

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Professor Dr. med. Dr. sci. nat. C. Klein

**Wirkung der pro-inflammatorischen Zytokine auf die  
mesenchymalen Stromazellen aus dem  
Trachealsekret von extrem kleinen Frühgeborenen**

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

vorgelegt von  
Susanne Christina Maria Ganss, geb. Häffner  
aus München

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	PD. Dr. med. Harald Ehrhardt
Mitberichterstatter:	PD. Dr. Dr. Nikolaus Kneidinger Prof. Dr. Dr. Christian Sommerhoff
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	14.06.2018

# Meinen Eltern



## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Die bronchopulmonale Dysplasie des Frühgeborenen .....	1
1.1.1. Definition, Ätiologie und klinisches Erscheinungsbild .....	1
1.1.2. Epidemiologie der bronchopulmonalen Dysplasie .....	4
1.2. Störung der Lungenentwicklung als histologisches Korrelat der BPD .....	5
1.2.1. Phasen und zentrale Mechanismen der physiologischen Lungenentwicklung .	5
1.2.2. Pathomechanistisches Verständnis der bronchopulmonalen Dysplasie .....	8
1.2.3. Dysbalance der anti- und pro-inflammatorischen Zytokine und Wachstumsfaktoren als Konsequenz der pulmonalen Inflamationsreaktion.....	10
1.2.3.1. Anti-inflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren in der Entstehung der BPD.....	12
1.2.3.2. Die Rolle der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8 ....	14
1.2.3.3. Die Rolle des Transforming Growth Factors - beta1 in der Pathogenese der BPD.....	17
1.2.4. Die besondere Rolle der MSCs in der Entstehung der BPD.....	20
<b>2. Zielsetzung der Doktorarbeit</b> .....	<b>25</b>
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>27</b>
3.1. Material .....	27
3.1.1. Chemikalien und Reagenzien .....	27
3.1.2. Verbrauchsmaterialien .....	28
3.1.3. Laborgeräte und Software.....	29
3.1.4. Puffer und andere Lösungen.....	29
3.1.5. Stimulanzen/Zytokine .....	30
3.1.6. Oligonukleotide .....	31
3.1.7. Antikörper zur Immundetektion .....	31
3.2. Methoden .....	33
3.2.1. Ethikvotum und Patientenkohorte .....	33
3.2.2. Zellkultur.....	33
3.2.2.1. Isolierung von MSCs aus dem Trachealsekret Frühgeborener.....	33
3.2.2.2. Kultur und Splitten von MSCs .....	36

3.2.2.3.	Einfrieren und Auftauen von MSCs.....	37
3.2.2.4.	Bestimmung der Zellzahl und Aussäen von MSCs .....	38
3.2.3.	Aufbau eines standardisierten Experiments.....	38
3.2.4.	Bestimmung des Wachstums der MSCs mittels repetitiver automatisierter Lichtmikroskopie .....	40
3.2.5.	Bestimmung des Wachstums der MSCs mittels elektronischer Impedanzmessung.....	42
3.2.6.	Bestimmung der Apoptoserate mittels Durchflusszytometrie.....	44
3.2.7.	Proteinbiochemie – Western Blot.....	45
3.2.7.1.	Herstellung von Zelllysaten .....	45
3.2.7.2.	Protein SDS-PAGE .....	46
3.2.7.3.	Wet Blot.....	47
3.2.7.4.	Immundetektion und Quantifizierung der Proteinmenge.....	48
3.2.8.	Transfektion der MSCs mittels RNA Interferenz .....	51
3.2.9.	Statistische Methoden.....	53
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>54</b>
4.1.	Einfluss der BPD-assoziierten Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 und TGF- $\beta$ 1 auf die phänotypischen Eigenschaften von MSCs aus dem Trachealsekret Frühgeborener .....	54
4.1.1.	Einfluss von IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 und TGF- $\beta$ 1 auf das Apoptose- verhalten von MSCs.....	56
4.1.2.	Einfluss von IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 und TGF- $\beta$ 1 auf das Proliferations- verhalten von MSCs.....	58
4.2.	Einfluss der Zytokine auf die Proteinexpression von MSCs.....	75
4.2.1.	Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B durch IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8.....	75
4.2.2.	Wirkung von IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8 auf das intrazelluläre Protein $\alpha$ -SMA .....	78
4.3.	Hemmung der Proliferation von MSCs im NF $\kappa$ B-Knock-Down-Modell .....	82
4.3.1.	Proliferationsinhibition unstimulierter MSCs im NF $\kappa$ B-Knock-Down-Modell ...	82
4.3.2.	Proliferationsinhibition Zytokin-stimulierter MSCs im NF $\kappa$ B-Knock-Down-Modell.....	86

4.4.	Intrazelluläre Signaltransduktion von TGF- $\beta$ 1 und seine Wirkung auf die Proteinexpression in MSCs .....	91
4.5.	Interaktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8 mit TGF- $\beta$ 1 .....	94
4.5.1.	Effekt der Interaktion auf das Proliferationsverhalten der MSCs .....	95
4.5.2.	Effekt der Interaktion auf die Expression von $\alpha$ -SMA.....	99
4.5.3.	Charakterisierung des Smad-Signalwegs nach Doppelstimulation der MSCs .....	104
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>112</b>
5.1.	Die zentrale Rolle des Nuclear Factor- $\kappa$ B bei Inflammationsprozessen .....	113
5.2.	Vor- und Nachteile des Zellkulturmodells.....	119
5.3.	Ausblick und weiterführende Experimente.....	120
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>124</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>127</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>138</b>
8.1.	Abkürzungsverzeichnis .....	138
8.2.	Danksagung .....	141
8.3.	Eidesstattliche Versicherung.....	142

# 1. Einleitung

## 1.1. Die bronchopulmonale Dysplasie des Frühgeborenen

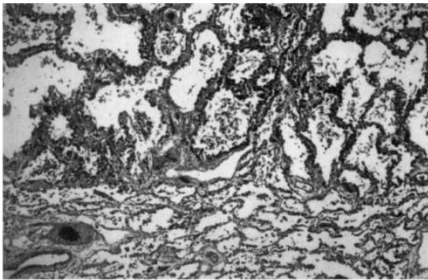
### 1.1.1. Definition, Ätiologie und klinisches Erscheinungsbild

Die bronchopulmonale Dysplasie (BPD) ist eine multifaktoriell bedingte, chronische Lungenerkrankung des Frühgeborenen, die durch eine gestörte Alveolarisierung und Vaskularisierung gekennzeichnet ist und in einer Beeinträchtigung der normalen Lungenentwicklung resultiert (Niedermaier and Hilgendorff 2015). Sie ist die häufigste im Rahmen einer Frühgeburt auftretende Komplikation und betrifft besonders Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht unter 1000g oder einem Gestationsalter unter 30 Schwangerschaftswochen (Jobe and Bancalari 2001, Jobe 2011).

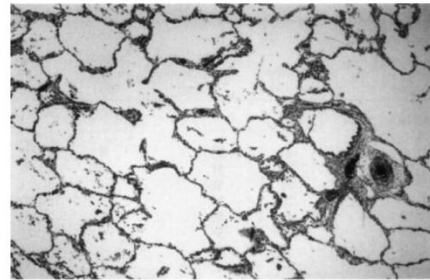
Die bronchopulmonale Dysplasie wurde erstmals 1967 durch Northway als eine Schädigung der Lunge durch Sauerstoff und Beatmung mit nachfolgender Ausbildung einer pulmonalen Inflammationsreaktion mit Lungenödem, Atelektasen, emphysematösen Alveolen, peribronchialer und septaler starker Fibrose, ausgeprägter Metaplasie der Epithelzellen und Hypertrophie glatter Muskelzellen sowohl der Gefäße als auch der Alveolen beschrieben (s. Abbildung 1 A) (Northway, Rosan et al. 1967). Dank des medizinischen Fortschritts, vor allem mit Einführung der pränatalen Glukokortikoidgabe zur Induktion der Lungenreifung, der postnatalen Surfactant-Therapie sowie der Etablierung sanfterer Beatmungsmethoden und dem zurückhaltenderen Umgang mit hohen Sauerstoffkonzentrationen sowie einem dadurch veränderten Patientenkollektiv von heute noch kleineren, überlebenden Frühgeborenen wurde das histopathologische Bild der "alten" BPD durch die sogenannte "neue" BPD ersetzt (Coalson 2003). Diese kennzeichnet sich vor allem durch eine massive pulmonale Inflammationsreaktion mit Wachstumsarrest der Lunge im späten kanalikulären und sakkulären Stadium der Lungenentwicklung, besonders bei Geburt in der 24. - 28. Schwangerschaftswoche (Jobe 1999, Coalson 2003). Durch die inhibierte alveoläre Septierung mit darauffolgender Rarefizierung der Lungen- und Alveolarstruktur und einer diffus im Interstitium verteilten Fibrose (s. Abbildung 1 B) ist der pulmonale Gasaustausch beeinträchtigt (Coalson 2003). Die Kinder sind postnatal über längere Zeit auf eine Sauerstoffsupplementation angewiesen (Greenough 2012).



A) „alte“ BPD



B) „neue“ BPD

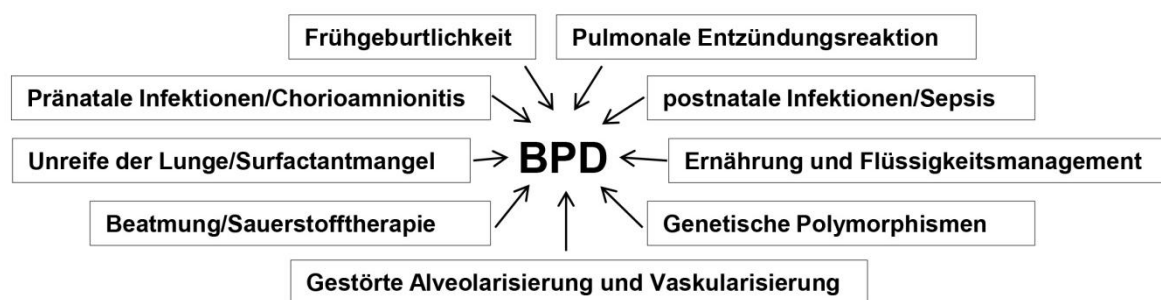


**Abbildung 1:** Histopathologie der bronchopulmonalen Dysplasie aus (Husain, Siddiqui et al. 1998)  
**A)** Gewebeschnitt der Lunge eines Kindes der "Prä-Surfactant Ära" mit den typischen Zeichen der "alten" BPD: Rarefizierung der Alveolen mit massiver Fibrose der Alveolarsepten.  
**B)** Gewebeschnitt der Lunge eines Kindes der "Post-Surfactant Ära" mit den typischen Zeichen der "neuen" BPD: deutlich vereinfachte Struktur der terminalen Atemwege mit erweiterten, überblähten und rarefizierten Alveolargängen, Sacculi und Alveolen durch Inhibition der alveolären Septierung. Die interstitielle Fibrose ist im Vergleich zu A) gering ausgeprägt und diffus im Interstitium verteilt.

Im Jahr 2001 wurde durch A. Jobe und E. Bancalari die bis heute gültige klinische Definition der bronchopulmonalen Dysplasie publiziert: Es leiden alle Kinder an einer bronchopulmonalen Dysplasie, die mindestens 28 Tage auf eine Sauerstoffsupplementation von mehr als 21% angewiesen sind. Die Einteilung des Schweregrades der BPD erfolgt für Frühgeborene unter 32 Schwangerschaftswochen im Alter von 36 p.m. (post menstruationem) Wochen nach ihrem Sauerstoffbedarf. Kinder, die im Alter von 36 p.m. Wochen keinen zusätzlichen Sauerstoff benötigen und Raumluft atmen, haben per definitionem eine milde Form der BPD, wenn sie am 28. Lebenstag noch eine Sauerstoffsupplementierung benötigten. Kinder, die mit korrigiert 36+0 Schwangerschaftswochen weniger als 30% Sauerstoff benötigen, erfüllen die Kriterien einer moderaten Form der BPD. Kinder mit größer oder gleich 30% Sauerstoffbedarf oder der Notwendigkeit der invasiven oder nicht-invasiven Beatmung leiden an einer schweren Form der BPD (Jobe and Bancalari 2001).

Neben der ausgeprägten Unreife der Lunge kleiner Frühgeborener und der daraus resultierenden notwendigen Beatmung und Sauerstoffsupplementation wurden weitere Faktoren identifiziert, die die Entstehung einer bronchopulmonalen Dysplasie begünstigen: Surfactantmangel, ein persistierender Ductus arteriosus mit verstärkter Lungendurchblutung (Speer 2003), unzureichende Protein- und Kalorienzufuhr, übermäßige Flüssigkeitszufuhr im postnatalen Management (Biniwale and Ehrenkranz 2006), männliches Geschlecht (Henderson-Smart, Hutchinson et al. 2006) und genetische Polymorphismen bezüglich der Surfactantbildung (Hilgendorff, Heidinger et al. 2009) sowie die Ausprägung der Immunantwort auf einen Entzündungsreiz (Bose, Dammann et al. 2008) erhöhen die Inzidenz der BPD. Insbesondere spielen prä- und postnatale Infektionen, wie z.B. eine Chorioamnionitis, Atemwegsinfektionen oder eine

Neugeborenenensepsis mit früher Exposition der Lunge mit hohen Konzentrationen an Zytokinen und Entzündungsmediatoren eine große Rolle (Speer 2004). Eine komplexe Entzündungsreaktion mit Einwanderung von Entzündungszellen in die Lunge, Dysregulation anti- und proinflammatorischer Zytokine sowie Inhibition der Synthese multipler Wachstumsfaktoren ist, als Antwort des Organismus auf das Einwirken der vielfältigen Noxen, nach aktueller Ansicht die vornehmliche Ursache der komplexen Lungenschädigung in der Pathogenese der BPD. Sie stellt damit den zentralen Ansatzpunkt der gegenwärtigen Forschung im Verständnis der BPD Entstehung dar (Speer 2003, Niedermaier and Hilgendorff 2015). In untenstehender Graphik sind die wichtigen Einflussfaktoren in der Ätiologie der BPD im Überblick dargestellt.



**Abbildung 2:** Darstellung ätiologischer Faktoren in der Entstehung der BPD modifiziert nach (Gien and Kinsella 2011)

Entsprechend der pulmonalen Schädigung mit einem Missverhältnis zwischen Ventilation und Perfusion aufgrund einer geringeren alveolären Oberfläche und einer gestörten Gefäßbildung präsentiert sich die bronchopulmonale Dysplasie klinisch durch Dyspnoe bzw. Tachypnoe, Einziehungen, Stöhnen, paradoxe Atemmuster, Giemen, grobblasige Rasselgeräusche und eine verminderte Compliance der Lunge. Letztere ist bei besonders schwerer Ausprägung der Erkrankung durch Atelektasen, Emphysem, interstitielle Fibrosierungen und Lungenödembildung bedingt. Dies kann im Röntgen-Thorax typische Veränderungen hervorrufen (Kinsella, Greenough et al. 2006). Die gestörte Gefäßbildung kann in pulmonaler Hypertonie und in besonders schweren Fällen in einem Cor pulmonale resultieren. Die erhöhte Atemfrequenz und flache Atemzüge erhöhen die Totraumventilation und vermindern damit die Effizienz des Gasaustauschs (Kinsella, Greenough et al. 2006). Des Weiteren neigen an BPD erkrankte Kinder zu einer erhöhten Anfälligkeit für pulmonale Infekte, die besonders innerhalb der ersten zwei Lebensjahre immer wieder zu Rehospitalisierungen führen (Ehrenkranz, Walsh et al. 2005).

Wesentlich für die pulmonale Langzeitmorbidity ist die Neigung zur Entwicklung obstruktiver Atemwegserkrankungen, wie Asthma und eine dauerhafte Überreagibilität der Atemwege (Jobe 2011). Bereits in den ersten 28 Lebenstagen weisen Neugeborene, die

eine BPD entwickeln, veränderte Lungenfunktionsparameter mit verminderter funktioneller Residualkapazität und Compliance auf (May, Kennedy et al. 2011). Mit zunehmendem Alter bessert sich in den meisten Fällen die Lungenfunktion und lässt normale körperliche Aktivität zu (Kinsella, Greenough et al. 2006). Die EPICure Studie an ehemaligen Frühgeborenen konnte allerdings zeigen, dass 56% der Kinder, die in bzw. vor der 25. Schwangerschaftswoche geboren worden waren, im Alter von 11 Jahren immer noch pathologische spirometrische Werte aufweisen und 25% dieser Kinder an manifestem Asthma leiden. Die Zahl der an Asthma erkrankten Kinder ist damit doppelt so hoch wie bei ihren reifgeborenen Klassenkameraden (Fawke, Lum et al. 2010). Die pathologischen Lungenfunktionstests sowie in schweren Fällen auch eine symptomatische Atemwegobstruktion persistieren sogar bis ins Erwachsenenalter (Carraro, Filippone et al. 2013, Landry, Tremblay et al. 2015).

