (*tissue plasminogen activator*)

tPA ist ein Protein endothelialer Zellen, welches nur in bestimmten Abschnitten des vaskulären Systems exprimiert wird (Collen, 1980). So wurde eine tPA-Expression ausschließlich in kleinen Arterien und Arteriolen gefunden, während es in Kapillaren, Venen und großen Pulmonalarterien fehlt (Levin et al., 1998). In einer weiteren Studie von Levin et al. wurde tPA bereits beim 13 Tage alten Rattenfetus in großen Arterien von sowohl Thorax-, als auch Schädelhöhle beobachtet. Zu diesem Zeitpunkt konnte die Expression von tPA im Endothel der dorsalen Aorta sowie in der A. subclavia und auch der A. vertebralis nachgewiesen werden. Weiter cranialwärts konnte die Expression von tPA über die gesamte Länge der A. carotica interna und den mittleren cerebralen Arterien beobachtet werden. Um Tag 15 der fetalen Entwicklung konnte in der Aorta kein Nachweis von tPA mehr gezeigt werden, hingegen aber durchgehend in Pulmonalarterien sowie der A. subclavia, A. vertebralis und A. basilaris. Beim 17 Tage alten Fetus war die Expression von tPA in der A. subclavia und auch der proximalen A. vertebralis verschwunden, jedoch zeigten kleinere arterielle Verzweigungen dieser beiden großen Gefäße eine Expression von tPA. Um Tag 20 der fetalen Entwicklung der Ratten konnte tPA in dem Epithel größerer

Pulmonalarterien nicht mehr gefunden werden, jedoch zeigte sich die Expression von tPA in jenen Gefäßen, die sich in das Lungengewebe hinein verzweigen und ein weiteres Beispiel für die Stimulation der Lungenverzweigung darstellen. Zu diesem Zeitpunkt zeigen Pulmonalarterien, die sich um Bronchien und Bronchiolen anordnen eine Expression von tPA. Postpartal wird tPA hauptsächlich in Arterien des pulmonalen Systems und des zentralen Nervensystem (ZNS) gefunden (Levin et al., 2000).

4.2.5 FGF-10 (*fibroblast growth factor-10*)

Die *fibroblast growth factors* (FGFs) spielen ebenfalls eine wichtige Rolle in der Lungenentwicklung (Joshi & Kotecha, 2007). Die Signalwirkung von FGFs spielt eine Rolle bei den epithelial-mesenchymalen Interaktionen während der Lungenentwicklung. Sechs FGFs werden in der Lunge exprimiert, jedoch zeigt davon nur FGF-10 einen essentiellen Einfluss auf die Formation der Lunge (Warburton et al., 2005). Die im Mesenchym produzierten FGFs entfalten ihre Wirkung über verwandte Rezeptoren, die an epithelialen Zellen zu finden sind. Im Lungenmesenchym zählt FGF-10 zu den entscheidenden Mediatoren der Morphogenese von Verzweigungen, die wiederum wichtig für die Lungenentwicklung ist und für die Differenzierung hochspezialisierter Zelltypen entlang der proximo-distalen Achse erforderlich sind. Während der Lungenentwicklung sind Interaktionen zwischen Zellen, im Speziellen zwischen dem epithelialen und mesenchymalen Kompartiment für die normale Morphogenese entscheidend. Die schwerwiegendste Störung der Lungenentwicklung und Differenzierung entlang der proximo-distalen Achse ist in FGF-10 *-/-* Embryonen zu beobachten. Die proximale Morphogenese der Lunge ist nicht von FGF-10 abhängig, jedoch ist die Distale streng von diesem Wachstumsfaktor abhängig. Eine gezielte Zerstörung von FGF-10 resultiert in einem Mangel an Lungenstrukturen, die sich distal der Hauptstammbronchien befinden (Minoo, 2000). Benjamin et al. haben den Einfluss von FGF-10 auf die Lungenentwicklung untersucht und dabei festgestellt, dass dieser Wachstumsfaktor auch in der sakkulären Phase der Lungentwicklung mitwirkt. Die Untersuchung von Lungen verstorbender Kinder, die eine bronchopulmonale Dysplasie aufwiesen, zeigten einen Mangel an FGF-10 Expression (Benjamin et al., 2007).

4.3 Real time-PCR

4.3.1 Quantifizierung der RNA-Proben

Die bei -20°C tiefgefrorenen RNA-Proben wurden aufgetaut und nach der jeweiligen Entnahme der erforderlichen Probenmenge wieder tiefgekühlt.

Die Messung der RNA-Konzentration der vorliegenden Proben wurde mittels photometrischer Analyse am Biophotometer plus (Eppendorf) durchgeführt.

4.3.2 cDNA-Synthese

Die cDNA wurde durch Verwendung von SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies) nach den Richtlinien des Herstellers synthetisiert. Ein µg der RNA, 200ng Random Primer (Fermentas GmbH) und ein µl dNTPs (jeweils 10mM, Fermentas GmbH) wurde mit 10µg Reinstwasser gemischt und für 5 Minuten bei 65 Grad Celsius erhitzt und anschließend auf Eis gelagert. Danach wurde 5X First-Strand Buffer (Life Technologies), 0,1M DTT (Life Technologies) sowie RNaseOUT (Life Technologies) hinzugefügt und vorsichtig gemischt. Nach 2 Minuten Inkubation bei 25 Grad Celsius wurde ein µl Superscript II beigemischt. Im Anschluss wurden die Proben für weitere 10 Minuten bei 25 Grad Celsius erwärmt. Nach 50 Minuten bei 42 Grad Celsius folgte die Inkubation für 15 Minuten bei 70 Grad Celsius. Die Inkubationen erfolgten in einer PCR Maschine. Die 20µl der jeweiligen cDNA wurden mit 50µl Reinstwasser verdünnt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 Grad Celsius gelagert.

4.3.3 Real time-PCR

Für die real time-PCR wurde die cDNA (5µl) mit 6,25µl Reinstwasser, 12,5µl TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) und 1,25µl von dem jeweiligem TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems) vermischt (Bmp4: Rn00432087_m1, Fgf10: Rn00564115_m1, Mki67: Rn01451446_m1, Plat: Rn00565767_m1, Rpl30: Rn00161950_m1, Vegfa: Rn01511601_m1). Es wurde in Duplikaten gearbeitet. Für die NTC (Negativkontrolle) wurde statt cDNA mit Reinstwasser gearbeitet. Jeweils 20µl des Reaktionsansatzes wurden nach Pipettierschema in die 96-Well Reaction Plate (Roche, Mannheim) pipettiert, mit

Klebefolie versiegelt und nach kurzem Zentrifugieren (850rpm) im Thermocycler AB7900 amplifiziert.

4.3.4 Auswertung der Ergebnisse der RT-PCR

4.3.4.1 Ermitteln der Expression der verwendeten Marker

Die Ct-Werte wurden automatisch von der Software (SDS2.2) generiert. Die relative Genexpression wurde mit dem *housekeeping gene* L30 als Referenz mittels der Standard $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode ermittelt.

4.3.4.2 Statistische Auswertung und Erstellen der Graphiken

Die statistische Analyse wurde durch die Verwendung der ΔCt -Werte erstellt. Die ΔCt -Werte der verschiedenen Versuchsgruppe des jeweiligen Markers wurden in GraphPad Prism5 übernommen und mit one-way ANOVA getestet. Werte mit $p < 0.05$ wurden als signifikant angesehen. Unterschiede innerhalb der verschiedenen Gruppen wurden durch einen TUKEY *post hoc* Test ermittelt.

Zur graphischen Darstellung wurden die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werte (=fold change) in MS Excel ermittelt und in GraphPad Prism5 verwendet. Der Mittelwert (*mean=MN*) des *fold change* innerhalb der jeweiligen Versuchsgruppe wurde als Balken mit Standardmittelabweichung (*standard error of the mean=SEM*) dargestellt. Die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ - Methode erlaubt eine verständliche graphische Darstellung der Expression der verschiedenen Marker.

4.4 Immunhistochemie

4.4.1 Anfertigung der Präparatschnitte

Die Paraffinblöcke wurden für eine Stunde auf der Kühlplatte bei -30°C gelagert und anschließend im Rotationsmikrotom (MICROM HM 360) in $4\mu\text{m}$ dicke Schichten geschnitten, kurz in ein Wasserbad (MEDAX Wasserbad, Sanova Diagnostik) eingelegt und auf Objektträger (Menzel-Gläser, Superfrost Plus,

Gerhard Menzel GmbH) übertragen. Nach Trocknen der Präparate für mindestens 24 Stunden konnten die Färbungen vorgenommen werden.