Zusätzlich zu ihrer pulmonalen Morbidität weisen viele der die Diagnose BPD erfüllenden Kinder deutliche entwicklungsneurologische Defizite auf. Über 50% haben Konzentrations- und Verhaltensstörungen sowie Sprach- und Gedächtnisprobleme, die besonders im Schulalltag hervortreten (Doyle and Anderson 2009).

### **1.1.2. Epidemiologie der bronchopulmonalen Dysplasie**

Aufgrund verbesserter Behandlungs- und Präventionsmöglichkeiten ist die Mortalität der bronchopulmonalen Dysplasie zurückgegangen (Berger, Bachmann et al. 2004). Die Inzidenz dagegen ist durch das Überleben immer kleinerer Frühgeborener weitgehend unverändert geblieben (Manktelow, Draper et al. 2001). Das vornehmlich betroffene Patientenkollektiv hat sich dementsprechend von Frühgeborenen um die 32 Schwangerschaftswochen (Northway, Rosan et al. 1967) zu immer kleineren und unreiferen Kindern, mit Geburt in der 24. - 26. Schwangerschaftswoche, entsprechend dem Übergang vom kanalikulären in das sakkuläre Stadium der Lungenentwicklung, verschoben (Coalson 2003). Beträgt die Inzidenz der BPD für Überlebende mit einem Gestationsalter zwischen 24 - 26 Wochen 58%, so entwickelten jedoch nur 10% der Überlebenden zwischen 30 - 32 Schwangerschaftswochen per definitionem eine chronische Lungenerkrankung (Jorch 2010).

Neben dem Gestationsalter spielt besonders das Geburtsgewicht eine große Rolle für das Auftreten der BPD. 75% der betroffenen Kinder wogen bei der Geburt unter 1000g. Im Gegensatz dazu waren nur 5% der Kinder mit einem Geburtsgewicht über 1500g betroffen (Kinsella, Greenough et al. 2006). Insgesamt leiden bis zu 30% aller Frühgeborenen mit einem Gestationsalter unter 30 Schwangerschaftswochen an der chronischen Lungenerkrankung BPD (Shahzad, Radajewski et al. 2016).

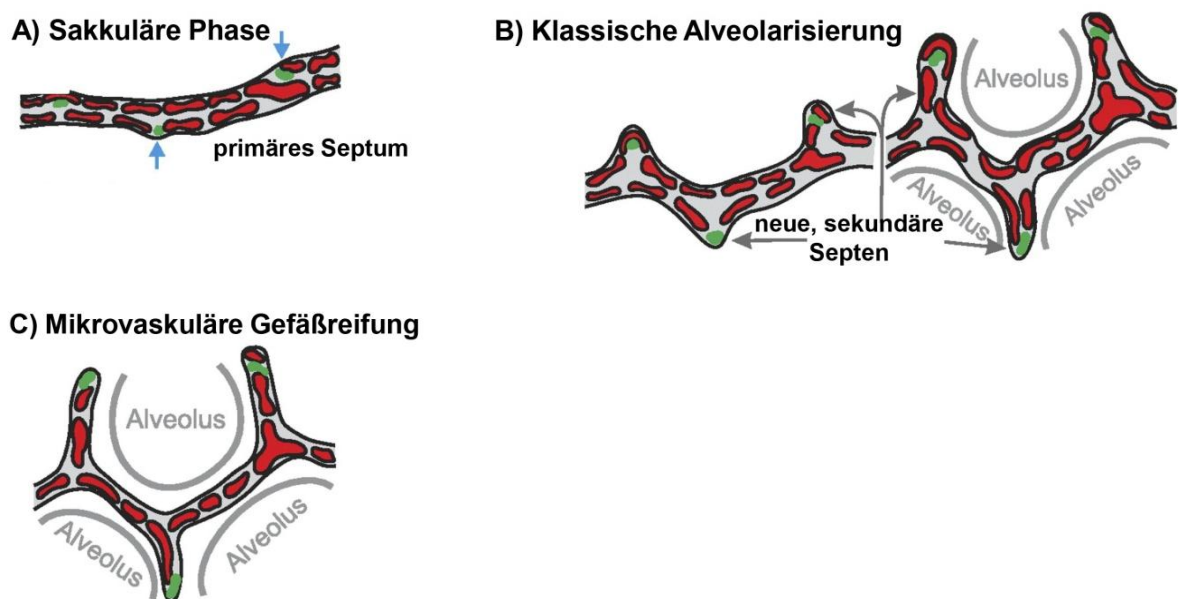
## **1.2. Störung der Lungenentwicklung als histologisches Korrelat der BPD**

### **1.2.1. Phasen und zentrale Mechanismen der physiologischen Lungenentwicklung**

Die bronchopulmonale Dysplasie stellt histologisch eine Wachstumsstörung in der kanalikulären bzw. sakkulären Phase der Lungenentwicklung dar und kennzeichnet sich durch eine gestörte Alveolarisierung, Vaskularisierung und Dysregulation der für die physiologische Lungenentwicklung wesentlichen Wachstumsfaktoren (Coalson 2003, Bose, Dammann et al. 2008). Daher wird nachfolgend, als Grundlage für das pathophysiologische Verständnis der Erkrankung, kurz die regelrechte Entwicklung und Alveolarisierung der Lunge beschrieben.

Nach Organanlage in der Embryonalphase (1. - 7. Woche) folgt während der Fetalzeit (7. Woche bis zur Geburt) die Organreifung in mehreren Stadien (s. Abbildung 4): In der kanalikulären Phase der Lungenentwicklung (16. - 26. Woche) bilden sich, nachdem sich der Bronchialbaum in der pseudoglandulären Phase (7. - 16. Woche) bis zu den terminalen Bronchiolen aufgezweigt hat, die Bronchioli respiratorii und die primären Alveolen. Zusätzlich kommt es zu einer Invasion von Kapillaren in das umgebende Mesenchym. Die kubischen Zellen des Bronchialepithels differenzieren sich zu Surfactant-produzierenden Typ-II-Alveolarepithelzellen und zu flachen, dem Gasaustausch dienenden Typ-I-Alveolarepithelzellen (Burri 1984, Coalson 2003, Sadler 2003). In der sakkulären Entwicklungsphase (24. – 34. Woche) bilden sich immer mehr glattwandige Ausstülpungen, die späteren Sacculi alveolares, die noch durch dicke, primäre Septen mit doppeltem Kapillarnetzwerk voneinander getrennt sind und die Ausgangsbasis für die weitere Alveolarisierung und Oberflächenvergrößerung der Lunge darstellen (Burri 2006). Ab Ende der kanalikulären Phase ist bereits in dem Maß ein Gasaustausch möglich, dass das Überleben von in dieser Phase geborenen Kindern möglich ist. Die Unreife der Lunge führt allerdings häufig zu einem Atemnotsyndrom und erfordert die zusätzliche Gabe von Surfactant und vorübergehend eine unterstützende Beatmung (Sadler 2003). Die Phase der eigentlichen Alveolarisierung beginnt erst in der ca. 34. Schwangerschaftswoche und hält ungefähr bis zum 2. Lebensjahr an (Coalson 2003). In dieser Zeit bildet sich ein Großteil der über 300 Millionen Alveolen der adulten Lunge (bis zu 50 Millionen Alveolen bei Geburt) und die innere Fläche der Lunge, die zum Gasaustausch zur Verfügung steht, vergrößert sich massiv (Burri 2006). Aus den primären Septen der sakkulären Phase beginnen sich zinnenartige Ausstülpungen (engl.: "crests") hervorzuwölben (s. Abbildung 3), die schließlich als "sekundäre Septen" die Kontur der zukünftigen Alveolen markieren (Burri 2006). Die Orte neuer Knospungen werden durch Elastinfaserformationen markiert, die sich anschließend auch in den Spitzen neu entstandener "Crests" befinden (Bourbon, Boucherat et al. 2005). Myofibroblasten, die durch den aus Epithelzellen stammenden

"Platelet-derived Growth Factor-A", PDGF-A, in die Spitzen sich neu bildender "Crests" rekrutiert werden, bilden die Bestandteile der extrazellulären Matrix des Septuminterstitiums, wie Kollagen, Fibronectin, Proteoglykane oder Tropoelastin, das zur Quervernetzung der Elastinfasern dient, und ermöglichen dadurch das Wachstum der Knospen zum vollständigen Septum (Bourbon, Boucherat et al. 2005). Die Proliferation von Myofibroblasten sowie die Elastogenese fördert der "Fibroblast Growth Factor 18", FGF 18, der von Fibroblasten gebildet wird. Diese setzen auch den "Fibroblast Growth Factor 7", FGF 7, frei, der wesentlich die Proliferation und Reifung der Typ-II-Alveolarepithelzellen stimuliert, die als Stammzellen der Typ-I-Alveolarepithelzellen dienen (Bourbon, Boucherat et al. 2005). Kontrolliert wird eine ungerichtete Septierung durch den "Transforming Growth Factor - beta 1", TGF- $\beta$ 1, der lokalen Knospungen und der Epithelzellproliferation entgegen wirkt, jedoch die Synthese der extrazellulären Matrixbestandteile um die Atemwege herum fördert und damit z.B. die Bildung unverzweigter proximaler Atemwege sicherstellt (Desai and Cardoso 2002).



**Abbildung 3:** Ablauf der Alveolarisierung und mikrovaskulären Gefäßreifung aus (Schittny, Mund et al. 2008)

**A)** Darstellung eines dickwandigen, primären Septums mit doppeltem, randständigem Kapillarnetz (rot) und zentralem Interstitium (grau). Die mit Pfeilen markierten grünen Punkte bezeichnen Elastinablagerungen und damit die Orte der zukünftigen Entstehung von Alveolarsepten.

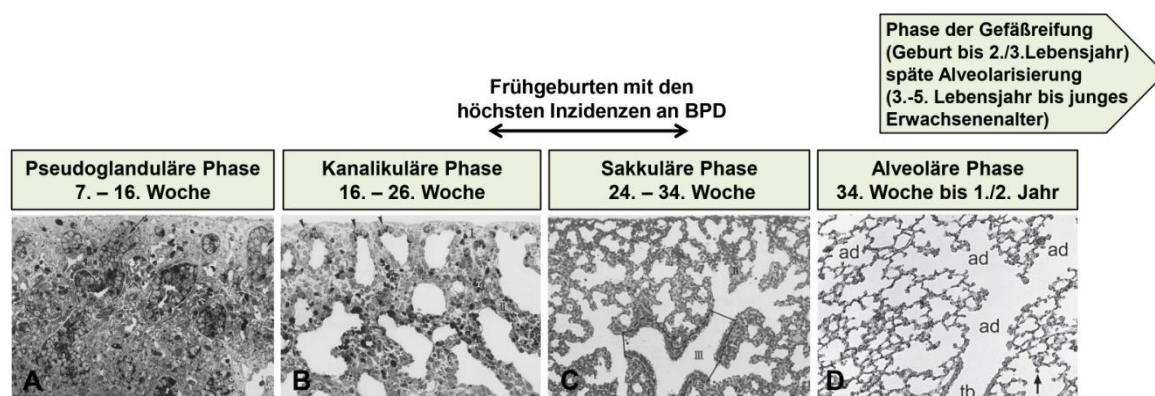
**B)** Zinnenartige Vorwölbungen, die "Crests", werden sichtbar und wachsen durch Ausstülpung eines der beiden Kapillarnetze des primären Septums und durch extrazelluläre Matrix- und Elastinfasersynthese der Fibroblasten zu sekundären Septen heran, die ebenfalls ein doppeltes Gefäßnetz und Elastinablagerungen an der Septumspitze aufweisen. Der vorbestehende Luftraum wird folglich feiner untergliedert und neue Alveolen entstehen.

**C)** Im Zuge der mikrovaskulären Gefäßreifung kommt es zur Fusion der beiden Kapillarnetze und ein einfaches Netz mit zweiseitiger Angrenzung an das Alveolarlumen und ein dünneres Septum entstehen. Funktionelle Vorteile werden hierfür angenommen.

Wie die primären Septen enthalten auch neu entstandene sekundäre Septen ein doppeltes Kapillarnetz, das das mittelständige Interstitium umgibt, an der Septumspitze ineinander übergeht und nach außen einseitig an das Alveolarlumen grenzt (Burri 2006). Essentiell für die mikrovaskuläre Entwicklung der Lunge ist der aus den Epithelzellen stammende "Vascular Endothelial Growth Factor", VEGF, der für die Migration, Proliferation und Differenzierung der Endothelzellen verantwortlich ist (Bourbon, Boucherat et al. 2005). Eine regelrechte Angiogenese ist Grundvoraussetzung für eine ungestörte Alveolarisierung. Störungen der Vaskularisierung führen ebenfalls zu einer beeinträchtigten Septierung (Le Cras, Markham et al. 2002, McGrath-Morrow, Cho et al. 2005).

Parallel zur alveolären Phase findet ab der Geburt in den ersten zwei bis drei Lebensjahren eine mikrovaskuläre Gefäßreifung statt (s. Abbildung 3). Das doppelte Kapillarnetz der sekundären Septen verschmilzt zu einem singulären, mittelständigen Kapillarsystem, das nun beidseitig an das Alveolarlumen angrenzt und typischerweise in der adulten Lunge nachweisbar ist (Burri 2006). Gleichzeitig verdünnen sich die Alveolarsepten durch teilweise Apoptose der Fibroblasten und Reduktion des Interstitiums (Bruce, Honaker et al. 1999). Neue Erkenntnisse zeigen, dass die Bildung weiterer Alveolarsepten bis ins junge Erwachsenenalter anhält (Phase der späten Alveolarisierung) (Schittny, Mund et al. 2008).

Abbildung 4 zeigt eine zusammenfassende Übersicht der pulmonalen Entwicklungsphasen ab der Fetalperiode.



**Abbildung 4:** Übersicht über die Phasen der Lungenentwicklung ab Beginn der Fetalperiode. Histologische Bilder und Einteilung der Stadien der Lungenentwicklung nach P. Burri (Burri and Moschopoulos 1992, Coalson 2003, Burri 2006). Die Lungenreifung stellt hierbei ein Kontinuum dar, bei dem die einzelnen Entwicklungsphasen ineinander übergehen.

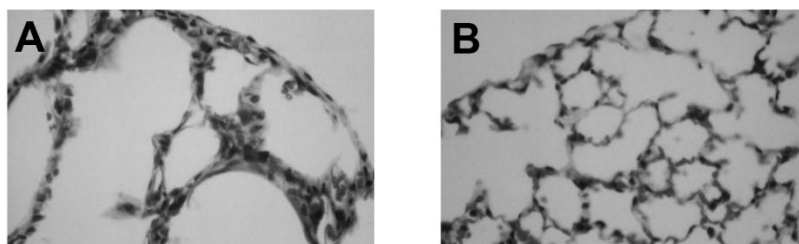
In der **pseudoglandulären Entwicklungsphase** ist der Bronchialbaum bis zu den Bronchioli terminales angelegt. Das Gangsystem wird von kubischem Epithel, den Progenitorzellen der Pneumozyten Typ I und II, ausgekleidet. In der **kanalikulären Phase** bilden sich die Bronchioli respiratorii aus und es kommt zur Einsprossung zahlreicher Gefäße. Das Lumen der Tubuli weitet sich und kubische Typ-II-Alveolarepithelzellen differenzieren zu flachen Typ-I-Alveolarepithelzellen. Die glattwandigen Sacculi werden von Alveolarepithelzellen Typ I und II ausgekleidet. Das Interstitium ist zellreich und der Anteil elastischer Fasern noch gering. Gegen Ende der **sakkulären**

**Phase** beginnen die interstitiellen Fibroblasten extrazelluläre Matrix zu produzieren, ein wichtiger Schritt für weiteres Wachstum und Differenzierung.