4.4.2 Immunhistochemische Färbung

Wie auch in der real time-PCR wurden in der Immunhistochemie die bereits beschriebenen Marker untersucht und zur Färbung herangezogen.

Dazu wurde als erster allgemeiner Arbeitsschritt für alle durchgeführten Färbungen die Schnitte in Xylol (Carl Roth GmbH+Co.) entparaffiniert, in der absteigenden Alkoholreihe rehydriert (Merck KGaA) und anschließend, um die endogene Peroxidase zu blockieren, in Methanol (Merck KGaA) mit 3%igem H₂O₂ (Fluka Chemie GmbH) inkubiert. Nach Markierung der Lungen mit Dako Pen (Dako A/S Denmark) wurden die Schnitte durch weitere individuelle Arbeitsschritte behandelt, die in den folgenden Unterkapiteln beschrieben werden.

Im Anschluss an die individuellen Schritte der Färbungen wurden die Proben mit ABC (Vector Laboratories) behandelt, darauffolgend wieder gepuffert. Als Chromogen wurde AEC (Dako Denmark A/S) verwendet, danach mit Aqua dest. (Medipharm, Laboratori Diaco Biomedicali) gestoppt. Als Gegenfärbung wurde Hämaunlösung (Merck KGaA) eingesetzt, anschließend folgte Auswaschen mit Leitungswasser. Nach einer kurzen Behandlung mit Ammoniakwasser (Merck KGaA) wurden die Proben mit Kaiser Gyceringelatine (Merck KGaA) eingedeckelt.

4.4.2.1 Färbung Ki-67

Für die Ki-67 Färbung wurden die Proben in 0,01M TBS Puffer (pH 7,3) vorbehandelt und anschließend für 15 min. in Citrat Puffer (Dako Denmark A/S) in der Mikrowelle (Whirlpool M401) erhitzt. Als Waschlösung wurde TBS Tween eingesetzt. Nach 30 min. Horse Normal Serum (Santa Cruz Biotechnology) in PBS wurde als Primärantikörper Mouse Monoclonal Antikörper (DakoCytomation Denmark A/S) mit einer Konzentration von 1:200 für weitere 30 Minuten verwendet. Nach Waschen mit Puffer (TBS Tween) wurden die Schnitte mit dem Sekundärantikörper (BA 2001) für 30 Minuten behandelt. Es folgte wiederholtes Waschen mit dem TBS Tween Puffer.

4.4.2.2 Färbung FGF 10, VEGF

Die für die Färbung für FGF-10 und VEGF herangezogenen Proben wurden in 0,05M TBS Puffer (pH 7,4) vorbehandelt und im Anschluss für 15 min in der Mikrowelle (Whirlpool M401) mit Citrat Puffer (Dako Denmark A/S) erhitzt. Als Auswaschlösung wurde TBS-Puffer verwendet. Nach 60 Minuten Goat Normal Serum 1%BSA (Dako Denmark A/S) in PBS wurde als Primärantikörper für die FGF-10 Reihe der polyklonale Rabbit Antikörper von Szabo Scanic (1:100) für 60 min., für die VEGF-Reihe der Rabbit Antikörper von Thermo im Verhältnis von 1:100 für 120 min. eingesetzt. Nach Waschen mit Puffer (TBS) wurden die Schnitte mit dem Sekundärantikörper für 30 Minuten behandelt (BA1000 1:600 in PBS, Vector Laboratories). Es folgte wiederholtes Waschen mit dem TBS Puffer.

4.4.2.3 Färbung BMP-4, tPA

Als weiterer Arbeitsschritt wurden die Proben in 0,05M TPS Puffer (pH 7,4) vorbehandelt und anschließend in Citrat Puffer (Dako Denmark A/S) für 15 min. in der Mikrowelle (Whirlpool M401) erhitzt. Als Auswaschlösung wurde TBS-Puffer mit Tween20 verwendet. Nach 60 Minuten 10%igem Goat Normal Serum 1%BSA in PBS wurde für die BMP-4 Reihe als Primärantikörper der Rabbit Antikörper von abcam (1:500), für die tPA-Reihe der polyklonale Rabbit Antikörper von Szabo Scandic in einem Verdünnungsverhältnis von 1:500 für 60 Minuten verwendet. Nach dem Waschen mit Puffer (TBS Tween) wurden die Schnitte mit dem Sekundärantikörper (BA1000 1:600 in PBS, Vector Laboratories) für 30 Minuten behandelt. Es folgte wiederholtes Waschen mit dem TBS Tween Puffer.

4.4.3 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

4.4.3.1 Auszählung der gefärbten Zellen

Nach den Färbevorgängen wurden die jeweiligen Präparate unter dem Mikroskop (Olympus) begutachtet und pro Präparat von fünf sich nicht überlappenden Gesichtsfeldern Aufnahmen gemacht. Bei den Ki-67 gefärbten Präparaten wurde eine 400-fache Vergrößerung gewählt. Die Färbungen von VEGF, BMP-4, tPA und

FGF-10 wurden mit einer 1000-fachen Vergrößerung aufgenommen. Die Bilder wurden in ein Software Programm (ImageJ) eingespielt und alle gefärbten Zellen durch Einsatz des *Cell Counters* manuell gezählt. Die gezählten Werte wurden in Windows Excel übertragen.

4.4.3.2 Statistische Auswertung und Erstellen der Graphiken

Im Anschluss wurden die Daten in ein Statistikprogramm (GraphPad Prism5) übernommen und die fünf ausgezählten Gesichtsfelder des einzelnen Präparates addiert, der Mittelwert (*MN*) an Zellen und die Standardmittelabweichung (*SEM*) in der jeweiligen Versuchsgruppe ermittelt und mittels one-way ANOVA getestet. Werte mit $p < 0,05$ wurden als signifikant angesehen. Unterschiede innerhalb der verschiedenen Gruppen wurden durch einen TUKEY *post hoc* Test ermittelt.

Die graphische Darstellung der *Ergebnisse* wurde ebenfalls mit Hilfe von GraphPad Prism5 vorgenommen, wobei der Mittelwert innerhalb der jeweiligen Versuchsgruppe als Balken mit Standardmittelabweichung dargestellt wird.

4.5 Verwendete Materialien und Geräte

4.5.1 Materialien und Chemikalien

Albumin from bovine serum, minimum 98% electrophoresis, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Ammoniaklösung 25% zur Analyse, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Aqua ad injectabilia, Medipharm, Laboratori Diaco Biomedicali, Triest, Italien

Biotinylated Anti-Mouse IgG (H+L), Affinity purified, Rat Adsorbed, Vector Laboratories, Inc., Burlingane, USA

Biotinylated Anti-Rabbit IgG (H+L), Affinity purified, Rat Adsorbed, Vector Laboratories, Inc., Burlingane, USA

Dako AEC+High Sensitivity Substrate Chromogen Ready-to-Use, Dako Denmark A/S, Dänemark

Dako Antibody Diluent Ready-to-Use, Dako North America, Inc., Carpinteria, USA

Dako Pen, Dako A/S Denmark, Golstrup, Dänemark

DakoCytomation Target Retrieval Solution, Citrate pH 6, Dako Denmark A/S, Golstrup Dänemark
Ethanol, absolute for analysis, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Goat Serum, Dako Denmark A/S, Golstrup, Dänemark
Kaisers Glyceringelatine, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Mayers Hämalaulösung, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Menzel-Gläser, Superfrost Plus, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Methanol, for analysis, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid zur Analyse, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid zur Analyse, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Santa Cruz Biotechnology Horse Serum, Szabo Scandic, Wien
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tween20 zur Synthese, Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA
Wasserstoffperoxid 30%, Fluka Chemie GmbH, Schweiz
Xylol ≥98.5%, Ph. Helv., reinst., Carl Roth GmbH+Co. KG, Deutschland

4.5.2 Antikörper

Abcam BMP4 Rabbit IgG, Cambridge, UK
Monoclonal Mouse Anti-Rat Ki-67 Antigen Clone MIB-5, DakoCytomation Denmark A/S, Golstrup, Dänemark
Santa Cruz FGF-10(H-121) Rabbit polyclonal IgG, Szabo Scandic, Wien
Santa Cruz t-PA(H90) Rabbit polyclonal IgG, Szabo Scandic, Wien
Thermo VEGF Rabbit Antibody pH 8.1mM EDTA als Retrieval, Cheshire, UK

4.5.3 Geräte

Accu-Edge® Low Profile Microtom Blades, Extreme Thin 4980
Mikroskop Olympus BX51
Mikrowelle Whirlpool M401, Österreich
Rechner Optiplex GX620, Dell
Rotationsmikrotom MICROM HM 360

4.5.4 Lösungen

TBS (Tris Buffered Saline) nach IHC-Protokoll (www.ihcworld.com)

10X TBS (0,5M Tris Base, 9% NaCl, pH 8,4):

Trizma base	61g
NaCl	90g
Destilliertes H ₂ O	1000ml

Mischen, bei Bedarf mit konzentrierter Salzsäure auf pH 8,4 nachadjustieren. Vor Gebrauch 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnen.