Durch massive Bildung von Alveolen in der **alveolären Phase** wird die innere Oberfläche der Lunge stark vergrößert. Im Bild teilt sich ein Bronchiolus terminalis (tb) in mehrere Ductus alveolares (ad), die wiederum von Alveolen umgeben sind. Ausstülpungen (engl. "crests") der Septen eines Sacculus wachsen heran und bilden die Wände neuer Alveolen. Eine immer feinere Struktur der peripheren respiratorischen Anteile der Lunge entsteht.

### 1.2.2. Pathomechanistisches Verständnis der bronchopulmonalen Dysplasie

Nach Erstbeschreibung der bronchopulmonalen Dysplasie als Schädigung der Lunge durch Sauerstoff und Beatmung durch Northway et al. 1967 dauerte es nicht lange, bis dieselben Autoren im Tiermodell ein der BPD von Frühgeborenen ähnelndes Bild nach Exposition von Meerschweinchen mit hohen Sauerstoffkonzentrationen reproduzieren konnten (Northway, Rosan et al. 1969). Seither konnte der schädigende Einfluss von Sauerstoff und seiner reaktiven Radikale sowie verschiedener Beatmungsstrategien in vielen Spezies nachgewiesen werden. Exposition mit 100% Sauerstoff bei neugeborenen Mäusen führte nicht nur zu einer akuten Lungenschädigung mit Ödem, Blutung, nachfolgender chronischer Reparaturphase mit Fibroblastenproliferation und Kollagenablagerung (Bonikos, Bensch et al. 1975), sondern auch zu einer massiven Störung der Lungenstruktur mit Inhibition der Alveolarisierung und Vaskularisierung (Randell, Mercer et al. 1990, Rogers, Tipple et al. 2009, Hilgendorff, Reiss et al. 2014). Auch geringere Sauerstoffkonzentrationen, wie 85% oder 65%, zeigten diesen Effekt, veränderten die Expression von Wachstumsfaktoren und hemmten die Proliferation der Lungenzellen (Warner, Stuart et al. 1998, Dauger, Ferdadji et al. 2003). Das Ausmaß der Lungenschädigung wird im Folgenden am Beispiel von neugeborenen Mäusen demonstriert, die, im Vergleich zur Kontrollgruppe in Raumluft, über 28 Tage 85% Sauerstoff ausgesetzt wurden. Eine deutlich gestörte Lungenarchitektur mit Rarefizierung der Alveolen, Überblähung der terminalen Atemwege und interstitieller Fibrose ist erkennbar (s. Abbildung 5). Auch ein deutlicher Anstieg an Entzündungszellen und eine erhöhte Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen wurde beobachtet (Warner, Stuart et al. 1998).



**Abbildung 5:** aus Warner, Stuart et al. 1998

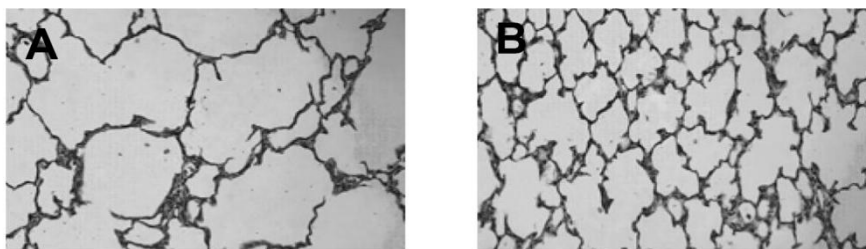
**A)** nach 28-tägiger Exposition mit 85% Sauerstoff zeigten sich im Mausmodell deutlich rarefizierte, vergrößerte und überblähte Alveolen mit interstitieller Fibrose

**B)** Darstellung einer normal entwickelten Lunge nach 28-tägiger Tierhaltung in Raumluft bei identischer mikroskopischer Vergrößerung.

Neben der Sauerstoffkonzentration haben auch die Dauer der Beatmung und die Wahl des Beatmungsmodus nachhaltigen Einfluss auf die Lungenentwicklung. In tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass nicht der Beatmungsdruck (Barotrauma), sondern das Volumen, mit dem beatmet wird, die vorherrschende Rolle in der Schädigung der Lunge spielt. Bereits einzelne hohe Tidalvolumina (Volutrauma) führen hierbei zu bleibenden Schäden (Bjorklund, Ingimarsson et al. 1997). Kollabieren die Alveolen endexpiratorisch und müssen sie bei jeder Inspiration neu rekrutiert werden, ist die Schädigung besonders groß (Atelektotrauma) (Schmolzer, Te Pas et al. 2008).

Der medizinische Fortschritt mit heutzutage zurückhaltenderem Umgang mit hohen Sauerstoffkonzentrationen, pränataler Steroidgabe zur Induktion der Lungenreife, Surfactantgabe zur Reduktion der Oberflächenspannung und die Entwicklung schonenderer Beatmungsstrategien mit möglichst niedrigen Tidalvolumina und PEEP Anwendung zur Vermeidung des endexpiratorischen Kollaps der terminalen Atemwege hat das Überleben von kleineren Frühgeborenen mit noch unreiferen Lungen ermöglicht. Dies führte zum Ersatz der "alten" BPD durch die "neue" BPD mit veränderter Histologie und z.T. milderer klinischer Symptomatik (Coalson 2003). Trotzdem konnte der negative Einfluss auch milder Beatmungsformen auf die sich entwickelnde Lunge nicht behoben werden:

Bereits eine 24-stündige Beatmung von Ratten mit Raumluft ohne zusätzliche Sauerstoffsupplementation und Einsatz moderater Tidalvolumina führte zu einer massiven Schädigung der Lunge mit komplettem Arrest der Zellproliferation, des Zellzyklus und damit der Alveolarisierung (s. Abb. 6) (Kroon, Wang et al. 2011).



**Abbildung 6:** aus (Kroon, Wang et al. 2011)

**A)** Nach 24-stündiger Beatmung mit Raumluft ist im Lungengewebe neugeborener Ratten eine deutliche Rarefizierung der Alveolen zu sehen. Nähere Untersuchungen ergaben eine verminderte Anzahl Elastin-positiver "Crests" und eine vollständige Inhibition der Zellproliferation, entsprechend einem Wachstumsarrest der Lunge.

**B)** Bild einer normal entwickelten Lunge von nicht beatmeten Kontrollratten mit feiner Aufgliederung der terminalen Atemwege.



Nach 24-stündiger Beatmung von neugeborenen Mäusen mit Raumluft konnte in einer weiteren Studie nicht nur eine Reduktion der Anzahl an Alveolen und der endothelialen Oberfläche um 50% nachgewiesen werden, sondern auch eine fünffach erhöhte Apoptoserate der Lungenzellen, eine massive Aktivierung des TGF- $\beta$ 1 Signalweges, eine Verminderung des VEGF - Rezeptorproteins 2 und eine um die Hälfte vermehrte Ablagerung von Elastin in den Alveolarsepten, jedoch mit willkürlicher Verteilung über das ganze Septum, anstatt mit Schwerpunkt an der Septumspitze (Mokres, Parai et al. 2010). Ebenfalls konnte bereits mehrfach kurz nach Beatmungsbeginn eine signifikant erhöhte Zahl von Entzündungszellen, v.a. von neutrophilen Granulozyten, und von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 und IL-1 $\beta$ , im Lungengewebe und im Trachealsekret nachgewiesen werden (Coalson, Winter et al. 1999, Naik, Kallapur et al. 2001, Speer 2009). Dies legt einen komplexen Schädigungsmechanismus mit Dysregulation der Zellproliferation, wichtiger Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren nahe, der u.a. durch Beatmung und Sauerstoff initiiert werden kann und zur BPD-typischen Störung der Lungenstruktur führt.

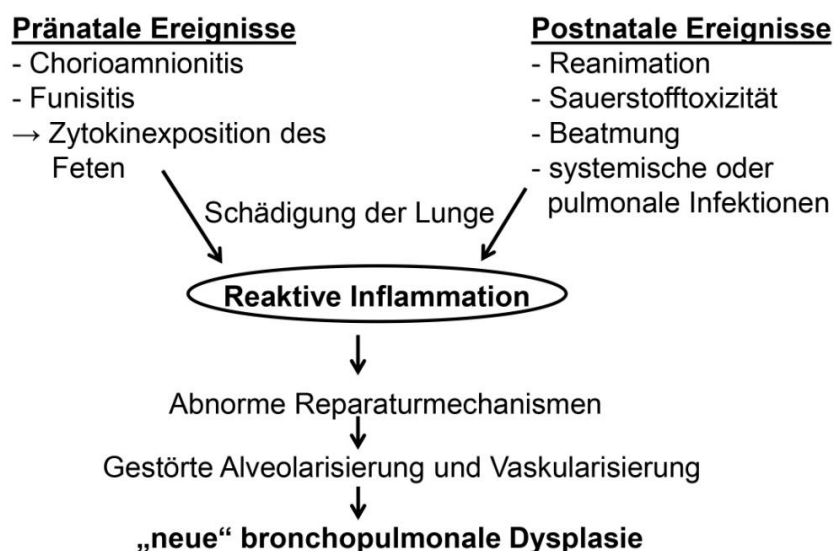
### **1.2.3. Dysbalance der anti- und pro-inflammatorischen Zytokine und Wachstumsfaktoren als Konsequenz der pulmonalen Inflammationsreaktion**

Die Schlüsselreaktion in der Pathogenese der bronchopulmonalen Dysplasie stellt nach aktuellem Konsens der Literatur die Inflammationsreaktion in der Lunge Frühgeborener dar. Verschiedene prä- und postnatale Risikofaktoren, wie z.B. mechanische Beatmung und Sauerstofftoxizität (s. Abbildungen 2 und 7) lösen additiv oder synergistisch eine die Lungenstruktur schädigende Entzündungsantwort aus (Speer 2006). Kennzeichnend für diese ist ein massiver Einstrom von Neutrophilen und Makrophagen in die Lunge, ein Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Faktoren zugunsten einer übermäßigen Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  und ein Missverhältnis zwischen gewebeschädigenden Proteasen und ihren Inhibitoren (Speer 2006, Shahzad, Radajewski et al. 2016). Sowohl im Trachealsekret von Kindern mit sich entwickelnder BPD als auch im Trachealsekret sowie im Lungengewebe (Post Mortem Studien) von Kindern mit manifester BPD ist die Anzahl an Makrophagen, Neutrophilen, Adhäsionsmolekülen, die die Extravasation der Entzündungszellen ermöglichen, sowie die Expression der Chemokine und pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  deutlich erhöht, verglichen mit Kindern, die sich von einem postnatalen Atemnotsyndrom folgenlos ohne Entwicklung einer BPD erholen (Groneck and Speer 1995, Kotecha 1996, Speer 2006, Bose, Dammann et al. 2008).

Im Rahmen einer einmal initiierten Entzündungskaskade setzen Neutrophile und Makrophagen, die durch Faktoren wie IL-8, TNF- $\alpha$ , Leukotrien B<sub>4</sub>, C5a oder IL-16 bereits innerhalb von Minuten nach Beginn einer mechanischen Beatmung in die Lunge rekrutiert werden, eine Vielzahl von gewebschädigenden Stoffen, wie reaktive Sauerstoffmetabolite, Radikale, pro-inflammatorische Zytokine und Proteasen, frei (Speer 2006). Die sehr potente Elastase aus Neutrophilen baut das pulmonale Elastin ab und fördert damit die Entstehung eines Lungenemphysems. Ihr natürlicher Antagonist, der  $\alpha_1$ -Proteinase-Inhibitor, zeigt nur niedrige Aktivität, da er durch reaktive Sauerstoffmetabolite und Radikale aus Neutrophilen und Makrophagen oder durch therapeutische Sauerstoffsupplementation oxidiert und, aufgrund der Unreife der Antioxidationsysteme Frühgeborener, vermehrt abgebaut wird (Speer 2006, Speer 2009). Oxidativer Stress erhöht außerdem die Expression weiterer Matrix-Metalloproteinasen mit Abbau der extrazellulären Matrix des Lungenparenchyms, schädigt aber auch das Gefäßendothel mit nachfolgender Permeabilitätserhöhung und Entstehung eines Lungenödems (Speer 2003).

Die inflammatorisch bedingte Gewebeschädigung der Lunge induziert Reparaturmechanismen, die, u.a durch vermehrte Expression des Transforming Growth Factors -  $\beta$ 1 (s. 1.2.3.3.), die Entzündungsreaktion eindämmen sollen. Übermäßige Reparatur bedingt jedoch ihrerseits wiederum eine Schädigung der Lunge mit Wachstumsarrest und Förderung einer Fibrose (Bose, Dammann et al. 2008).

Ein Überblick über den pathogenetischen Ablauf der BPD und ihrer Auslöser wird in Abbildung 7 gegeben. Die wesentlich an der Inflammationsreaktion und den Reparaturmechanismen beteiligten Faktoren werden in nachfolgenden Punkten näher charakterisiert.



**Abbildung 7:** Ätiologie und Pathogenese der bronchopulmonalen Dysplasie nach (Speer 2006)

### 1.2.3.1. Anti-inflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren in der Entstehung der BPD

Klinische und experimentelle Daten zeigen überzeugend, dass die überschießende Entzündungsantwort mit massiv erhöhten Konzentrationen an pro-inflammatorischen Zytokinen und verstärkter Expression ihrer mRNA in Lungengewebe und Trachealsekret Frühgeborener (Speer 2006) von dem Unvermögen des unreifen Organismus begleitet wird, die anti-inflammatorischen Zytokine IL-4, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-18 oder IL-1-Rezeptorantagonisten in angemessenem Ausmaß zu bilden, um die Entzündungsreaktion zu kontrollieren (Speer 2009). IL-4 beispielsweise, das über eine verstärkte Degradierung der mRNA pro-inflammatorischer Zytokine deren Expression hemmt (Wang, Wu et al. 1995), ist ebenso wie IL-13 im Trachealsekret Frühgeborener nur in sehr niedrigen Konzentrationen vorhanden (Baier, Loggins et al. 2003). Auch IL-10, das über Inhibition des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B die Bildung der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 unterdrückt (Wang, Wu et al. 1995), kann nur im Trachealsekret Reifgeborener, aber gewöhnlicherweise nicht, oder nur sehr schwer, im Trachealsekret Frühgeborener nachgewiesen werden (Jones, Cayabyab et al. 1996). Grund für den Mangel scheint eine Synthesestörung im Makrophagen/Monozyten-System zu sein, das bei Reifgeborenen wesentlich höhere Mengen an IL-10 bildet als bei Frühgeborenen. Bei Frühgeborenen setzt es jedoch große Mengen an TNF- $\alpha$  frei, verschiebt damit das Zytokinungleichgewicht zur Seite der Inflammation und unterstützt damit das Risiko einer BPD Entstehung (Blahnik, Ramanathan et al. 2001). Die In-vitro Zugabe von IL-10 zu Entzündungszellen Frühgeborener führt zu einem Abfall der Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$  und IL-8 (Kwong, Jones et al. 1998). Der Signalweg von IL-10 ist folglich auch bei Frühgeborenen intakt. Der zusätzliche Mangel an anti-inflammatorischen Zytokinen verstärkt das Ungleichgewicht der Zytokine im Inflamationsprozess der BPD.