TBS Tween nach ICH-Protokoll (www.ihcworld.com)

10X TBS Tween 20 (0,5M Tris Base, 9% NaCl, 0.5% Tween 20, pH 8,4):

Trizma base	61g
NaCl	90g
Destilliertes H ₂ O	1000ml

Mischen, bei Bedarf mit konzentrierter Salzsäure auf pH 8,4 nachadjustieren. 5ml Tween 20 hinzufügen. Vor Gebrauch 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnen.

5 Ergebnisse

5.1 Ergebnisse der real time-PCR

Die mit IGF-2 behandelten Gruppen beinhalten jeweils 6 Proben, während die Kontrollgruppe 5 Proben umfasst. In der graphischen Darstellung der Ergebnisse repräsentieren die Balken den *Mean (MN)* des *fold change* der jeweiligen Gruppe mit dazugehörigem *standard error of the mean (SEM)*.

5.1.1 Ki-67

Die Expression von Ki-67 mRNA in fetalem Lungengewebe zeigte innerhalb der drei Versuchsgruppen eine signifikante Varianz ($p=0,0120$). Der TUKEY *post hoc* Test ergab einen signifikanten Unterschied ($p<0,05$) zwischen den beiden mit IGF-2 behandelten Gruppen sowie zwischen Kontrollgruppe und der mit $0,2\mu\text{g}$ behandelten Gruppe.

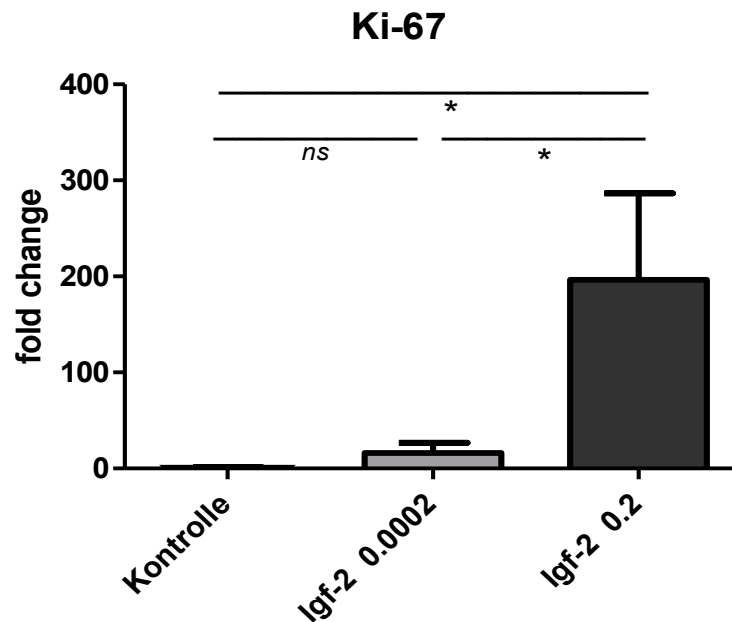


Abbildung 9: Expression von Ki-67 mRNA in fetalem Lungengewebe nach intrauteriner Behandlung mit Igf-2. * zeigen einen Unterschied mit einer Signifikanz von $p<0,05$. Kontrolle mit MN 1 und SEM $\pm 0,66$; IGF-2 $0,0002\mu\text{g}$ mit MN 16,24 und SEM $\pm 13,25$; IGF-2 $0,2\mu\text{g}$ mit MN 196,54 und SEM $\pm 121,67$. ns=non significant.

Die Gruppe, die eine geringere Konzentration an IGF-2 (0,0002 μ g) erhalten hatte, zeigt zwar eine geringe Steigerung der mRNA Expression (16-fach erhöht) im Vergleich zur Kontrollgruppe, diese war aber nicht signifikant. Nur die mit der höheren IGF-2 Konzentration (0,2 μ g) behandelte Gruppe zeigt im Vergleich zu der Kontrolle (196-fach erhöht) und der anderen IGF-2 Versuchsgruppe eine signifikant erhöhte mRNA Expression von Ki-67.

5.1.2 VEGF

Die Expression von VEGF in fetalem Lungengewebe zeigte eine signifikante Varianz ($p=0,0379$). Der Tukey *post hoc* Test zeigte zwischen den einzelnen Gruppen keinen signifikanten Unterschied mit $p<0,05$. Die Expression von VEGF zeigt jedoch abhängig von der verabreichten IGF-2 Menge einen Aufwärtstrend.

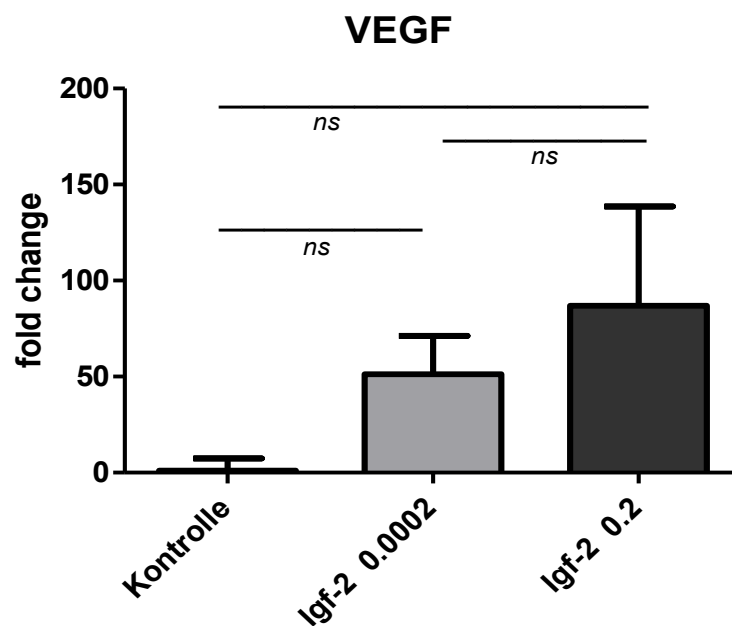


Abbildung 10: Expression von VEGF mRNA in fetalem Lungengewebe nach intrauteriner Behandlung mit Igf-2. Kontrollgruppe mit MN 1 und SEM $\pm 7,79$; IGF-2 0,0002 μ g mit MN 51,29 und SEM $\pm 28,52$; IGF-2 0,2 μ g mit MN 86,97 und SEM $\pm 62,53$. ns=non significant.

Es konnte gezeigt werden, dass eine IGF-2 Konzentration von 0,0002 μ g gegenüber dem Placebo zu einer 50-fach erhöhten Expression an VEGF führte. Durch das Verabreichen von 0,2 μ g kommt es zu einer weiteren Steigerung der Expression des Markers. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich eine 85-fach erhöhte VEGF-Expression.

5.1.3 BMP-4

Die Expression von BMP-4 mRNA zeigte keine signifikante Varianz ($p=0,6013$).