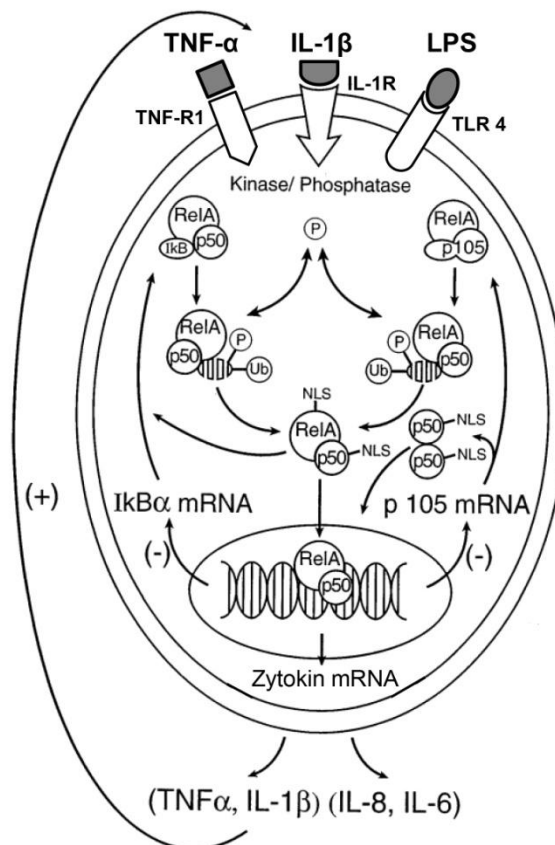
Unter 1.2.1. wurden bereits die physiologischen Funktionen wesentlicher Wachstumsfaktoren für die regelrechte Lungenentwicklung besprochen. Im PDGF-A Knockout-Modell kommt es durch ein komplettes Fehlen PDGF-A positiver Zellen zu einem vollständigen Versagen der Alveogenese mit einem Mangel an glatten Muskelzellen und Elastinfasern sowie einer ausgeprägten Emphysembildung. PDGF-A-positive Zellen stellen daher wahrscheinlich die Vorläuferzellen der alveolaren, SMA ("Smooth Muscle Actin") -positiven Myofibroblasten dar, die für die regelrechte Bildung und Ablagerung des Elastins in der Alveogenese zuständig sind (Lindahl, Karlsson et al. 1997). Morphometrische post mortem Studien von an BPD erkrankten Kindern zeigen abnorme Elastinablagerungen in den Alveolarsepten mit verdickten und irregulär verteilten

Fasern (Margraf, Tomashefski et al. 1991). Im Tiermodell konnte nach Beginn einer mechanischen Beatmung von neugeborenen Mäusen mit 40% Sauerstoff nicht nur eine gestörte Elastinablagerung und eine erhöhte Aktivität der Neutrophilenelelastase nachgewiesen werden, sondern auch eine deutlich verminderte Expression von PDGF-A (Bland, Mokres et al. 2007). Dementsprechend weisen mesenchymale Stromazellen (MSCs), die zu Myofibroblasten differenzieren können, aus dem Trachealsekret von an BPD erkrankten Kindern eine verminderte PDGF-Rezeptor Expression auf als MSCs von Kindern, die keine BPD entwickelten (Popova, Bentley et al. 2014). Eine Überexpression von PDGF-A führt dagegen zu Fibrose (Hoyle, Li et al. 1999) und durch Proliferationsstimulation vaskulärer, glatter Muskelzellen zu pulmonaler Hypertonie (Schermyly, Dony et al. 2005).

Kennzeichnend für die BPD ist ebenfalls eine gestörte Vaskularisierung mit dysmorphen, stark verminderten und abnorm verteilten Gefäßen (Bhatt, Pryhuber et al. 2001). Die Expression des Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF, wird in utero sauerstoffabhängig durch den Hypoxia Inducible Factor HIF reguliert. Durch die intrauterin relativ niedrige Sauerstoffkonzentration ist die HIF-Expression und damit auch die VEGF-Expression hoch. Nach der Geburt sinkt durch die extrauterin vergleichsweise hohe Sauerstoffkonzentration die HIF- und nachfolgend auch die VEGF-Expression. Dieser Effekt wird durch zusätzliche Sauerstoffsupplementation bei beatmeten Frühgeborenen verstärkt (Jorch 2010). Im Tiermodell mit 95% Hyperoxie induzierter BPD, ebenso wie nach Start einer mechanischen Beatmung mit 40% Sauerstoff zeigt sich die Expression des VEGF und seines Rezeptors stark reduziert mit assoziierter, verminderter Angiogenese und gestörter Alveolarisierung (Thebaud, Ladha et al. 2005, Bland, Mokres et al. 2007). Eine pharmakologische oder genetische VEGF Inhibition resultiert neben einer stark verminderten Zahl an Kapillaren auch in einer signifikant reduzierten Entwicklung der Atemwege mit unterentwickelten, großen Alveolen, was eine Interaktion beider Vorgänge nahelegt (Jakkula, Le Cras et al. 2000, Galambos, Ng et al. 2002). Diese Erkenntnisse sowie die Vermutung, dass der VEGF wahrscheinlich ebenfalls zur Lungenreifung und Surfactant-Produktion beiträgt (Speer 2006) und die Tatsache, dass VEGF im Trachealsekret von Frühgeborenen, die eine BPD entwickeln, stark vermindert ist (Lassus, Ristimaki et al. 1999, Bhatt, Pryhuber et al. 2001), macht therapeutisch eine verstärkte Expression interessant. Die Gabe von rekombinantem VEGF sowie eine adenovirusvermittelte VEGF Gentherapie nach Hyperoxie-Exposition fördert im Tiermodell nicht nur die Angiogenese, sondern auch die Alveolarisierung und das Gesamtüberleben (Kunig, Balasubramaniam et al. 2005, Thebaud, Ladha et al. 2005).

### 1.2.3.2. Die Rolle der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8

Zentrale Botenstoffe im Ablauf der Inflammation und in der Bestimmung des Ausmaßes der Lungenschädigung sind die pro-inflammatorischen Zytokine, die in überschießenden Mengen ohne adäquate Gegenregulation durch die anti-inflammatorischen Zytokine gebildet werden (Speer 2009). Zu den wichtigsten und bestuntersuchten pro-inflammatorischen Zytokinen zählen Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) und der Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) (Bose, Dammann et al. 2008). Ihre Konzentration ist im Trachealsekret von Kindern mit Atemnotsyndrom, die nachfolgend eine BPD entwickeln, erhöht. Die Höhe ihrer Konzentration im Trachealsekret korreliert direkt mit der Dauer eines zusätzlichen Sauerstoffbedarfs und der mechanischen Beatmung (Jonsson, Tullus et al. 1997), aber auch ihre systemisch im Blut zirkulierende Menge korreliert direkt mit dem Risiko, an BPD zu erkranken (Ambalavanan, Carlo et al. 2009). Die pro-inflammatorischen Zytokine werden vor Ort von in die Lunge rekrutierten Neutrophilen und Makrophagen, aber auch von Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen nach Exposition dieser Zellen mit Endotoxinen, Hyperoxie, Baro- und Volutrauma und bakteriellen Zellwandbestandteilen, wie Lipopolysacchariden, gebildet (Speer 2006, Bose, Dammann et al. 2008). Ausschlaggebend für die Zytokinsynthese ist hierbei der "Nuclear Factor- $\kappa$ B" - Signalweg. NF $\kappa$ B ist ein heterodimeres Protein, das aus einer p50 Einheit und einer transkriptionsaktivierenden p65 (= RelA) Einheit besteht. Als Transkriptionsfaktor ist NF $\kappa$ B maßgeblich für die Synthese von Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmolekülen, Immunrezeptoren und Akute-Phase-Proteinen, aber v.a. auch für die Bildung der vier pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8 verantwortlich. In einer positiven Feedback-Schleife verstärken IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  über eine vermehrte NF $\kappa$ B Aktivierung ihre eigene Bildung, sowie die von IL-6 und IL-8 (s. Abbildung 8) (Blackwell and Christman 1997). Neben den pro-inflammatorischen Zytokinen ist im Trachealsekret von an BPD erkrankten Kindern auch der Nuclear Factor- $\kappa$ B erhöht (Bourbia, Cruz et al. 2006).



**Abbildung 8:** Darstellung des kanonischen "Nuclear Factor- $\kappa$ B" - Signalwegs, modifiziert nach (Blackwell and Christman 1997)

NF $\kappa$ B (RelA/p50) ist ein Transkriptionsfaktor, der über die Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8 und anderer inflammatorischer Mediatoren wesentlich an der Pathogenese entzündlicher Erkrankungen, wie der bronchopulmonalen Dysplasie des Frühgeborenen, des Atemnotsyndroms ARDS des Erwachsenen, Asthma, Sepsis oder auch der rheumatoiden Arthritis beteiligt ist. Bakterielle Endotoxine (LPS = Lipopolysaccharide) aktivieren bei Chorioamnionitis oder postnatalen Infektionen über die Stimulation von Toll-like Rezeptoren (TLR) des angeborenen, unspezifischen Immunsystems den NF $\kappa$ B Signalweg und erhöhen damit die Zytokinexpression und das BPD Risiko. TNF- $\alpha$  bindet an den TNF-Rezeptor 1 (TNF-R1), IL-1 $\beta$  an den IL-1-Rezeptor (IL-1R). Die Rezeptorbindung induziert über Phosphorylierung und Ubiquitinierung (Ub) der inhibitorischen Einheiten I $\kappa$ B- $\alpha$  und p105 im Zytosol deren Abbau und bewirkt damit die Exposition des nukleären Lokalisationssignals NLS der p50 und RelA Einheit von NF $\kappa$ B. Dieser wandert in den Zellkern und initiiert dort über Bindung an spezifische Promotoren die Transkription verschiedener Gene, u.a. die der pro-inflammatorischen Zytokine, die nach Translation der mRNA von der Zelle freigesetzt werden und lokal ihre Bildung wiederum verstärken können. In einer negativen Feedback-Schleife werden die Inhibitoren I $\kappa$ B- $\alpha$  und p105 gebildet, die eine übermäßige Aktivierung von NF $\kappa$ B verhindern (Blackwell and Christman 1997).

In Überexpressionsmodellen der einzelnen Zytokine verursachten diese komplexe Inflammationsreaktionen mit massiver Störung der Lungenstruktur und -entwicklung. In transgenen Mäusen bewirkte die Überexpression von IL-1 $\beta$  eine BPD-ähnliche Störung der Lungenentwicklung mit Induktion der Chemokinsynthese, massivem Einstrom von Neutrophilen und Monozyten in die Lunge, abnormer Elastinablagerung, Hyperplasie der bronchialen, glatten Muskulatur und gestörter alveolarer Septierung mit respiratorischer Insuffizienz. Ebenso inhibierte IL-1 $\beta$  die Bildung von VEGF und führte damit zu einer

abnormen Kapillarentwicklung (Bry, Whitsett et al. 2007). TNF- $\alpha$  bewirkte nach Überexpression ebenfalls eine schwere pulmonale Inflammationsreaktion mit hohen Zahlen an Neutrophilen, Makrophagen und Lymphozyten, sowie einer deutlichen Fibroblastenakkumulation mit extrazellulärer Matrix-Synthese und Fibrose (Sime, Marr et al. 1998). IL-6, das seine Wirkung v.a. über den Glykoprotein-130 gekoppelten IL-6 Rezeptor und die Aktivierung des Januskinase gekoppelten STAT (engl.: "signal transducer and activator of transcription") - Signalwegs entfaltet (Heinrich, Behrmann et al. 2003), ist ein wichtiger Initiator der Akute-Phase-Reaktion im Inflammationsprozess (Heinrich, Castell et al. 1990). Im Überexpressionsmodell an transgenen Mäusen führte IL-6 zu einem lymphozytären, pulmonalen Infiltrat mit zahlenmäßig verringerten, jedoch vergrößerten Alveolen (DiCosmo, Geba et al. 1994). IL-8, das über die G-Protein gekoppelten Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 wirkt, dient als potentes Chemokin zur Neutrophilenrekrutierung (Mukaida 2003). Beide Zytokine, IL-6 und IL-8, besitzen jedoch auch, entsprechend TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , die Fähigkeit den NF $\kappa$ B Signalweg zu aktivieren (Wang, Walia et al. 2003, Manna and Ramesh 2005).

Neben den Zytokin-spezifischen Effekten ist auf die komplexe Interaktion der Zytokine untereinander und ihre gegenseitige Syntheseinduktion zu achten, die die Abgrenzbarkeit der Effekte und Zuordnung zu einem bestimmten Zytokin erschwert. Die Überexpression von IL-1 $\beta$  in Ratten wurde beispielsweise von einem Anstieg von IL-6 und TNF- $\alpha$  begleitet. Ebenso führte die IL-1 $\beta$  induzierte inflammatorische Lungenschädigung zu einem Anstieg an PDGF und TGF- $\beta$ 1 als kompensatorischer Reparaturmechanismus mit massiver Fibrose (Kolb, Margetts et al. 2001). Allen Zytokinen gemeinsam ist, dass sie im Überexpressionsmodell die Entzündungskaskade initiieren und zu einer schweren Schädigung der Lunge führen (DiCosmo, Geba et al. 1994, Sime, Marr et al. 1998, Bry, Whitsett et al. 2007).

Eine Zusammenfassung der Effekte von IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8 stellt Tabelle 1 dar.

Zytokin	Wirkung	Quelle
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Induktion einer komplexen Inflammationsreaktion im Überexpressionsmodell mit gestörter Alveolarisierung und Vaskularisierung der Lunge</li> <li>- Induktion von TNF-<math>\alpha</math>, IL-6, IL-8 und IL-1<math>\beta</math> über den NF<math>\kappa</math>B-Signalweg</li> <li>- vermehrte Synthese des Adhäsionsmoleküls ICAM-1</li> </ul>	<p>(Kolb, Margetts et al. 2001, Bry, Whitsett et al. 2007)</p> <p>(Blackwell and Christman 1997, Schneibel, Fitzpatrick et al. 2013)</p> <p>(Groneck and Speer 1995)</p>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Chemokin zur Neutrophilenrekrutierung</li> <li>- vermehrte Synthese des Adhäsionsmoleküls VCAM-1 und Induktion einer komplexen Inflammationsreaktion im Überexpressions-</li> </ul>	<p>(Speer 2009)</p> <p>(Miyazaki, Araki et al. 1995)</p>

	modell mit Schädigung der Lungenstruktur - Aktivierung von Makrophagen  - Induktion von TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 und IL-1 $\beta$ über den NF $\kappa$ B-Signalweg	(Schneibel, Fitzpatrick et al. 2013)  (Blackwell and Christman 1997)
<b>IL-6</b>	- Induktion einer komplexen Inflammationsreaktion im Überexpressionsmodell mit Störung der Lungenstruktur  - Wichtiger Bestandteil/Initiator der Akute-Phase-Reaktion, Stimulation von Lymphozyten	(DiCosmo, Geba et al. 1994)  (Heinrich, Castell et al. 1990)
<b>IL-8</b>	- Chemotaktische Neutrophilenrekrutierung, $\beta$ -Integrin-Induktion zur Neutrophilendiapedese Neutrophilenaktivierung und Degranulation	(Bose, Dammann et al. 2008) (Speer 2003)

**Tabelle 1:** Wirkung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8

### 1.2.3.3. Die Rolle des Transforming Growth Factors - beta1 in der Pathogenese der BPD

Die starke Inflammationsreaktion in der Entstehung der BPD mit ausgeprägter Schädigung der Lunge induziert im Sinne eines Reparaturmechanismus die Synthese des Transforming Growth Factors - beta1 (TGF- $\beta$ 1), der die Bildung der pro-inflammatorischen Zytokine reduziert und eine Schlüsselrolle im Umbau und bei der Reparatur von Gewebe spielt (Bose, Dammann et al. 2008, Speer 2009).

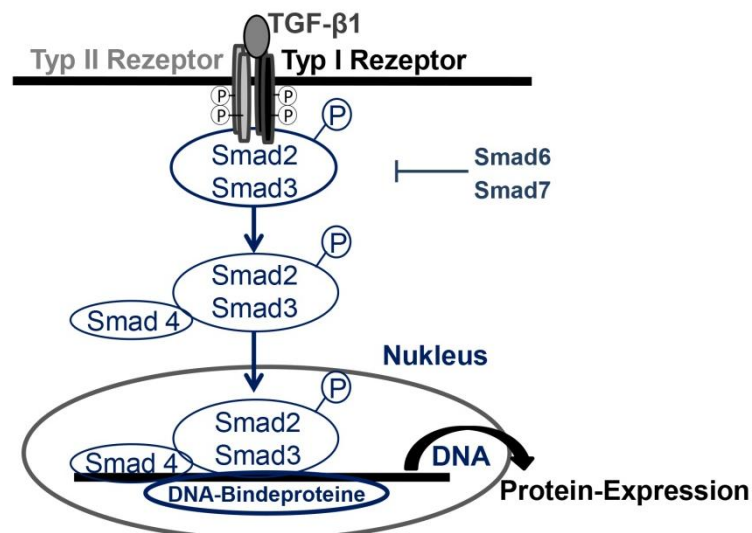
Bereits in der embryonalen Lungenentwicklung sind die 3 Isoformen TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3 des Transforming Growth Factors nicht nur für die Verzweigung der Atemwege, die Zelldifferenzierung, Proliferation und geregelte Apoptose unverzichtbar; sie sind v.a. auch für die Funktion der Fibroblasten und die Synthese extrazellulärer Matrix-Proteine, wie Kollagen Typ I und III verantwortlich (Bartram and Speer 2004). Sowohl die Überexpression des TGF- $\beta$  im Tiermodell als auch die vollständige Blockade seines Signalwegs im Knockoutmodell führten zu einer komplett gestörten Alveolarisierung der Lunge (Gauldie, Galt et al. 2003, Vicencio, Lee et al. 2004, Chen, Sun et al. 2005). Eine ausgeglichene Expression und Signalgebung ist folglich für eine regelrechte Entwicklung notwendig (Morty, Königshoff et al. 2009). In der Lunge des Erwachsenen wird TGF- $\beta$  in niedrigen Mengen exprimiert und ist für die Zellhomöostase und Gewebereparatur mit Wiederherstellung der Parenchymintegrität nach schädigenden Einflüssen zuständig (Bartram and Speer 2004).