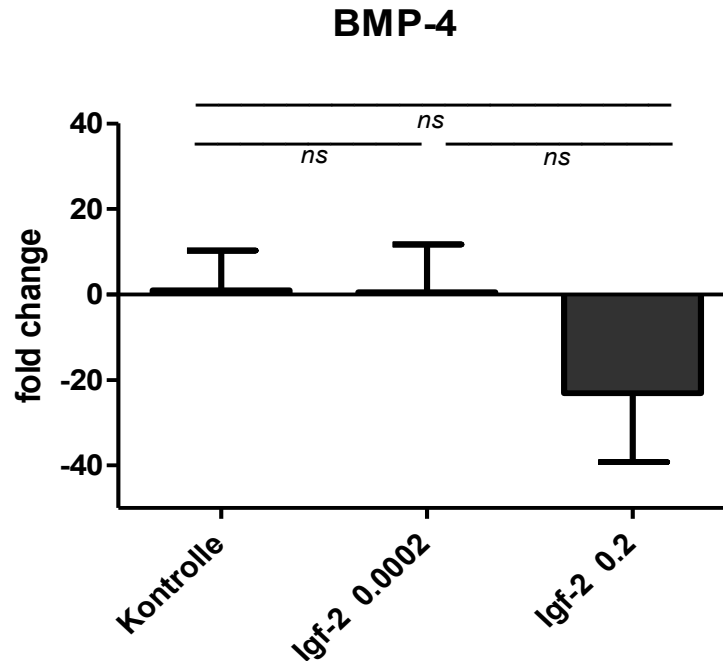


Abbildung 11: Expression von BMP-4 mRNA in fetalem Lungengewebe nach intrauteriner Behandlung mit IGF-2. Kontrollgruppe mit MN 1 und SEM $\pm 11,44$; IGF-2 0,0002µg mit MN 0,49 und SEM $\pm 13,38$; IGF-2 0,2µg mit MN -23,12 und SEM $\pm 18,98$. ns=non significant.

Die Kontrollgruppe und die mit der geringeren Menge an IGF-2 behandelte Gruppe zeigten annähernd gleiche Expression von BMP-4 mRNA. Die mit der höchsten IGF-2 Konzentration behandelte Gruppe wies eine über 20-fach erniedrigte Expression von BMP-4 mRNA im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen auf. IGF-2 Administration bewirkte einen negativen Trend in Bezug auf die mRNA Expression von BMP-4.

5.1.4 tPA

Die Expression von tPA in fetalem Lungengewebe zeigte eine signifikante Varianz ($p=0,0156$).

Der TUKEY *post hoc* Test ergab einen signifikanten Unterschied ($p<0,05$) zwischen Kontrollgruppe und der mit 0,0002µg IGF-2 behandelten Gruppe sowie zwischen Kontrollgruppe und der mit 0,2µg behandelten Gruppe.

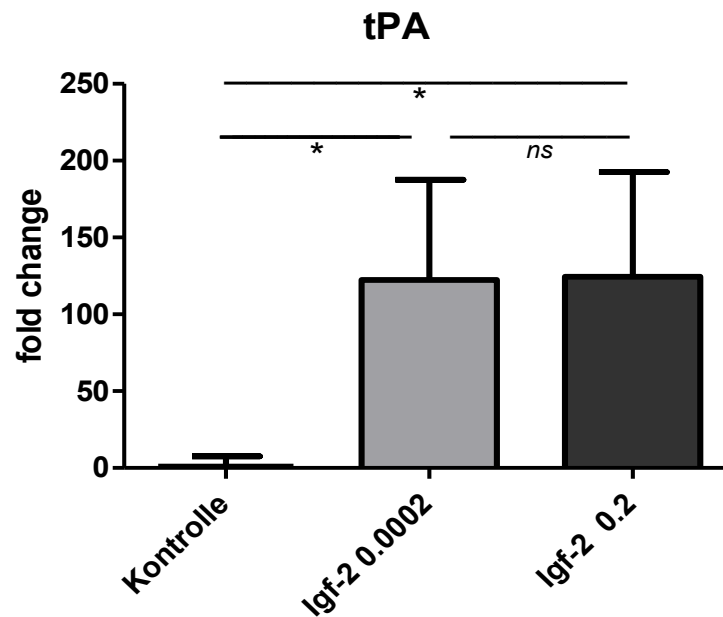


Abbildung 12: Expression von tPA mRNA in fetalem Lungengewebe nach intrauteriner Behandlung mit Igf-2. * zeigen einen Unterschied mit einer Signifikanz von $p < 0,05$. Kontrollgruppe mit MN 1 und SEM $\pm 7,22$; IGF-2 0,0002 μg mit MN 122,37 und SEM $\pm 79,45$; IGF-2 0,2 μg mit MN 124,60 und SEM $\pm 64,52$. ns=non significant.

Die mit IGF-2 behandelten Versuchsgruppen wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine über 100-fach erhöhte mRNA-Expression von tPA auf. Das Ergebnis zeigt also, dass bereits die kleine Menge an IGF-2 (0,0002 μg) zu einer Steigerung der Expression von tPA mit einem signifikanten Unterschied im Vergleich zu der mit Placebo behandelten Gruppe geführt hat. Die Menge von 0,0002 μg IGF-2 hat zu einer Steigerung der Expression um das 122-fache im Vergleich zur Placebogruppe geführt. Die deutlich höhere Konzentration an IGF-2 (0,2 μg) hat zu einer noch höheren Expression von tPA geführt. Der Unterschied zur Kontrollgruppe zeigt eine 124-fache Erhöhung der tPA-Expression mit Signifikanz. Der direkte Vergleich zwischen den beiden mit IGF-2 behandelten Gruppen zeigt aber, dass die deutlich größere Menge an IGF-2 kaum Steigerung der Expression dieses Markers hervorbringt.

5.1.5 FGF-10

Die Expression von FGF-10 zeigte keine signifikante Varianz ($p=0,4806$). Im Vergleich zur Kontrollgruppe wiesen die mit IGF-2 behandelten Gruppen jeweils einen negativen *fold change* auf.

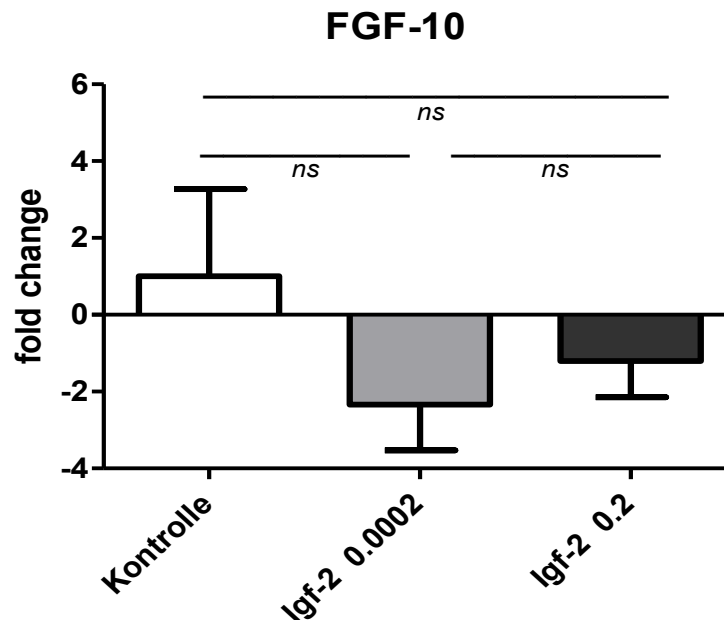


Abbildung 13: Expression von FGF-10 mRNA nach intrauteriner Behandlung mit IGF-2. Kontrollgruppe mit MN 1 und SEM $\pm 2,24$; IGF-2 0,0002 μg mit MN -2,34 und SEM $\pm 1,40$; IGF-2 0,2 μg mit MN -1,21 und SEM $\pm 1,30$. ns=non significant.

Die Behandlung mit 0,0002 μg IGF-2 führte im Vergleich zur Placebogruppe zu einer Abnahme der FGF-10 Expression um den Faktor 2,3. Das Verabreichen einer IGF-2 Dosis von 0,2 μg führte im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer 1,2-fach geringeren Expression des Markers, zeigte aber im Vergleich zu der mit der geringeren IGF-2 Menge (0,0002 μg) behandelten Gruppe einen positiven Trend der Markerproteinexpression.

5.2 Ergebnisse Immunhistochemie

Die mit IGF-2 behandelten Gruppen sowie die Kontrollgruppe beinhalten jeweils 6 Proben. In der graphischen Darstellung der Ergebnisse repräsentieren die Balken den *Mean (MN)* positiv gefärbter Zellen der jeweiligen Gruppe mit dazugehörigem *standard error of the mean (SEM)*.