Die Entstehung pulmonaler Erkrankungen mit fibrotischer Komponente, wie die BPD des Frühgeborenen, die Sarkoidose, die idiopathische pulmonale Fibrose des Erwachsenen, aber auch die Entstehung emphysematöser Erkrankungen, wie die COPD, basiert auf



einer über längeren Zeitraum bestehenden veränderten Signalgebung der Isoform TGF- $\beta$ 1. All diese Erkrankungen weisen stark erhöhte Konzentrationen von TGF- $\beta$ 1 auf (Bartram and Speer 2004, Morty, Königshoff et al. 2009). Die Isoformen TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3 werden dagegen konstitutiv niedrig exprimiert (Lasky and Brody 2000). Daher konzentriert sich auch die folgende Arbeit auf die Untersuchung der pathomechanistisch bedeutsamen Isoform TGF- $\beta$ 1, die auch im Trachealsekret von Kindern, die eine bronchopulmonale Dysplasie entwickeln, stark erhöht ist und mit dem Schweregrad der Erkrankung korreliert (Kotecha, Wangoo et al. 1996, Lecart, Cayabyab et al. 2000). TGF- $\beta$ 1, als überschießend aktivierter Reparaturmechanismus nach Schädigung der unreifen Lunge durch Inflammation, Sauerstoff und Beatmung, unterstützt die Entstehung des Krankheitsbildes entsprechend den in seinem Überexpressionsmodell präsentierten Folgen mit inhibierter Alveolarisierung und Vaskularisierung sowie interstitieller Fibrose (Gauldie, Galt et al. 2003, Vicencio, Lee et al. 2004). Die negativen Folgen einer übermäßigen TGF- $\beta$ 1 Aktivierung können im Mausmodell durch die präventive Gabe von neutralisierenden Antikörpern deutlich gemildert werden (Nakanishi, Sugiura et al. 2007).

Auf molekularer Ebene entfalten die drei TGF- $\beta$  Isoformen, nach ihrer Bildung in Makrophagen, Alveolarepithelzellen und Fibroblasten, ihre Wirkung über Aktivierung von zwei Rezeptor-Serin/Threonin-Kinasen (Bartram and Speer 2004). TGF- $\beta$  bindet dazu, nach Aktivierung seines Vorläuferpeptides durch chemische Veränderung, proteolytische Spaltung oder Konformationsänderung durch Faktoren wie Thrombospondin, an den Rezeptor II, der daraufhin einen tetrameren Komplex mit dem Rezeptor I bildet (s. Abbildung 9). Die rezeptorgebundenen Proteine Smad2 und Smad3 werden daraufhin vom Rezeptor I phosphoryliert und dissoziieren von diesem. Dies kann durch die inhibitorischen Proteine Smad6 und Smad7 verhindert werden. Im Zytoplasma formen p-Smad2 und p-Smad3 einen heterodimeren Komplex mit Smad4, der in den Zellkern wandert und dort alleine oder in Kombination mit DNA-Bindeproteinen an bestimmte Promotorsequenzen der Zielproteine bindet und deren Transkription reguliert (Piek, Heldin et al. 1999, Bartram and Speer 2004).



**Abbildung 9:** Darstellung des TGF- $\beta$  Signalwegs modifiziert nach (Piek, Heldin et al. 1999, Bartram and Speer 2004)

An den Typ II Rezeptor gebundener Transforming Growth Factor -  $\beta$  führt zur Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase durch Autophosphorylierung. Der daraufhin rekrutierte Typ I Rezeptor, ebenfalls eine Serin/Threonin-Kinase, bildet zusammen mit dem Typ II Rezeptor einen tetrameren Komplex, wird von diesem phosphoryliert und dadurch aktiviert. Der aktivierte Typ I Rezeptor phosphoryliert seinerseits die rezeptorgebundenen Smad2 und Smad3 Proteine, die sich vom Rezeptor lösen und das Signal weitertragen. Im Zytosol bilden p-Smad2 und p-Smad3 einen Komplex mit Smad4, der in den Zellkern wandert. Die Phosphorylierung der rezeptorgebundenen Smad2 und Smad3 Proteine, ihre Komplexbildung mit dem Co-Faktor Smad4 und die nukleäre Translokation können durch die inhibitorischen I-Smads, Smad6 und Smad7, antagonisiert werden. Im Zellkern wird die Transkription verschiedener Gene über eine komplexe Interaktion mit Transkriptionsfaktoren und promotorspezifischen Bindeproteinen reguliert. Typische durch TGF- $\beta$  Stimulation synthetisierte Proteine sind z.B. verschiedene Kollagenarten,  $\alpha$ -Smooth-Muscle-Actin und Fibronectin (Piek, Heldin et al. 1999).

Neben seiner positiven anti-inflammatorischen Wirkung durch Reduktion der Bildung der pro-inflammatorischen Zytokine (Bose, Dammann et al. 2008) ist TGF- $\beta$ 1 in der Pathogenese der BPD als Chemokin für Fibroblasten, potenter Induktor der Kollagensynthese und weiterer extrazellulärer Matrix Proteine, wie Fibronectin, Proteoglykane und Glycosaminoglykane, der wichtigste profibrotische Faktor (Bartram and Speer 2004). Über eine Interaktion und Induktion des PDGF-A Signalwegs, der mitogen und ebenfalls chemotaktisch auf Fibroblasten wirkt, wird der fibrotische Effekt verstärkt (Seifert, Coats et al. 1994). Zusätzlich stimuliert TGF- $\beta$ 1 die Differenzierung von Fibroblasten und mesenchymalen Stromazellen zu Myofibroblasten, steigert die Expression des Myofibroblastenmarkers  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA) und hemmt deren Apoptose (Zhang and Phan 1999, Lasky and Brody 2000, Popova, Bozyk et al. 2010). Ebenfalls reguliert TGF- $\beta$ 1 die Sekretion von Matrix-Metalloproteinasen. Die übermäßige Produktion extrazellulärer Matrix und die Störung des Proteasen - Antiproteasen Gleichgewichts durch die vermehrte TGF- $\beta$ 1 Signalgebung führt zu einer gestörten Matrixablagerung und abnormer Gewebestruktur (Morty, Königshoff et al.

2009). Da eine übermäßige TGF- $\beta$ 1 Aktivität auch die Zelldifferenzierung beeinflusst, antiproliferativ auf Epithelzellen und glatte Muskelzellen wirkt, sowie die Apoptose der surfactantbildenden Typ-II-Alveolarepithelzellen induziert, sind ebenfalls die zellulären Strukturen betroffen. Die alveolare Septierung wird inhibiert und die Lungenentwicklung arretiert (Morty, Königshoff et al. 2009). Das typische Bild der BPD als Resultat der dysregulierten Inflammationsreaktion und Dysbalance der beteiligten Faktoren entsteht (Speer 2006).

#### **1.2.4. Die besondere Rolle der MSCs in der Entstehung der BPD**

In den letzten Jahren gewann in den Studien zur Pathogenese der BPD neben den klassischen Inflammationszellen der Entzündungsreaktion eine Zellentität immer mehr an Bedeutung, die aus dem Trachealsekret Frühgeborener isoliert werden konnte: 2007 beschrieben Henrick et al. die Isolierung "Fibroblasten-ähnlicher Zellen mit mesenchymalem Stammzell-Phänotyp" aus dem Trachealsekret Frühgeborener, deren Präsenz mit der Dauer der Beatmung und des Sauerstoffbedarfs, d.h. mit dem späteren Erfüllen der BPD-Kriterien, korrelierte (Henrick, Keeton et al. 2007). Die Abgrenzung zu mesenchymalen Stammzellen war allerdings aufgrund fehlender Expression von Markern eines differenzierten Zelltyps schwierig (Phan 2008). Mesenchymale Stammzellen sind definiert als unter Standardbedingungen auf Plastik adhärente, fibroblastenähnliche Zellen mit pluripotenter Eigenschaft bezüglich osteogener, chondrogener und adipogener Differenzierung und sind zur vollständigen Selbst-Neubildung fähig. Zusätzlich müssen sie die mesenchymalen Stammzellmarker CD105, CD73 und CD90 tragen. Die hämatopoetischen und epithelialen Marker CD11b, CD34 und CD45 fehlen (Dominici, Le Blanc et al. 2006, Mobius and Thebaud 2015). Diese Eigenschaften bezüglich Differenzierungspotential und Expression der Oberflächenmarker wurden von Henrick et al. auch für die Zellen aus dem Trachealsekret Frühgeborener bestätigt (Henrick, Keeton et al. 2007). In einer weiterführenden Studie dieser Arbeitsgruppe stellte die Isolation dieser Zellen aus dem Trachealsekret Frühgeborener einen negativen Prädiktor für die Entwicklung einer BPD dar. In dieser Arbeit wurden die Zellen als "mesenchymale Stromazellen" bzw. als "mesenchymale Stammzellen mit eingeschränktem Differenzierungspotential" bezeichnet, unter der Annahme einer Entwicklungshierarchie von multipotenten mesenchymalen Stammzellen zu eingeschränkt differenzierungsfähigen Stammzellen, weiter zum differenzierten Fibroblasten (Popova, Bozyk et al. 2010). Aufgrund der großen Heterogenität der Population der mesenchymalen Stammzellen, die auch Zellen beinhaltet, die nicht entsprechend tatsächlicher Stammzellen zur vollständigen Selbst-Neubildung fähig sind, sollte nach

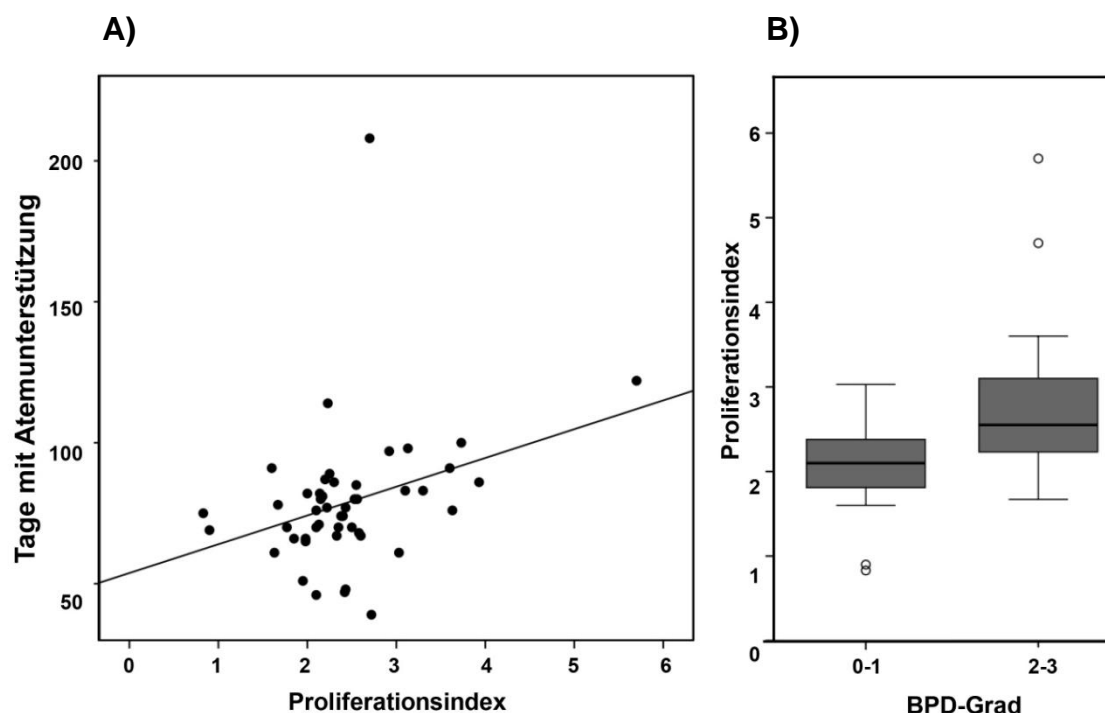
neuesten Erkenntnissen auf die aus dem Trachealsekret isolierte Zellpopulation als "mesenchymale Stromazellen" (MSC; engl.: "mesenchymal stromal cell") Bezug genommen werden (Mobius and Thebaud 2015).

Ebenso problematisch wie die Identität dieser Zellen ist ihre genaue Herkunft und physiologische Funktion zu definieren. Als mögliche Quelle wird das Knochenmark mit Freisetzung von Vorläuferzellen diskutiert, die in die Lunge einwandern und entsprechend den MSCs zu (Myo-) Fibroblasten differenzieren können (Hashimoto, Jin et al. 2004, Lama and Phan 2006, Strieter, Keeley et al. 2009). Zusätzlich können bei Anwesenheit eines Entzündungsreizes, besonders bei Stimulation durch FGF (Fibroblast Growth Factor) und TGF- $\beta$ 1 neue mesenchymale Zellen, Fibroblasten und Myofibroblasten aus Alveolarepithelzellen durch eine Form der Metaplasie namens EMT (engl.: "Epithelial-Mesenchymal Transition") entstehen (Willis, duBois et al. 2006). Nach der traditionellen Ansicht migrieren und proliferieren bereits in der Lunge sesshafte mesenchymale Stamm-, Stroma- und Vorläuferzellen vor Ort und differenzieren zu Fibroblasten und  $\alpha$ -SMA positiven Myofibroblasten (Strieter, Keeley et al. 2009). Diese gehen im Phänotyp kontinuierlich ineinander über und sind durch die Produktion von Kollagen, Fibronectin und v.a. Elastin in den Spitzen der "Crests" maßgeblich an der distalen Knospung der Lunge und der regelrechten Bildung der alveolaren Septen beteiligt (Burri 1984, Bourbon, Boucherat et al. 2005). Diese Theorie wird besonders durch Studien untermauert, die für mesenchymale Stromazellen aus dem Trachealsekret Frühgeborener eine lungenspezifische Genexpression nachweisen konnten (Bozyk, Popova et al. 2011).

Funktionell scheinen die MSCs - aufgrund ihrer Differenzierungsfähigkeit sowohl zu Lipofibroblasten, den Vorläuferzellen der Surfactant-produzierenden Typ-II-Alveolarepithelzellen, als auch, unter TGF- $\beta$ 1 Einfluss, zu  $\alpha$ -SMA positiven Myofibroblasten - wesentlich an Entwicklungs-, Schädigungs- und Regenerationsprozessen der Lunge beteiligt zu sein (Popova, Bozyk et al. 2010, Bozyk, Popova et al. 2011). Interessanterweise werden sowohl zahlreiche Gene, die für eine regelrechte alveoläre Entwicklung notwendig sind, als auch pro-fibrotische Gene exprimiert und pro-inflammatorische Zytokine sezerniert. Die physiologische Rolle der mesenchymalen Stromazellen könnte daher von der differentiellen Translation dieser Gene und ihrer Regulation durch exogene Einflussfaktoren, wie mechanische Beatmung und Sauerstoffsupplementation abhängen (Bozyk, Popova et al. 2011). Eine Dysregulation der MSC Funktion im Rahmen der BPD Pathogenese wird vermutet (Bozyk, Popova et al. 2011, Mobius and Thebaud 2015). Umgekehrt zeigen erste tierexperimentelle Studien im Hyperoxie-induzierten BPD-Modell einen positiven Effekt einer intratrachealen oder intravenösen Applikation exogener MSCs aus gesunden, reifgeborenen Tieren auf das Ausmaß der Lungenschädigung und auf die Lungenentwicklung. Sowohl die präventive

MSC Gabe vor Beginn der Hyperoxie-Exposition als auch die krankheitsbegleitende Gabe resultierte in einer geringeren Lungenschädigung sowie einer besseren Gewearchitektur, Vaskularisierung und alveolären Septierung. Dies unterstützt die Annahme einer Dysfunktion dieses Zelltyps bei an BPD erkrankten Kindern (Mobius and Thebaud 2015).

In unmittelbaren Vorarbeiten dieser Arbeit wurde durch einen medizinischen Doktoranden der eigenen Arbeitsgruppe, Tobias Reicherzer, der Phänotyp der aus dem Trachealsekret Frühgeborener isolierten MSCs, deren Präsenz in vorangehenden Studien als negativer Prädiktor für die Entstehung einer BPD detektiert worden war (Popova, Bozyk et al. 2010), charakterisiert. Das oben genannte CD Muster und das osteogene, chondrogene und adipogene Differenzierungspotential konnte reproduziert und damit der in der Literatur vorbeschriebene Zelltyp isoliert werden (Reicherzer et al. 2010). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass nicht die Präsenz von mesenchymalen Stromazellen im Trachealsekret Frühgeborener ausschlaggebend für die Entwicklung einer BPD ist, sondern der Phänotyp der MSCs, der direkt mit dem Schweregrad der BPD korrelierte (s. Abbildung 10):



**Abbildung 10:**

**A)** Der Proliferationsindex der aus dem Trachealsekret Frühgeborener isolierten mesenchymalen Stromazellen (MSCs) korreliert direkt mit den Tagen invasiver Beatmung. Lineare Regression;  $p < 0,025$ ;  $R^2$  linear = 0,105.

**B)** Der Schweregrad der BPD korreliert in einer Patientenkohorte von  $n = 49$  Kindern direkt mit dem Proliferationsindex (Wachstum zum Zeitpunkt  $t[x]$ /Wachstum zum Zeitpunkt  $t[0]$ ) der aus dem Trachealsekret gewonnenen MSCs. Der BPD Schweregrad wurde in mild (Grad 1), moderat (Grad

2) oder schwer (Grad 3) nach der Definition nach A. Jobe und E. Bancalari eingeteilt (Jobe and Bancalari 2001) (s. auch 1.1.1.). Grad 0 bedeutet hier keine BPD. Mittelwert des Proliferationsindex von MSCs von Kindern mit BPD Grad 0-1: 2,05. Mittelwert des Proliferationsindex von MSCs von Kindern mit BPD Grad 2-3: 2,79.

Die Wachstumsgeschwindigkeit der mesenchymalen Stromazellen, repräsentiert durch den Proliferationsindex (Wachstum zum Zeitpunkt  $t[x]$ /Wachstum zum Anfangszeitpunkt  $t[0]$ ), korrelierte direkt mit dem Schweregrad der BPD (Abb. 10 B) und den Tagen invasiver Beatmung (Abb. 10 A). Molekulare Untersuchungen der Arbeitsgruppe zeigten, dass der Proliferationsindex direkt mit der basalen Expression des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B und invers mit der basalen Expression des Myofibroblastenmarkers  $\alpha$ -SMA korrelierte. MSC Isolate mit hoher Spontanproliferation, hohem NF $\kappa$ B Aktivierungsstatus und niedriger basaler  $\alpha$ -SMA Expression gingen mit einer schlechteren pulmonalen Prognose einher, als MSC Isolate mit geringerem Proliferationsindex und niedrigerem NF $\kappa$ B Aktivierungsstatus, aber erhöhtem Gehalt an  $\alpha$ -SMA (Reicherzer et al. 2010, Reicherzer et al. 2016). Der Phänotyp und die molekularen Expressionsmuster der mesenchymalen Stromazellen sind folglich wesentlich mit dem Schweregrad der Erkrankung assoziiert. Diese Ergebnisse passen folglich zu dem in der aktuellen Literatur postulierten Bild einer dysregulierten MSC Funktion in der Pathogenese der BPD (Mobius and Thebaud 2015).

Insgesamt stellen mesenchymale Stromazellen einen vielversprechenden, neuen Angriffspunkt in der Behandlung der bronchopulmonalen Dysplasie dar. Trotz präventiver Maßnahmen, wie früher Surfactantgabe, schonender Beatmungsmethoden und adäquater Ernährung bleibt die BPD aufgrund mangelnder spezifischer Therapieansätze und dem Überleben immer kleinerer Frühgeborener eine der Hauptkomplikationen im Rahmen einer Frühgeburt, mit bezüglich psychomotorischer Entwicklung und pulmonaler Langzeitmorbidity weitreichenden Konsequenzen (Biniwale and Ehrenkranz 2006, Greenough and Ahmed 2013, Mobius and Thebaud 2015). Das Atemstimulanz Koffein, das die Anzahl der Apnoephasen der Frühgeborenen senkt und eine frühere Extubation ermöglicht, oder Vitamin A, das die Zelldifferenzierung und Surfactantsynthese fördert, werden supportiv appliziert und zeigen einen gewissen Nutzen (Schmidt, Roberts et al. 2006, Greenough and Ahmed 2013). Als potentes Mittel stehen jedoch nur Glukokortikoide zur Verfügung, die pränatal in niedriger Dosis präventiv zur Induktion der Lungenreifung und Stimulierung der Surfactantproduktion und postnatal als sogenannte "Rescue Therapie" bei drohendem respiratorischen Versagen zur Eindämmung der pulmonalen Inflammationsreaktion und Verbesserung der Lungenfunktion verabreicht werden. Sie führen zu einer deutlichen Symptomlinderung und reduzieren den Bedarf an Atemunterstützung, die Häufigkeit der Diagnose BPD und v.a. die neonatale Mortalität

(Roberts and Dalziel 2006, Halliday, Ehrenkranz et al. 2010, Greenough and Ahmed 2013). Allerdings wurde im Tiermodell an pränatal mit Steroiden behandelten Lämmern ein negativer Einfluss auf die Lungenentwicklung mit deutlicher Rarefizierung der Alveolen nachgewiesen (Willet, Jobe et al. 2000). Auch postnatal traten gravierende Nebenwirkungen auf, wie Darmperforationen, gastrointestinale Blutungen, Hyperglykämie, arterielle Hypertonie, hypertrophe Kardiomyopathie, Gedeihstörungen und langfristig neurologische Schäden, wie eine Zerebralparese und Entwicklungsverzögerungen (Halliday, Ehrenkranz et al. 2003, Halliday, Ehrenkranz et al. 2003, Halliday, Ehrenkranz et al. 2010). Die Autoren dieser Studien kamen daher zu dem Schluss, dass die zahlreichen Nebenwirkungen den Nutzen der Steroide nicht aufwiegen (Halliday, Ehrenkranz et al. 2010).

Die Entwicklung neuer, nebenwirkungsarmer und v.a. selektiv angreifender Therapien ist daher eine große klinische Notwendigkeit. Tierexperimentelle Studien zeigten bereits ein beachtliches therapeutisches Potential der mesenchymalen Stromazellen. Sie wecken damit die Hoffnung sowohl auf eine präventive Möglichkeit, die Lungenschädigung im Rahmen einer klinisch notwendigen Beatmung entsprechend den tierexperimentellen Ergebnissen abzuschwächen, als auch auf eine therapeutische Option, die die Regeneration bereits geschädigten, pulmonalen Gewebes ermöglicht (Mobius and Thebaud 2015, Mueller, Wolfs et al. 2016).

Ein umfassendes Verständnis der im Rahmen der BPD Pathogenese vorliegenden MSC Dysregulation, ihrer Auslöser und der exakten Veränderungen ist daher notwendig. Nur so können auch therapeutische Ansätze gefunden werden, die die Funktion der MSCs betroffener Frühgeborener positiv beeinflussen, damit das Lungenwachstum fördern und so eventuell zur Prävention der Krankheitsentstehung beitragen. In der vorliegenden Arbeit wurde daher im Zellkulturmodell der Einfluss der pulmonalen Inflammationsreaktion anhand ihrer Hauptmediatoren, den pro-inflammatorischen Zytokinen IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8 auf den Phänotyp und die Proteinexpression von mesenchymalen Stromazellen aus dem Trachealsekret Frühgeborener untersucht. Ebenfalls wurde der Effekt des in Reparaturmechanismen involvierten Transforming-Growth-Factors- $\beta$ 1 auf die MSCs charakterisiert.

## 2. Zielsetzung der Doktorarbeit

Die pulmonale Inflammationsreaktion mit ihren Hauptmediatoren IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8 steht im Zentrum der BPD Pathogenese (Speer 2006). Auch der Transforming Growth Factor -  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) ist im Zytokin-Netzwerk der Entzündungsreaktion beteiligt und begrenzt einerseits die Inflammation, hat andererseits jedoch durch überschießende Aktivierung unter Beatmung auch negative Effekte in der Krankheitsentstehung (Speer 2003, Ehrhardt, Pritzke et al. 2016). Neben diesen Faktoren gewann in letzter Zeit besonders die Zellentität der mesenchymalen Stromazellen (MSCs) an Bedeutung: Ihre Präsenz im Trachealsekret beatmeter Frühgeborener stellt einen negativen Prädiktor für die Entwicklung einer BPD dar (Popova, Bozyk et al. 2010). Weiterführende Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe zeigten, dass nicht die Präsenz, sondern der Phänotyp der MSCs im Trachealsekret mit der Entwicklung und dem Schweregrad der BPD assoziiert ist. Der Nachweis von MSCs mit hoher Spontanproliferation, hoher basaler Expression des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B und geringem intrazellulären Gehalt des zytoskelettalen Proteins  $\alpha$ -SMA war mit einem schlechteren pulmonalen Outcome assoziiert, als die Präsenz von MSCs mit niedriger Spontanproliferation, niedriger NF $\kappa$ B Expression und gleichzeitig höherem intrazellulären Gehalt von  $\alpha$ -SMA (Reicherzer et al. 2010, Reicherzer et al. 2016).

Aufgrund dieser Vorkenntnisse war das Ziel dieser Arbeit zu überprüfen, ob ein Zusammenhang zwischen dem veränderten Phänotyp der MSCs und den zentralen Mediatoren der Inflammationsreaktion besteht. Es sollten die besonderen Effekte der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8 sowie des TGF- $\beta$ 1 auf die phänotypischen und biochemischen Eigenschaften der aus dem Trachealsekret isolierten MSCs im Zellkulturmodell unter Zuhilfenahme von molekularen Methoden charakterisiert werden. Dabei wurden folgende Teilziele formuliert:

- Welchen Einfluss haben IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8 auf den Phänotyp der MSCs?
- Welchen Einfluss hat TGF- $\beta$ 1 auf den Phänotyp der MSCs?
- Welchen Nettoeffekt induziert die kombinierte Stimulation mit einem der pro-inflammatorischen Zytokine zusammen mit TGF- $\beta$ 1?
- Welche intrazellulären Signalwege sind für den beobachteten gestörten Phänotyp verantwortlich?

Zur Realisierung der einzelnen Teilziele wurden folgende Teilprojekte durchgeführt:

Zunächst wurde das Apoptose- und Proliferationsverhalten der MSCs nach Zytokinstimulation sowie die Auswirkungen der Zytokinstimulation auf den biochemischen



Expressionsgrad von NF $\kappa$ B und  $\alpha$ -SMA untersucht. Mittels der Technik der RNA Interferenz sollte ein molekularer Zusammenhang zwischen Signalwegsaktivierung und Phänotyp bestätigt werden. Besonderer Fokus wurde auf den NF $\kappa$ B Signalweg gelegt, um zu klären, ob, wie bei vielen anderen pro-inflammatorischen Prozessen und wie aufgrund der Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zu vermuten, eine NF $\kappa$ B Abhängigkeit der Zytokin-induzierten Wirkung besteht.

Nach Charakterisierung der TGF- $\beta$ 1 Wirkung auf das Apoptoseverhalten, das Proliferationsverhalten und die Biomarkerexpression der MSCs, sollte seine Interaktion mit den pro-inflammatorischen Zytokinen IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8 untersucht werden. Dazu wurde nach kombinierter Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 und jeweils einem der pro-inflammatorischen Zytokine das Proliferations- und das molekulare Expressionsverhalten der Zellen analysiert. Die beteiligten Signalwege wurden in Western Blot Analysen näher charakterisiert und über RNA Interferenz der molekulare Nachweis der Kausalität geführt.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Chemikalien und Reagenzien

Acrylamidlösung, 30%	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg, D
Bromphenolblau	BioRad, München, D
Citronensäure	Carl Roth, Karlsruhe, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe, D
DMEM, Zellkulturmedium	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, D
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ethanol, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe, D
FACS Lysepuffer	BD Bioscience, Heidelberg, D
Fetales Kälberserum (FCS, fetal calf serum)	Biochrom Ag, Berlin, D
[allgemeine Zellkultur]	
Fetales Kälberserum 1 und 2	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, D
[Etablierung der MSC-Kulturen]	
Fetales Kälberserum 6 und 7	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, D
[Etablierung der MSC-Kulturen]	
Gel-Transfer-Puffer	Klinikum Großhadern, München, D
Gentamicin	Ratiopharm, Ulm, D
Glutamin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, D
Glycerin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, D
HEPES	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, D
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe, D
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe, D
Loading Dye (6x)	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Luminol	Carl Roth, Karlsruhe, D
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt, D
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, D

MesenCult MSC Basal Medium (Human)	Stemcell Technologies, Grenoble, F
Methanol	Merck, Darmstadt, D
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumazid	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumcitrat	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Natronlauge	Carl Roth, Karlsruhe, D
Page Ruler, Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Penicillin / Streptomycinlösung	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, D
Phosphorsäure, p.a.	Merck, Darmstadt, D
2-Propanol, p.a.	Merck, Darmstadt, D
Propidiumiodid	Carl Roth, Karlsruhe, D
Proteinase Inhibitor-Cocktail Set I	Merck, Darmstadt, D
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe, D
Super Signal West Femto (ECL)	Thermo Scientific, Karlsruhe, D
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Trypsin-EDTA-Lösung	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, D
Tween-20, Sigma-Aldrich Ultra	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Vancomycin	Actavis, München, D
Wasserstoffperoxid 30%	Carl Roth, Karlsruhe, D

### 3.1.2. Verbrauchsmaterialien

Combitips (1ml, 2,5ml, 5ml, 10ml)	Eppendorf, Hamburg, D
E-Plate 16	ACEA Biosciences Inc., San Diego, USA
Gel-Blotting-Papier (Whatman)	GE Healthcare, München, D
Immobilon-P Transfermembran (PVDF)	Millipore, Schwalbach, D
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden, D
Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen)	Nunc, Wiesbaden, D
Mikrotiterplatten (24, 12, 6 Vertiefungen)	BD Bioscience, Heidelberg, D
Pasteurpipetten, Glas	Brand, Wertheim, D

Pipetten (5, 10, 25, 50 ml)	BD Bioscience, Heidelberg, D
Pipettenspitzen mit Filter (1ml)	Star Lab, Hamburg, D
Reaktionsgefäße (1,5ml und 2ml)	Greiner Bio-one, Frickenhausen, D
Zellkulturflaschen Cellstar (25 cm <sup>2</sup> und 75 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-one, Frickenhausen, D
Zentrifugenröhrchen (15ml und 50 ml)	BD Bioscience, Heidelberg, D

### 3.1.3. Laborgeräte und Software

Gerät/Software	Hersteller
AIDA Image Analyzer Software, Version 4.06.116	Raytest, Straubenhardt, D
Cellscreen Inversmikroskop Olympus IX50	Roche Innovatis AG, Bielefeld, D Olympus, Hamburg, D
Durchflusszytometer (FACScan) Cell Quest Pro Software	BD Bioscience, Heidelberg, D BD Bioscience, Heidelberg, D
EasyPhor Wet Blot System	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, D
Gelelektrophorese-Apparatur Mini-Protean3	BioRad, München, D
Optimax X-Ray Film Processor	PROTEC GmbH, Oberstenfeld, D
Stromgeber Power Supply Basic	Bio-Rad, München, D
Ultraschallgerät Branson Digital 250-D	Branson, Fürth, D
xCELLigence System RTCA Software 1.2.1	Roche, Mannheim, D ACEA Biosciences Inc., San Diego, USA
Microsoft Office 2007	Microsoft Corporation, Redmond, USA
SigmaPlot Version 12.3	Systat Software GmbH, Erkrath, D

**Tabelle 2:** Laborgeräte und Software

Für die Bearbeitung der Daten wurden zusätzlich die Programme "Word", "Powerpoint", und "Excel" des Microsoft Office Pakets sowie das Bildbearbeitungsprogramm "GIMP 2" verwendet.