5.2.1 Ki-67

Die Expression Ki-67 positiver Zellen zeigt eine nicht signifikante Varianz ($p=0,6233$).

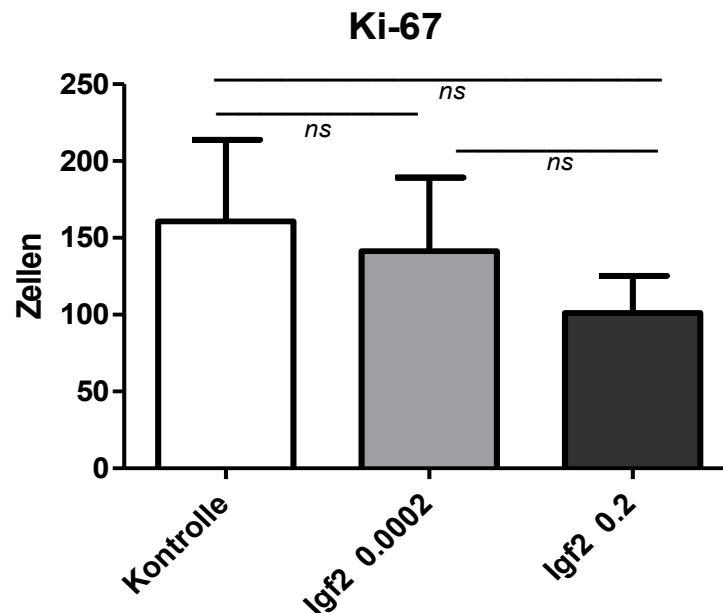


Abbildung 14: Expression Ki-67 positiver Zellen nach intrauteriner Behandlung mit Igf-2. Kontrollgruppe mit MN 160,77 und SEM $\pm 45,88$; IGF-2 0,0002 μg mit MN 141,33 und SEM $\pm 39,67$; IGF-2 0,2 μg MN 101,17 und SEM $\pm 27,92$. ns=non significant.

Die Kontrollgruppe zeigt mit durchschnittlich 160,8 Zellen pro Präparat im Vergleich zu den mit IGF-2 behandelten Gruppen die größte Expression positiver Zellen. Eine Behandlung mit IGF-2 führte zu einer Abnahme der Expression. So weist die Gruppe, die mit einer Menge von 0,0002 μg IGF-2 behandelt wurde durchschnittlich 141,3 Ki-67 positive Zellen auf. Die höhere IGF-2 Konzentration von 0,2 μg bewirkte eine durchschnittliche Expression von 101,2 Zellen, die einen positiven Nachweis des Ki-67 Proteins brachten.

Eine Behandlung mit höher werdender IGF-2 Konzentration bewirkte in Bezug auf die Expression Ki-67 positiv gefärbter Zellen einen Negativtrend.

5.2.2 VEGF

Die mit IGF-2 behandelten Gruppen wiesen einen positiven Trend in Bezug auf die Expression von VEGF positiven Zellen auf. Es ergab sich keine Varianz mit Signifikanz ($p=0,1208$).

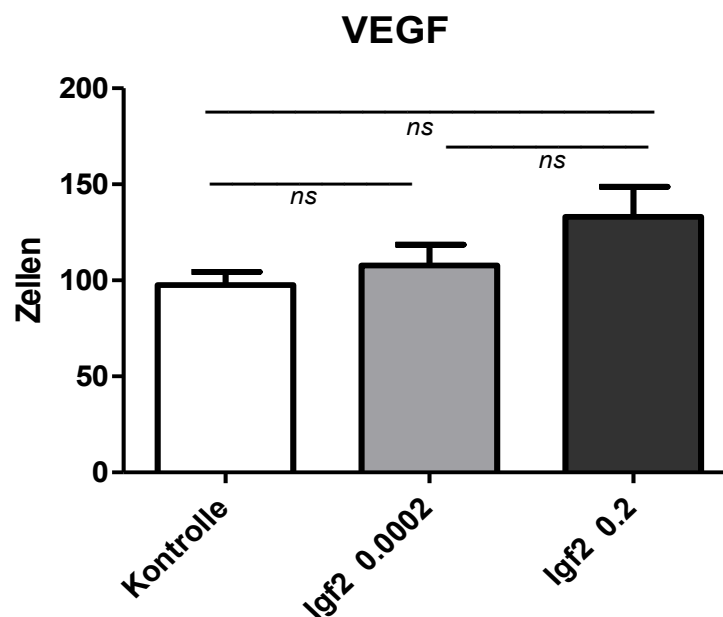


Abbildung 15: Expression VEGF positiver Zellen nach intrauteriner Behandlung mit Igf-2. Kontrollgruppe mit MN 97,53 und SEM $\pm 7,40$; IGF-2 0,0002 μg mit MN 107,70 und SEM $\pm 9,90$; IGF-2 0,2 μg MN 133,071 und SEM $\pm 14,58$. ns=non significant.

Die Plazebogruppe erreichte durchschnittlich rund 98 positiv gefärbte Zellen. Die Behandlung mit 0,0002 μg IGF-2 zeigte eine vermehrte Expression von VEGF Protein, jedoch ohne Signifikanz. Die Gruppe, die mit der geringeren Menge IGF-2 (0,0002 μg) behandelt wurde wies im Durchschnitt 108 positiv gefärbte Zellen auf. Die höhere Menge an appliziertem IGF-2 (0,2 μg) führte auch zur höchsten Expression positiver Zellen. Die Lungen der dieser Gruppe zeigten durchschnittlich 133 positiv gefärbte Zellen pro Präparat.

Es konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender IGF-2 Menge auch die Expression von VEGF einen positiven Trend aufweist.

5.2.3 BMP-4

Die Expression BMP-4 positiver Zellen zeigte keine signifikante Varianz ($p=0,1411$). Die mit einer IGF-2 Konzentration von $0,2\mu\text{g}$ behandelte Gruppe zeigte die stärkste Expression positiver Zellen, jedoch ergab sich im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied.

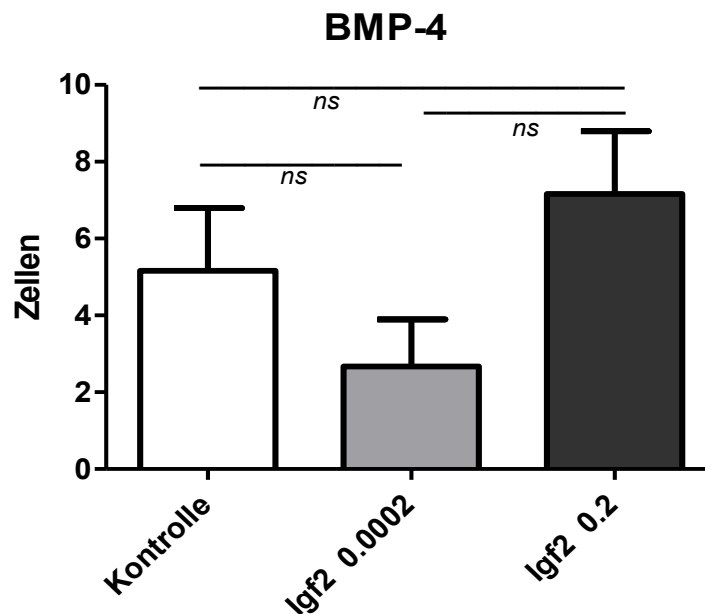


Abbildung 16: Expression BMP-4 positiver Zellen nach intrauteriner Behandlung mit Igf-2. Kontrollgruppe mit MN 5,17 und SEM $\pm 1,61$; IGF-2 $0,0002\mu\text{g}$ mit MN 2,67 und SEM $\pm 1,18$; IGF-2 $0,2\mu\text{g}$ MN 7,17 und SEM $\pm 1,58$. ns=non significant.

Die Kontrollgruppe zeichnet sich mit einer durchschnittlichen Anzahl von 5,2 positiven Zellen pro Präparat aus. Eine Behandlung der Feten mit $0,0002\mu\text{g}$ IGF-2 führte zu durchschnittlich 2,7 positiv gefärbten Zellen. Eine Behandlung mit der geringeren Menge an IGF-2 ($0,0002\mu\text{g}$) zeigte somit einen negativen Trend der Expression von BMP-4 im Vergleich zur Kontrollgruppe. IGF-2 Administration in einer Konzentration von $0,2\mu\text{g}$ hingegen bewirkte im Vergleich zu den beiden Gruppen einen Aufwärtstrend der Expression des Proteins. So zeigten die Präparate dieser Gruppe durchschnittlich 7,2 positiv gefärbte Zellen.

5.2.4 tPA

Der Unterschied zwischen den Gruppen ergab keine signifikante Varianz ($p=0,8763$).

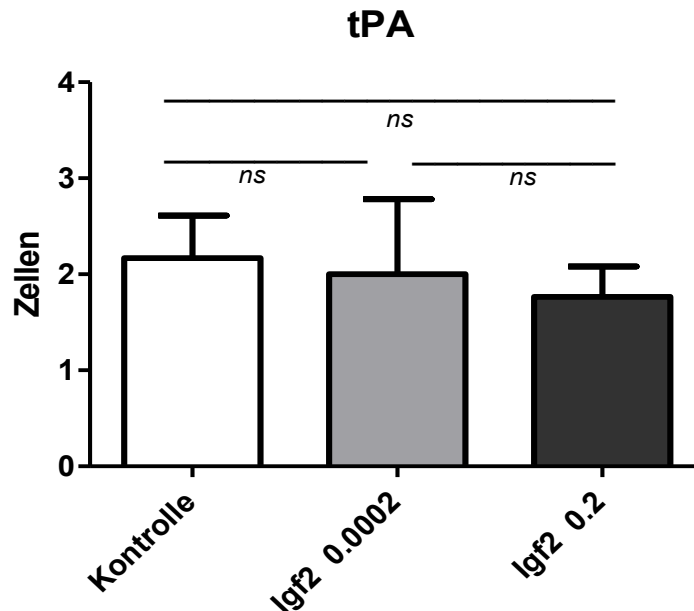


Abbildung 17: Expression tPA positiver Zellen nach intrauteriner Behandlung mit Igf-2. Kontrollgruppe mit MN 2,17 und SEM $\pm 0,39$; IGF-2 0.0002 μg mit MN 2,00 und SEM $\pm 0,67$; IGF-2 0,2 μg MN 1,77 und SEM $\pm 0,28$. ns=non significant.

Die Kontrollgruppe wies die größte Expression von tPA-positiven Zellen (im Durchschnitt 2,2) auf, gefolgt von der mit einer IGF-2 Konzentration von 0,0002 μg behandelten Gruppe mit durchschnittlich 2 tPA positiv gefärbten Zellen. Die Gruppe, die mit der höchsten IGF-2 Konzentration (0,2 μg) behandelt wurde, zeigte mit durchschnittlich 1,8 Zellen die geringste Expression positiv gefärbter Zellen. Die Behandlung der Lungen mit zunehmender IGF-2 Konzentration führte zu einem negativen Trend der Markerproteinexpression.

5.2.5 FGF-10

Die Expression von FGF-10 positiven Zellen ergab keine signifikante Varianz ($p=0,7873$).

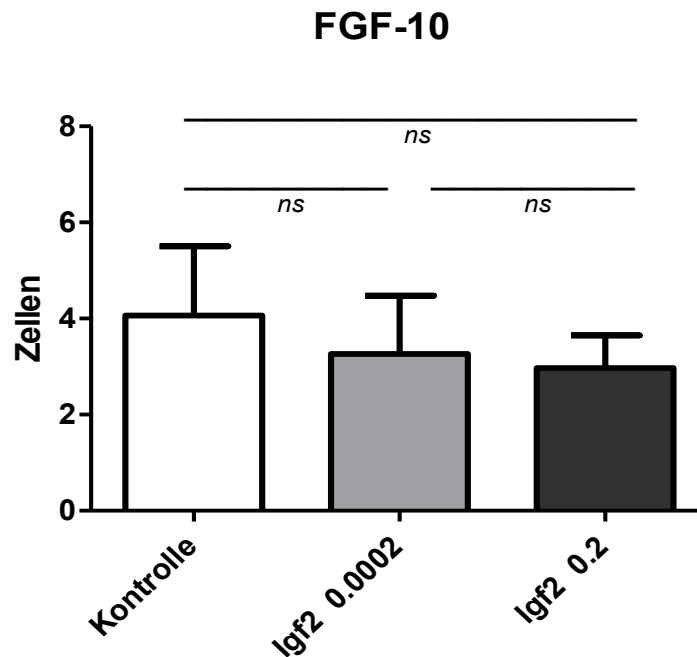


Abbildung 18: Expression FGF-10 positiver Zellen nach intrauteriner Behandlung mit Igf-2. Kontrollgruppe mit MN 4,07 und SEM \pm 1,45; IGF-2 0.0002 μ g mit MN 3,27 und SEM \pm 1,24; IGF-2 0,2 μ g MN 2,97 und SEM \pm 0,65. ns=non significant.

Die Kontrollgruppe wies die höchste Anzahl positiv gefärbter Zellen auf (durschnittlich 4,1), gefolgt von der mit 0,0002 μ g IGF-2 behandelten Gruppe mit 3,3 positiver Zellen im Durchschnitt. Mit durchschnittlich 3 positiv gefärbten Zellen pro Präparat weist die mit der höchsten IGF-2 Konzentration (0,2 μ g) behandelte Gruppe die geringste Expression FGF-10 positiver Zellen auf.

IGF-2 zeigte in zunehmender Konzentration einen Negativtrend der Expression des FGF-10 Proteins.

6 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es zu klären, ob die fetale intraperitoneale IGF-2 Administration die fetale Lungenentwicklung beeinflusst. Dafür wurden verschiedene Marker untersucht:

Ki-67: Die Applikation von 0,2µg IGF-2 führte in den fetalen Lungen zu einer signifikanten Steigerung der mRNA-Expression von Ki-67 im Vergleich zu den beiden übrigen Gruppen. Die Dosis von 0,0002µg IGF-2 konnte zwar eine milde Steigerung der mRNA Expression bewirken, jedoch erst 0,2µg IGF-2 führten zu einer signifikanten Steigerung der Expression. Dies spricht für eine gesteigerte Proliferation in diesen Lungen. Die Expression von Ki-67 Protein zeigte zwar keine signifikanten Unterschiede, allerdings war ein entgegengesetzter Trend zu beobachten. Divergente Expression von mRNA und Protein wurde in der Literatur bereits beschrieben (Gerlach et al., 1997). Generell scheinen dabei posttranskriptionelle und translationelle Kontrollmechanismen in Bezug auf die Regulation intrazellulärer Proteinlevels eine Rolle zu spielen (Kren & Steer, 1996; Akagi et al., 1994; Kondo et al., 1992). Interessant zu klären wäre aber demnach, ob in Bezug auf die Morphologie der Lunge Veränderungen beobachtbar wären, da die PCR lediglich ein quantitatives Verfahren darstellt und die Immunhistochemie Nachweise für Markerproteine liefert, aber wenig Aussage über die qualitativen Veränderungen an der Lungenstruktur erlaubt.

tPA: Die Ergebnisse von PCR und Immunhistochemie von tPA ergeben ein ähnliches Bild der Resultate von Ki-67. Die Expression von mRNA und Protein verlaufen bei tPA divergent. Die Ergebnisse der PCR lassen erkennen, dass IGF-2 in Bezug auf die Expression der mRNA von tPA positiv wirkt. 0,0002µg IGF-2 haben zu einer signifikanten Erhöhung der mRNA Expression geführt. Die höhere Dosis von 0,2µg IGF-2 konnte die Expression der tPA mRNA im Vergleich sogar noch steigern. IGF-2 könnte somit durch Steigerung der mRNA von tPA zu einer gesteigerten Entwicklung von Gefäßen in der Lunge beitragen, die sich durch sprossendes Wachstum und dadurch Stimulatoren der Lungenverzweigung auszeichnen und damit positiven Einfluss auf die fetale Lungenentwicklung ausüben. Möglicherweise üben posttranskriptionelle bzw. translationelle Kontrollmechanismen aber Einfluss auf die Expression des Proteins aus, denn die

Expression von mRNA und Protein zeigen ein divergierendes Bild. Da die positive Wirkung von tPA auf die Entwicklung der Gefäße der Lunge aber streng mit der Anwesenheit des Proteins assoziiert ist (Levin et al., 1998), ist die Wirkung von IGF-2 auf die tPA-Protein Expression und damit die Lungenentwicklung zu diesem Zeitpunkt fraglich. Hier bleibt zu klären, wie sich der Level von mRNA zu dem des Proteins physiologisch verhält und ob trotz reduzierter Proteinmenge von tPA um Tag 21 der fetalen Lungenentwicklung bei Ratten dennoch ein positiver Effekt in Bezug auf die Morphologie zu beobachten ist, da in dieser Arbeit die real time-PCR als rein quantitatives Verfahren und Immunhistochemie rein als Markerproteinnachweis eingesetzt wurden.