### 3.1.4. Puffer und andere Lösungen

Name	Zusammensetzung
10x PBS	NaCl [1,37 M]; KCL [27 mM]; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2 H <sub>2</sub> O [81 mM]; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> [18 mM] ad 1l H <sub>2</sub> O (pH 7,3)

10x TBS	Tris [200 mM]; NaCl [1,4 M]; ad 1l H <sub>2</sub> O (pH 7,6)
TBS/T	Tween-20 [0,1%] in 1xTBS
2x SDS-Lysepuffer	0,5 ml Tris [1,5 M] (pH 6,8); 3,2 ml Glycerol [50%]; 3,2 ml SDS [10%]; 0,8 ml β-Mercaptoethanol; 0,8 ml Bromphenolblau [1%]; 0,3 ml ddH <sub>2</sub> O ad 8,8ml
Kernpuffer A	Hepes [10 mM]; KCl [1 mM]; MgCl <sub>2</sub> [1,5 mM]; Triton-X 100 [0,5%]; ad 100ml H <sub>2</sub> O (pH 7,0)
Kernpuffer B	Hepes [20mM]; KCl [400mM]; EDTA [0,1mM]; Glycerin [25%]; ad 100ml H <sub>2</sub> O (pH 7,9)
Sammelgel (5%)	0,5ml Acrylamid Mix [30%]; 0,38ml Sammelgelpuffer; 30µl SDS [20%]; 30µl APS [10%], 3µl TEMED; ad 3ml ddH <sub>2</sub> O
Lämmli	Tris [62,5 mM] (pH 6,8), SDS [2%], Glycerol [10%], Bromphenolblau [0,001%], β-Mercaptoethanol [5%]
Sammelgelpuffer	Tris [0,47 M]; 25,6ml Phosphorsäure [1 M]; ad 100ml H <sub>2</sub> O (pH 6,7)
Trenngel (12%)	4ml Acrylamid Mix [30%]; 2,5ml Trenngelpuffer; 100µl SDS [20%]; 100µl APS [10%]; 4µl TEMED; ad 10ml ddH <sub>2</sub> O
Trenngelpuffer	Tris [3 M]; 48ml Salzsäure [1 M]; ad 100ml H <sub>2</sub> O (pH 8,9)
5x SDS-Laufpuffer	Tris [125 mM]; Glycin [1,25 M]; SDS [0,5%] in H <sub>2</sub> O
ECL-Reagenz	Lösung A: Luminol [2,5 mM]; Cumarinsäure [0,4 mM]; Tris/HCl [0,1 M] (pH 8,5) in H <sub>2</sub> O Lösung B: H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [0,02%]; Tris/HCl [0,1 M] (pH 8,5) in H <sub>2</sub> O
Nicoletti-Puffer	Triton-X 100 [0,1%]; Na-Citrat [0,1%] in H <sub>2</sub> O

**Tabelle 3:** Puffer und eingesetzte Lösungen

### 3.1.5. Stimulanzen/Zytokine

Zytokin	Herkunft	Hersteller	Katalognummer
TNF-α (rekombinant, human)	E. coli	PeprTech, Rocky Hill, NJ, USA	300-01A
IL-1 Beta (rekombinant, human)	E. coli	PeprTech, Rocky Hill, NJ, USA	200-01B
IL-8 (rekombinant, human)	E. coli	PeprTech, Rocky Hill, NJ, USA	200-08/200-08M
IL-6 (rekombinant, human)	E. coli	PeprTech, Rocky Hill, NJ, USA	200-06
TGF-β1 (rekombinant, human)	CHO Zellen	PeprTech, Rocky Hill, NJ, USA	100-21C

**Tabelle 4:** eingesetzte Zytokine; Reinheit ≥ 98% nach Herstellerangaben

TNF- $\alpha$ , IL-1 Beta, IL-8 und IL-6 wurden in steril filtriertem, destilliertem Wasser in einer Konzentration von 0,1 - 1,0 mg/ml unter sterilen und anti-pyrogenen Bedingungen gelöst, dann die gewünschte Stock-Konzentration durch Weiterverdünnung mit PBS / 1% BSA erstellt und bei -80 °C aufbewahrt. TGF- $\beta$ 1 wurde in steril filtrierter 10 mM Citronensäure (pH 3,0) in einer Konzentration von 0,1 - 1,0 mg/ml gelöst. Die Stock-Konzentration wurde ebenfalls durch Verdünnung mit PBS / 1% BSA gewonnen und bei -80 °C aufbewahrt.

### 3.1.6. Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden zur Transfektion der mesenchymalen Stromazellen mit si (small interfering) RNA verwendet.

siRNA	Sequenz	Hersteller
siNFkappaB	5'- GCC CUA UCC CUU UAC GUC -3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, D
AllStars Neg. siRNA AF 488	Sequences not available from the manufacturer	Qiagen, Hilden, D

**Tabelle 5:** eingesetzte Oligonukleotide

### 3.1.7. Antikörper zur Immundetektion

#### Primärantikörper:

Antigen	VF	Lösung	Spezies	Hersteller	Kat.Nr.	Größe kDa
$\alpha$ -Actin	1000	TBS/T	Maus	Calbiochem	113200	42
GAPDH	5000	TBS/T	Maus	Calbiochem	CB1001	36
Histon H1	1000	TBS/T	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology	sc-10806	32-33
Lamin A/C	1000	TBS/T	Ziege	Santa Cruz Biotechnology	sc-6215	62-69
NF $\kappa$ B p65	1000	5% MP in TBS/T	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology	sc-372	65
Phospho- Smad2	1000	5% BSA in TBS/T	Kaninchen	Cell Signaling Technology	3108	60
Phospho- Smad3	1000	5% BSA in TBS/T	Kaninchen	Merck Millipore	04-1042	52

**Tabelle 6:** Primärantikörper zur Westernblot-Analyse

(VF: Verdünnungsfaktor, MP: Milchpulver, BSA: Bovines Serumalbumin, Kat.Nr.: Katalognummer, kDa: Kilo Dalton)

Zu allen Primärantikörpern wurde zusätzlich 1% Natriumazid gegeben.

**Sekundär-Antikörper:**

<b>Sekundär-Antikörper</b>	<b>VF</b>	<b>Lösungsmittel</b>	<b>Methode</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Kat.Nr.</b>
Anti-rabbit IgG, HRP-linked	5000	5% MP in TBS/T	Western Blot	Cell Signaling Technology	7074
Anti-mouse IgG, HRP linked	5000	5% MP in TBS/T	Western Blot	Cell Signaling Technology	7076
Anti-goat IgG, HRP-linked	5000	5% MP in TBS/T	Western Blot	Santa Cruz Biotechnology	sc-2768

**Tabelle 7:** Sekundär-Antikörper zur Immundetektion

(HRP: Meerrettichperoxidase (engl.: "Horseradish Peroxidase"), VF: Verdünnungsfaktor, MP: Milchpulver, Kat.Nr.: Katalognummer)

Bei diesen Antikörpern wurde kein Natriumazid zugefügt.

## **3.2. Methoden**

### **3.2.1. Ethikvotum und Patientenkohorte**

Die der Dissertation zugrundeliegenden experimentellen Arbeiten wurden an mesenchymalen Stromazellen (MSCs) durchgeführt, die im Rahmen der prospektiven Kohortenstudie "Progress in the molecular understanding of evolution of chronic lung disease in preterm infants trial" (PROTECT-Studie) aus dem Trachealsekret intubierter Frühgeborener isoliert worden waren. Dem Ethikantrag wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München ein positives Votum mit der Studiennummer 195-07 erteilt.

Eingeschlossen wurden alle Frühgeborenen mit einem Gestationsalter unter 29+0 vollendeten Schwangerschaftswochen, die in der Neonatologie der Kinderklinik am Perinatalzentrum Großhadern betreut wurden. Als Ausschlusskriterien wurden prä- oder postnatal diagnostizierte schwere kongenitale Anomalien mit kardiopulmonaler Dysfunktion, eine Zwerchfellhernie oder gesicherte Trisomie 13 oder 18 definiert. Des Weiteren wurden Kinder mit schweren Stoffwechseldefekten, die eine Beeinträchtigung des Gesamtorganismus zur Folge haben, und Kinder mit palliativer Betreuung von der Studie ausgeschlossen. Vor Aufnahme der Patienten in die Studie wurde nach ausführlicher Aufklärung das Einverständnis des/der Sorgeberechtigten eingeholt. Abbruchkriterium der Studie war der Rückzug der Zustimmung des/der Sorgeberechtigten. Zum Schutz der Daten der Patienten unterlagen alle Mitarbeiter dieses Forschungsprojekts der ärztlichen Schweigepflicht und wurden auf das Datengeheimnis verpflichtet. Alle Datenerhebungen und -analysen wurden pseudonymisiert unter einer Patientenummer aufgezeichnet, d.h. mit einem Code versehen, dem weder der Name noch die Initialen des Studienteilnehmers zu entnehmen waren.

Das zu Forschungszwecken gewonnene Material war routinemäßig nur aufgrund der klinischen Notwendigkeit abgesaugtes Trachealsekret. Dadurch entstanden für die Patienten keinerlei zusätzliche Belastungen durch die Teilnahme an der Studie.

### **3.2.2. Zellkultur**

#### **3.2.2.1. Isolierung von MSCs aus dem Trachealsekret Frühgeborener**

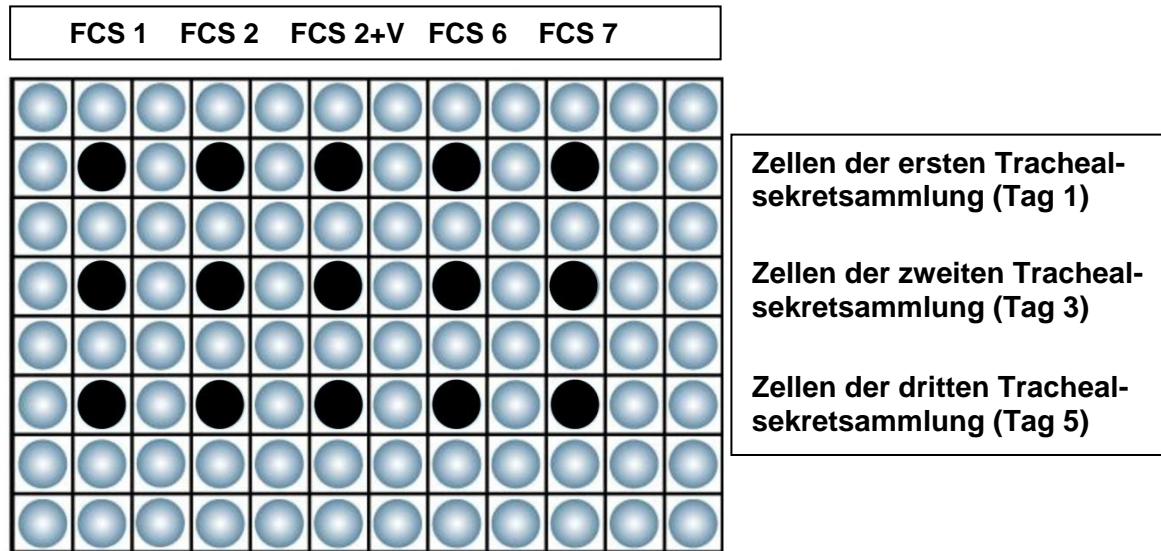
Die verwendeten MSC-Kulturen wurden nach folgendem Verfahren direkt aus dem Trachealsekret intubierter Frühgeborener gewonnen: Während der Phase der aufgrund



der klinischen Notwendigkeit erfolgten invasiven mechanischen Beatmung der Frühgeborenen wurde zur Etablierung der primären MSC-Kulturen systematisch an den Studientagen 1, 3, 5, 8 nach Intubation sowie weiterhin alle 3 bis 4 Tage bei fortbestehender Beatmung Trachealsekret gesammelt. Dieses war im Rahmen der klinischen Routine nur aufgrund der klinischen Notwendigkeit abgesaugt worden. Das Trachealsekret wurde hiernach sofort zur Etablierung der MSCs in Kultur genommen. Die MSCs des ersten Zeitpunktes der Etablierung nach Geburt stellten dabei die mesenchymalen Stromazellen des Beginns der pulmonalen Inflammationsreaktion auf Beatmung und Sauerstoffgabe dar und wurden für die standardisierten Untersuchungen der vorgelegten Arbeit verwendet.

Das frisch gewonnene Trachealsekret wurde 5 Minuten bei 1000 rpm abzentrifugiert, der Überstand abpipettiert und das Zellpellet in 120µl PBS gelöst. Diese Suspension wurde in insgesamt fünf Vertiefungen ("Wells") einer wie folgt vorbereiteten 96-Well-Platte gegeben (s. Abbildung 11):

Die blaugrauen Vertiefungen waren zum Schutz vor Evaporationseffekten mit je 200µl PBS gefüllt. Die schwarzen Vertiefungen enthielten 200µl MesenCult-Medium mit 20% FCS, 200U/ml Penicillin, 0,2mg/ml Streptomycin, 0,8mg/ml Gentamicin, 2mM Glutamin und 10mM HEPES. Da die frühe Besiedlung des Respirationstrakts mit koagulasenegativen Staphylokokken (KNS) ein häufiges Problem in der Neonatologie darstellt (Hall 1991, Stoll, Hansen et al. 2002), enthielt eine der schwarzen Vertiefungen pro Reihe zusätzlich 0,5mg/ml Vancomycin (Kennzeichnung "V" in Abb. 11), um die Etablierung wenigstens einer Kultur im Falle einer KNS-Kontamination sicherzustellen. Zur Gewährleistung optimaler Wachstumsbedingungen wurden unterschiedliche, besonders hochwertige FCS Typen ("FCS 1, 2, 6 und 7" in Abb. 11) verwendet, die kommerziell für die Etablierung und Kultur mesenchymaler Stammzellen vertrieben werden. Dies geschah unter Berücksichtigung der Literatur, die die erschwerte Abgrenzung der mesenchymalen Stromazellen aufgrund ihrer ähnlichen Eigenschaften zu mesenchymalen Stammzellen beschreibt (Sabatini, Petecchia et al. 2005, Hennrick, Keeton et al. 2007, Mobius and Thebaud 2015).



**Abbildung 11:** Inhalt einer nicht beschichteten 96 well flat bottom Mikrotiterplatte (Nunc) zur initialen Kultivierung der mesenchymalen Stromazellen aus dem Trachealsekret intubierter Frühgeborener. Die graublauen Vertiefungen enthalten PBS, die schwarzen Vertiefungen Trachealsekret mit MesenCult-Medium, 20% FCS, 200U/ml Penicillin, 0,2mg/ml Streptomycin, 0,8mg/ml Gentamicin, 2mM Glutamin und 10mM HEPES. Die mit "V" gekennzeichnete Vertiefungsreihe mit FCS 2 enthält zusätzlich 0,5mg/ml Vancomycin im Medium.

Nach Anwachsen der ersten mesenchymalen Stromazellen auf der Mikrotiterplatte (Passage 0) wurden sie, sobald eine Konfluenz von ca. 70% auf dem Wellboden erreicht war, in eine 25cm<sup>2</sup>-Cellstar-Zellkulturflasche überführt (Passage 1). Dazu wurde das MesenCult-Medium, das nur zur primären Anzucht verwendet worden war, entfernt, die am Boden verbleibenden, adhären MSCs mit 100µl vorgewärmtem Trypsin gelöst und in eine mit 6ml warmem DMEM-Medium vorbereitete Zellkulturflasche gegeben. Das DMEM-Medium enthielt hierbei 100U/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin, 0,4mg/ml Gentamicin, 2mM Glutamin, 10mM HEPES. Es wurde in dieser Zusammensetzung von nun an dauerhaft zur weiteren Passagierung der Zellen bzw. für Versuche verwendet und wird daher von nun an als Standardmedium bezeichnet. Ebenso wurde das hochwertige, nur zur primären Etablierung der Kultur verwendete FCS durch 20% Standard-FCS für Zellkultur ersetzt, welches weniger spezielle Wachstumsfaktoren enthielt und von nun an ebenfalls standardmäßig verwendet wurde. Dieses Vorgehen war v.a. in Hinblick auf nachfolgende Versuche zur Detektion von spezifischen Stimulationseffekten der pro-inflammatorischen Zytokine im Überstimulationsmodell sinnvoll, um Überstimulationsbedingungen durch das Zellkulturmedium zu vermeiden und den über mehrere Passagen persistierenden Phänotyp zu bewahren.