Die übrigen untersuchten Parameter zeigten keine signifikanten Unterschiede, was möglicherweise auf die kleinen Fallzahlen zurückzuführen ist. Allerdings waren Trends zu erkennen, die im folgenden Abschnitt besprochen werden:

VEGF: Die niedrigere IGF-2-Dosis (0,0002 μ g) bewirkte im Vergleich zur Kontrollgruppe einen Trend zur Expressionssteigerung, der nach 0,2 μ g noch stärker ausgeprägt war. Dies könnte bedeuten, dass IGF-2 durch die Expression von VEGF die Entwicklung der fetalen Lunge beeinflussen kann. Es wurde bereits auf die Notwendigkeit zweier Faktoren, nämlich einer störungsfreien Angiogenese und Vaskularisierung für eine intakte Entwicklung der Lunge hingewiesen (Healy et al., 2000). VEGF gilt als Promotor besonders dieser beiden Faktoren und trägt dadurch positiv zur fetalen Lungenentwicklung bei (Brown et al., 2001). Auch *in vitro* Versuche von Brown et al. an menschlichen fetalen Explantaten haben gezeigt, dass eine Behandlung von VEGF die Dichte an epithelialen Zellen erhöht und zu einer Dilatation distaler Atemwegsstrukturen führte (Brown et al., 2001).

BMP-4: Die Kontrollgruppe wies die höchste Expression an mRNA auf, die mit 0,2 μ g IGF-2 behandelte Gruppe die Geringste, was wie erwähnt aber nicht signifikant war. Gegenteilig dazu zeichnet sich in Bezug auf die Proteinexpression die Gruppe, die die höchste IGF-2 Behandlung (0,2 μ g) bekommen hatte, mit der höchsten Expression aus. Demnach würde IGF-2 in höherer Dosierung die Expression des BMP-4 Proteins steigern und dadurch epithelial-mesenchymale Interaktionen (Minoo, 2000) und die distale Zellentwicklung (Weaver et al., 1999)

beeinflussen. Ähnlich wie bei Ki-67 zeigte sich auch hier divergierende Expression von mRNA und Protein.

FGF-10: Auch für diesen Marker fanden sich keine signifikanten Unterschiede, jedoch einen Trend zu reduzierter Expression von FGF-10 in den IGF-Gruppen.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde nach intraperitonealer Applikation von IGF-2 bei fetalen Ratten an Tag 19, 20 und 21 der Schwangerschaft die Expression von mRNA und Protein verschiedener Marker der Lungenentwicklung untersucht. Dabei bewirkte IGF-2 in einer Dosis von 0,2µg eine erhöhte Expression von Ki-67- und tPA-mRNA, was auf eine gesteigerte Proliferation und Gefäßentwicklung deuten lässt. Interessant wäre aber noch zu klären, ob der Einfluss von IGF-2 auf diese untersuchten Marker auch Veränderungen in der Morphologie der Lunge bewirken könnte. Dazu wäre eine histologische Aufarbeitung der Präparate notwendig um qualitative Veränderungen an der Lungenstruktur erfassen zu können.

7 Literaturverzeichnis

- AKAGI T, KONDO E & YOSHINO T. Expression of Bcl-2 protein and Bcl-2 mRNA in normal and neoplastic lymphoid tissues. *Leukemia & Lymphoma* 12: 81-87, 1994.
- ANDRESS DL & BIRNBAUM RS. Human osteoblast-derived insulin-like growth factor (IGF) binding protein 5 stimulates osteoblast mitogenesis and potentiates IGF action. *Journal of Biological Chemistry* 267:22467-22472, 1992.
- ANDRESS DL, LOOP SM, ZAPF J & KIEFER MC. Carboxy-truncated insulin-like growth factor binding protein-5 stimulates mitogenesis in osteoblast-like cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 195:25-30, 1993.
- BENJAMIN JT, SMITH RJ, HALLORAN BA, DAY TJ, KELLY DR & PRINCE LS. FGF-10 is decreased in bronchopulmonary dysplasia and suppressed by toll-like receptor activation. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 292: L550-L558, 2007.
- BHATT AJ, PRYHUBER GS, HUYCK H, WATKINS RH, METLAY LA & MANISCALCO WM. Disrupted pulmonary vasculature and decreased vascular endothelial growth factor, Flt-1, and TIE-2 in human infants dying with bronchopulmonary dysplasia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 164: 1971-1980, 2001.
- BROWN KRS, ENGLAND KM, GOSS KL, SNYDER JM & ACARREGUI MJ. VEGF induces airway epithelial cell proliferation in human fetal lung in vitro. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 281:L1001-L1010, 2001.
- CHEUNG PT, WU J, BANACH W & CHERNAUSEK SD. Glucocorticoid regulation of an insulin-like growth factor-binding protein-4 protease produced by a rat neuronal cell line. *Endocrinology* 135:1328-1335, 1994.
- COLLEN D. On the regulation and control of fibrinolysis. *Journal of Thrombosis And Haemostasis* 43:77-89, 1980.
- FERRARA N, GERBER HP & LECOUNTER J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine* 9:669-676, 2003.
- GEBB SA & SHANNON JM. Tissue interactions mediate early events in pulmonary vasculogenesis. *Developmental Dynamics* 217: 159-169, 2000.
- GERDERS J, LEMKE H, BAISCH H, WACKER HH, SCHWAB U & STEIN H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *The Journal of*

Immunology, Volume 133, Number 4, 1710-1715, 1984.

- GERLACH C, SAKKAB DY, SCHOLZEN T, DASSLER R, ALISON MR & GERDERS J. Ki-67 expression during rat liver regeneration after partial hepatectomy. *Hepatology* 26:573-578, 1997.
- HASHIMOTO R, ONO M, FUJIWARA H, HIGASHIHASHI N, YOSHIDA M, ENJOH-KIMURA T & SAKANO KI. Binding sites and binding properties of binary and ternary complexes of insulin-like growth factor-II (IGF-II), IGF-binding protein-3, and acid-labile subunit. *Journal of Biological Chemistry* 272:27936-27942, 1997.
- HEALY AM, MORGENTHAU L, ZHU X, FARBER HW & CARDOSO WV. VEGF is deposited in the subepithelial matrix at the leading of branching airways and stimulates neovascularisation in the murine embryonic lung. *Developmental Dynamics* 219: 341-352, 2000.
- HWA V., YOUNGMAN O. & ROSENFELD RG. The Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein (IGFBP) Superfamily, The Endocrine Society, *Endocrine Reviews*: 761.787, 1999.
- JAKKULA M, LE CRAS TD, GEBB S, HIRTH KP, TUDER RM, VOELKEL NF & ABMAN SH. Inhibition of angiogenesis decreases alveolarization in developing rat lung. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 279: L600-L607, 2000.
- JEFFERY PK. The development of large and small airways. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 157: 174-180, 1998.
- JOSHI S & KOTECHA S. Lung growth and development. *Early Human Development* 83, 789-794, 2007.
- KHAN PA, CLOUTIER M & PIEDBOEUF B. Tracheal occlusion: a review of obstructing fetal lungs to make them grow and mature. *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics* 145C(2);125-38, 2007.
- KINANE TB. Lung Development and Implications for Hypoplasia Found in Congenital Diaphragmatic Hernia. *American Journal of Medical Genetics* 145C: 117-124, 2007.
- KITTERMAN JA, CHAPLIN CJ, VANDERBILT JN, PORTA NF, SCARVO LM, DOBBS LG, et al. Pre and postnatal lung development, maturation and plasticity. Effects of oligohydramnios on lung growth and maturation in the fetal rat. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 282(3):431-439, 2002.
- KONDO E, NAKAMURA S, ONOUE H, et al. Detection of Bcl-2 protein and Bcl-2 messenger RNA in normal and neoplastic lymphoid tissues by immunohistochemistry and in situ hybridization. *Blood* 80:2044-2051, 1992.

- KOTECHA S. Lung growth for beginners. *Paediatric Respiratory Review* 1(4): 308-313, 2000.
- KREN BT & STEER CJ. Posttranscriptional regulation of gene expression in liver regeneration: role of mRNA stability. *FASEB Journal*;10:559-573, 1996.
- LALLEMAND A, RUOCCO S, JOLY P & GAILLARD D. *In vivo* Localisation of the insulin-like growth factors I and II (IGF I and IGF II) gene expression during human lung development. *International Journal of Developmental Biology* 39, 529-537, 1995.
- LEVIN EG, BANKA CL & PARRY GCN. Progressive and transient Expression of Tissue Plasminogen Activator During Fetal Development. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 20; 1668-1674, 2000.
- LEVIN EG, OSBORN KG & SCHLEUNING WD. Tissue Plasminogen Activator Expression Is Limited to Bronchial Arteries and Pulmonary Vessels of Discrete Size, *Chest*; 114:68S, 1998.
- LIU F, VENTURA F, DOODY J & MASSAGUE J. Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Molecular and Cellular Biology* 15, 3479-3486, 1995.
- MAKI R. Small Is Beautiful: Insulin-like Growth Factors and Their Role in Growth, Development and Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 4985-4995, 2010.
- MERCUS PJFM, HAVE-OPBROEK AAW & QUANJER PH. Human lung growth: a review. *Pediatric Pulmonology* 21(6):383-397, 1996.
- MINOO P. Transcriptional regulation of lung development: Emergence of specificity. *Respiratory Research*, 1:109-115, 2000.
- MOATS-STAATS B, PRICE W, XU L, JARVIS H & STILES A. Regulation of the Insulin-like Growth Factor System during Normal Rat lung Development. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* Volume 12, 56-64, 1994.
- MOESSINGER AC, HARDING R, ADAMSON TM, SINGH M. & KIU GT. Role of lung fluid volume in growth and maturation of fetal sheep lung. *Journal of Clinical Investigation* 8: 1270-1277, 1990.
- MUSKHELISHVILI L, LATENDRESSE JR, KODELL RL & HENDERSON EB. Evaluation of cell proliferation in rat tissues with BrdU, PCNA, Ki-67(MIB-5) Immunohistochemistry and in situ hybridization for histone mRNA. *Journal Of Histochemistry and Cytochemistry* 51:1681-1688, 2003
- NAGATA K, MASUMOTO K, UESUGI T, YAMAMOTO S, YOSHIKAZI K, FUKUMOTO S, NONAKA K & TAGUCHI T. Effect of insulin-like growth factor and its receptors regarding lung development in fetal mice. *Pediatric Surgery International* 23(10):953-959, 2007.

- O'DELL S & DAY I. Molecules in focus Insulin-like growth factor II (IGF-II) International Journal of Biochemistry & Cell Biology 30, 767-771, 1998.
- PORTER HJ. Pulmonary hypoplasia. Archives of Disease in Childhood Fetal & Neonatal Edition, 81:F81-F83, 1999.
- RUTTENSTOCK E, DOI T, DINGEMANN J & PURI P. Downregulation of Insulin-like growth factor binding protein 3 and 5 in nitrofen-induced pulmonary hypoplasia. Pediatric Surgery International 26: 59-63, 2010.
- SALMON WD & DAUGHADAY. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. Journal of Clinical Medicine 49: 825-836, 1957.
- SCHOLZEN T & GERDES J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. Journal of Cellular Physiology 182: 311-322, 2000.
- SEHAT B, ANDERSSON S, VASILCANU R, GIENITA L & LARSSON O. Role of Ubiquitination in IGF-1 Receptor Signaling and Degradation. Plos One, Issue 4, 1-8, 2006.
- SILVA D, VENIHAKI M, GUO W & LOPEZ M. Igf2 Deficiency Results in Delayed Lung Development at the End of Gestation. Endocrinology 147, 584-591, 2006.
- SPENCER EM & CHAN K. A 3-dimensional model for the insulin like growth factor Binding proteins (IGFBPs), supporting evidence using the structural determinants of the IGF binding site on IGFBP-3. Progression Growth Factor Research 6:209-214, 1995.
- STILES A & D'ERCOLE J. The Insulin-like Growth Factors and the Lung. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology Volume 3, 93-99, 1990.
- VERHEIJEN R, KUIJPERS HJ, SCHLINGEMANN RO, BOEHMER AL, VAN DRIEL R, BRAKENHOFF GJ, RAMAEKERS FC. Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. I. Intracellular localization During interphase. Journal of Cell Science 92:123-130, 1989a.
- VERHEIJEN R, KUIJPERS HJ, VAN DRIEL R, BECK JL, VAN DIERENDONCK, BRAKENHOFF GJ, RAMAEKERS FC. Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes. Journal of Cell Science 92: 531-540, 1989b.
- VOELKEL NF, VANDIVIER RW & TUDER RM. Vascular endothelial growth factor in the lung. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology 29: L209-L221, 2006.
- WALLEN L, MYINT W, NYGARD K, SHIMASAKI S & CLEMMONS D. Cellular distribution of insulin-like growth factor binding protein mRNAs and

Peptides during rat lung development. *Journal of Endocrinology* 155, 313-327, 1997.

WALTENBERGER J, CLAESSION-WELSH L, SIEGBAHN A, SHIBUYA M & HELDIN CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *Journal of Biological Chemistry* 269: 26988–26995, 1994.

WARBURTON D, BELLUSCI S, DE LANGHE S, DEL MORAL PM, FLEURY V, MAILLEUX A, TEFFT D, UNBEKANDT M & WANG K. Molecular Mechanisms of early lung specification and branching morphogenesis. *Pediatric Research* 57:26R-37R, 2005.

WEAVER M, YINGLING JM, DUNN NR, BELLUSCI S & HOGAN BLM. Bmp signaling regulates proximal-distal differentiation of endoderm in Mouse lung development. *Development* 126, 4005-4015, 1999.

Bücher:

FRITSCH H, KÜHNEL W. Taschenatlas der Anatomie, Band 2 Innere Organe 8. Auflage, Thieme, 2003.

HARTMANN M, PABST MA, SCHMIED HC, DOHR G. Zytologie, Histologie und Mikroskopische Anatomie, 3. Auflage, Facultas, 2005.

KLINKE R, SILBERNAGL S. Lehrbuch der Physiologie, 4. Auflage, Thieme, 2003.

SADLER TW. Medizinische Embryologie, 9. Auflage, Thieme, 1998.

Bücher im WWW:

BIARD JM Fetal Pulmonary Hypoplasia, UCL Presses Universitaires de Louvain, 2010.

Letzer Aufruf am 8.10.2011

DORR RT & VON HOFF DD. Cancer Chemotherapy Handbook, 2. Auflage Appleton& Lange, 1994.

Letzer Aufruf am 15.1.2012

LEROITH D., ZUMKELLER W., BAXTER RC. Insulin-like Growth Factors, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003.

Letzer Aufruf am 21.9.2011

ROBERTS CT (JR), ROSENFELD RG. The IGF System: Molecular Biology, Physiology and Clinical Applications, Human Press, 1999.

Letzer Aufruf am 23.9.2011

SCHITTNY JC & BURRI PH. Development and Growth of the Lung
In: A.P. Fishman, J.A. Elias, J.A. Fishman, M.A. Grippi, R.M. Senior, and
A.I. Pack. Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders, 4 edition,
McGraw-Hill Medical, New York, chapter 5, 91-114, 2008.
Letzter Aufruf am 29.11.2009

THURLBECK WM, CHUNG A. Thurlbeck's Pathology of the Lung, Third Edition,
Thieme, 2005.
Letzter Aufruf am 23.9.2011

Onlinequellen im WWW:

www99.mhhannover.de/institute/tierlabor/vorlesungen/appl_II.pdf
Letzter Aufruf am 15.1.2012

www.embryology.ch Letzter Aufruf am 11.10.2011

www.gv-solas.de/auss/tie/index.html Letzter Aufruf am 15.1.2012

www.ihcworld.com/_protocols/washing_buffers/tbs.htm
Letzter Aufruf am 4.7.2011

www.rdssyndrome.com Letzter Aufruf am 24.9.2011

www.wissen.de Letzter Aufruf am 12.11.2011