Nach Überführen der MSCs in die 25cm<sup>2</sup>-Cellstar-Zellkulturflasche wurden ihnen MSC-Nummern zugeteilt. Die Zellen der ersten Zellkulturflasche erhielten z.B. die MSC-Nummer "MSC 55.1" = MSC ("mesenchymale Stromazelle") 55 (Kind Nr. 55) 1 (Zellen der

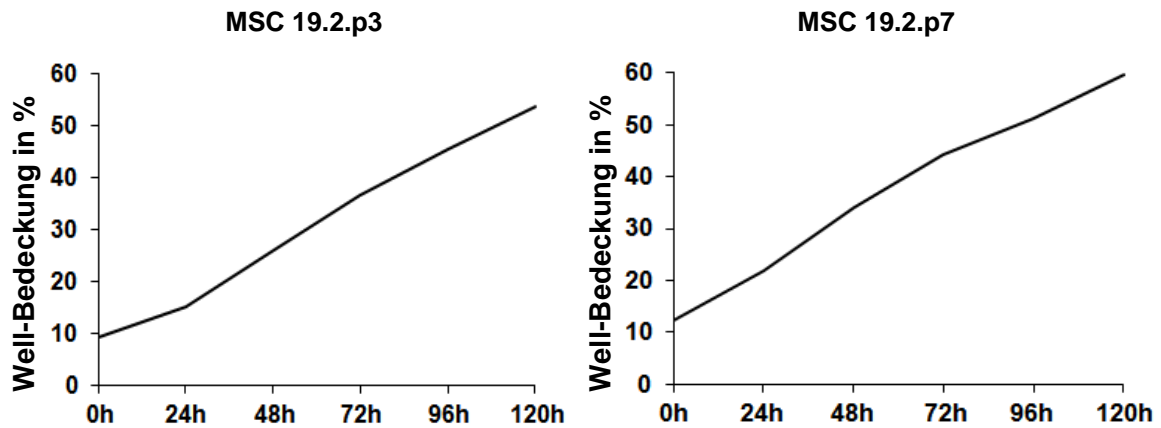
ersten erfolgreichen Aussaat). Weiteren in Flaschen überführten mesenchymalen Stromazellen wurden dementsprechend z.B. die Nummern MSC 55.2, MSC 55.3, MSC 55.4 etc. zugeteilt, wobei Klon 1, 2 und 3 zwar vom identischen Tag stammen konnten, aber immer aus unterschiedlichen Vertiefungen der ursprünglichen Mikrotiterplatte isoliert wurden.

Die auf diese Weise etablierten MSC-Kulturen standen ab Passage 2 mit einer Reinheit von  $\geq 97\%$  zu Untersuchungen im Rahmen der Studie bereit.

### **3.2.2.2. Kultur und Splitten von MSCs**

Vollgewachsene 25cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen in Passage 1 wurden, nach Entfernung des Mediums, zum Splitten der Zellen mit 4ml PBS gewaschen, um FCS Reste in der Flasche zu entfernen. FCS führt zur Inaktivierung der Endopeptidase Trypsin, die extrazelluläre Proteine spaltet und auf diese Weise adhärente Zellen vom Flaschenboden löst. Zur Ablösung der MSCs wurden diese für kurze Zeit mit 2ml Trypsin im Brutschrank inkubiert und 1,3ml der losgelösten Zellen eingefroren. Die restlichen 0,7ml in der Zellkulturflasche wurden mit 6ml Standardmedium (DMEM-Medium mit 100U/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin, 0,4mg/ml Gentamicin, 2mM Glutamin und 10mM HEPES) mit 20% FCS aufgefüllt. Bei Konfluenz der sich nun in Passage 2 befindenden MSCs wurde erneut gesplittet und ein Teil der Zellen bei -80°C tiefgefroren. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass auch zu einem späteren Zeitpunkt ausreichend identische Zellen in niedrigen Passagezahlen (Passage 1 und 2) für die weiterführenden biochemischen, phänotypischen und molekularen Untersuchungen erneut zur Verfügung standen. Ab Passage 3 wurden die MSCs bei gutem Wachstum in 75cm<sup>2</sup>-Cellstar-Zellkulturflaschen umgesiedelt. Zum Splitten der Zellen wurde von nun an mit 10ml PBS gewaschen und die MSCs mit 3ml Trypsin im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurden 2ml verworfen oder für Versuche verwendet und die Zellkulturflasche mit 12ml Standardmedium mit 20% FCS aufgefüllt. Gesplittet wurde je nach Zellwachstum ungefähr alle 4-6 Tage und dabei stetig eine Passage weitergezählt.

Versuche zur Untersuchung der MSCs im pulmonalen Inflammationsgeschehen wurden zwischen Passage 3 bis 7 durchgeführt, da hier ein stabiler Phänotyp der Zellen nachgewiesen werden konnte (s. Abbildung 12).



**Abbildung 12:** Vergleichsweise Gegenüberstellung un behandelter MSCs des Patienten 19 in Passage 3 (links) und Passage 7 (rechts). Beide Wachstumskurven wurden nach Aussaat der Zellen auf einer 96-Well-Platte in Standardmedium mit 20% FCS mittels repetitiver Mikroskopie im Cellscreen (s. 3.2.4.) ermittelt und weisen stabile Proliferationseigenschaften der MSCs auf.

Bereits ab Passage 2 lag ein Reinheitsgrad der MSC-Kultur von  $\geq 97\%$  vor, der durchflusszytometrisch mit Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle CD13, CD14, CD16, CD34, CD45, CD73, CD90, CD105, und CXCR4 in der Arbeitsgruppe bestimmt wurde. Es wurde das in der Arbeitsgruppe bereits etablierte und publizierte Vorgehen angewendet (Reicherzer et al. 2010).

### 3.2.2.3. Einfrieren und Auftauen von MSCs

Zum Einfrieren wurden MSC-Kulturen der Passagen 1 und 2 mit Trypsin vom Flaschenboden gelöst, in ein 15ml Zentrifugenröhrchen (Falcon) mit vorgelegtem Standardmedium aus der Zellkulturflasche überführt und bei 1000 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2ml vorbereitetes FCS mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen, in ein Gefriereröhrchen gegeben und bei gleichbleibender Passagezahl bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Zum Auftauen der Zellen wurde das Gefriereröhrchen kurz bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Wärmebad geschwenkt, dann der Inhalt sofort in ein 15ml-Zentrifugenröhrchen mit 10ml warmem Standardmedium gegeben und bei 800 rpm 5 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in eine mit 6ml warmem Standardmedium mit 20% FCS vorbereitete  $25\text{cm}^2$ -Zellkulturflasche überführt. Die Passagezahl der MSCs wurde beibehalten, da in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, dass die Zellen vor und nach dem Auftauen vergleichbare Charaktereigenschaften bezüglich der wichtigen phänotypischen Eigenschaften der MSCs aufwiesen: Sowohl das Proliferationsverhalten wie auch die basale NF $\kappa$ B bzw.  $\alpha$ -SMA Expression blieben vergleichbar.

Am nächsten Tag fand ein Mediumwechsel statt, um tote Zellen und daraus freigesetzte Apoptose- und andere Störfaktoren zu entfernen. Ebenfalls wurde damit das Risiko einer bakteriellen Kontamination, begünstigt durch apoptotische Zellen als Nährstoffgrundlage, minimiert. Bei gutem Wachstum wurden die MSCs im Verlauf in 75cm<sup>2</sup>-Cellstar-Zellkulturflaschen umgesiedelt.

#### 3.2.2.4. Bestimmung der Zellzahl und Aussäen von MSCs

Zur Bestimmung der Zellzahl vor Aussaat eines Experiments wurden die MSCs nach Ablösen mit Trypsin in 5-10ml Medium je nach Zellmenge aufgenommen und hiervon 10µl in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop in vier Großquadraten ausgezählt. Die Zellzahl wurde nach folgender Formel ermittelt:

$$c \left( \frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{Anzahl der gezählten Zellen}}{4} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

Anschließend wurden die Zellen in gewünschter Konzentration durch entsprechende Weiterverdünnung mit Standardmedium auf Mikrotiterplatten mit 96, 24, oder 6 Vertiefungen ausgesät, wobei je nach Anzahl der Vertiefungen 100µl, 500µl oder 2ml eingefüllt wurden. Diese Mediummenge stellte eine ausreichende Flüssigkeitsbedeckung und Schutz vor Evaporationseffekten dar. Zur initialen Aussaat eines Versuches wurde immer Standardmedium mit 20% FCS verwendet.

#### 3.2.3. Aufbau eines standardisierten Experiments

Um die Experimente möglichst einheitlich und vergleichbar aufzubauen, wurden die aufeinanderfolgenden Arbeitsschritte im Aufbau eines standardisierten Versuchs, unabhängig von der weiterführenden Methode, immer gleich gestaltet.

**Am Tag 1** des Experiments wurden die MSCs, wie unter 3.2.2.4. beschrieben, in definierten Konzentrationen in Standardmedium (DMEM-Medium mit 100U/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin, 0,4mg/ml Gentamicin, 2mM Glutamin und 10mM HEPES) mit 20% FCS ausgesät.

Für Versuche zur Proliferationsbestimmung (siehe 3.2.4. und 3.2.5., Cellscreen und xCELLigence) wurde auf unbeschichteten Flat Bottom Platten im 96-Well-Format ausgesät und eine Zellkonzentration von durchschnittlich 0,02 Millionen Zellen/ml gewählt. Ziel war die einheitliche, initiale Bodenbedeckung der Vertiefungen von 10-25%, um ausreichend Freiraum für die weitere ungehinderte Zellproliferation zu gewährleisten. Die

maximale Wellbedeckung am Versuchsende betrug 80%. Nur Versuche, die diese Kriterien erfüllten, wurden in die Auswertung einbezogen. Lediglich bei Proliferationsversuchen mit molekularem Hintergrund wurde das obere Randlimit der initialen Wellbedeckung auf 30% angehoben, um, aufgrund der erhöhten Stabilität der dichter ausgesäten Zellen gegenüber den toxischen Effekten einer Transfektion, ein möglichst einheitliches experimentelles Setting mit möglichst niedriger Varianz für die statistische Analyse zu erhalten. Randständige Vertiefungen wurden mit je 200µl PBS gefüllt, um Evaporationseffekte zu reduzieren.

Für Versuche mit anschließender Western Blot Analyse (siehe 3.2.7.) wurden 6-Well-Platten und eine Zellkonzentration von 0,06 bis 0,08 Millionen Zellen/ml gewählt. So wurde eine identische Bodenbedeckung im Vergleich zu den Experimenten auf 96-Well-Platten erreicht.

Bei Versuchen zur Apoptosebestimmung nach Nicolletti (siehe 3.2.6.) wurde ein Plattenformat mit 24 Vertiefungen in identischer Weise verwendet, das mit einer initialen Zellkonzentration von durchschnittlich 0,04 Millionen Zellen/ml ausgesät wurde.

**Am Tag 2** des Experiments wurde das Standardmedium in den Vertiefungen gewechselt. Hierbei wurde der anfänglich hohe FCS-Gehalt von 20%, der zum sicheren und effizienten Anwachsen der MSCs und zur stabilen Reduktion apoptotischer Zellen in der Anfangsphase auf <20% notwendig war, auf 10% reduziert. Da sich die Zellen nun bereits in der stabilen Wachstumsphase befanden, war der niedrigere FCS Gehalt zur Durchführung von Versuchen über 96h - 120h ausreichend und zur Detektion einzelner Zytokinwirkungen im Überstimulationsmodell geeigneter. Nach mindestens 6h Adaptationszeit an den Mediumwechsel im Brutschrank wurden die MSCs mit den Zytokinen IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  oder TGF- $\beta$ 1 stimuliert. Mit TGF- $\beta$ 1 wurden zusätzlich Kombinationsstimulationen mit jeweils einem der anderen Zytokine durchgeführt. Grundsätzlich wurden IL-1 $\beta$  und IL-6 in der Konzentration 100ng/ml verwendet, IL-8 und TNF- $\alpha$  in der Konzentration 300ng/ml und TGF- $\beta$ 1 in Konzentrationen von 0,1ng/ml, 1ng/ml und 10ng/ml, um eine dosisabhängige Wirkung zu untersuchen, ansonsten in der Standardkonzentration von 10ng/ml.

**An den folgenden Versuchstagen** wurden die auf diese Weise vorbehandelten MSCs zur Analyse mittels diverser Techniken herangezogen.

Proliferationsmessungen wurden in definierten Zeitabständen (siehe 3.2.4. und 3.2.5.) durchgeführt.

Western Blot Pellets wurden, wie unter 3.2.7.1. "Herstellung von Zelllysaten" beschrieben, in definierten Zeiträumen nach Stimulation gewonnen: 2h nach Stimulation wurden unfraktionierte Zellpellets für die Bestimmung der Proteine p-Smad2 und p-Smad3 und ein reines Kernlysate für die Bestimmung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ Bp65 angefertigt. 6h

nach Stimulation wurden ebenfalls unfraktionierte Zellpellets für die Bestimmung von p-Smad2 und p-Smad3 und 48h nach Stimulation unfraktionierte Pellets für das Protein  $\alpha$ -SMA gewonnen.

Die Apoptosebestimmung nach Nicoletti wurde 48h nach Stimulation durchgeführt.

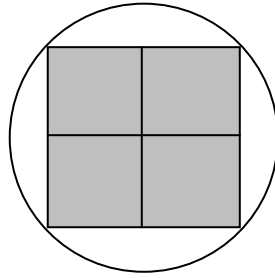
### **3.2.4. Bestimmung des Wachstums der MSCs mittels repetitiver automatisierter Lichtmikroskopie**

Zur Untersuchung von Zelldichte und Wachstumsgeschwindigkeit der MSCs wurde das Cellscreen System (Roche Innovatis AG) verwendet. Hierbei handelt es sich um ein automatisiertes, nicht-invasives Analysesystem, das die Zellen in ihrem Kulturgefäß – hier eine Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen (Nunc) – ungefärbt und ohne Beeinträchtigung des Kulturzustandes erfasst. Es besteht aus einem inversen Autofokus-Phasenkontrastmikroskop, das mit einer Digitalkamera verbunden ist und über einen beweglichen Motorkreuztisch exakt die eingesetzte Mikrotiterplatte ansteuern kann. Auf diesem Weg wurde sichergestellt, dass bei repetitiven Messungen jedes Mal exakt dieselben Zellen erfasst wurden.

Die erste Messung der standardisiert durchgeführten Proliferationsanalyse wurde am zweiten Versuchstag (Zeitpunkt  $t_0$ ) durchgeführt, nachdem, wie unter 3.2.3. beschrieben, das Standardmedium auf den Mikrotiterplatten gewechselt und der FCS Gehalt auf 10% vermindert worden war. Dazu wurden in der Cellscreen-Software spezielle Einstellungen für das Experiment festgelegt und einheitlich für jede Folgemessung übernommen. Festgelegt wurden:

- die Anzahl und Größe der Vertiefungen (96-Well-Format von Nunc)
- die auszumessenden Sektoren innerhalb einer Vertiefung
- die Menge an Medium pro Vertiefung (100 $\mu$ l)
- der Zelltyp (MSC, folglich AC-Modul für adhärenente Zellen)
- die Verwendung des Vierfach-Objektivs

Zur Erfassung der Bodenbedeckung eines Wells wurde von den inneren vier Sektoren der Vertiefung je ein Bild mit dem Vierfach-Objektiv angefertigt. Die zusammengefügt Bilder deckten die gesamte Bodenfläche mit Ausnahme der Randbereiche ab (s. Abbildung 13 und 14). Auf die Aufzeichnung und Analyse der Randbezirke wurde aufgrund ihrer Unschärfe in der Aufnahme bewusst verzichtet.



**Abbildung 13:** Schematische Darstellung einer Vertiefung der zu messenden Mikrotiterplatte im Cellscreen-Mikroskop. Die Bodenfläche wird in 4 Sektoren (grau) aufgeteilt, innerhalb derer die Zellbedeckung gemäß der festgelegten Experimenteinstellungen in 4 einzelnen Bildern erfasst wird. Diese werden anschließend zu einem zusammenhängenden Bild zusammengefügt. Die weißfarbigen Randbezirke wurden aufgrund der Randunschärfe in Aufzeichnung und Analyse ausgespart.

Der weitere Versuchsablauf schloss nur Vertiefungen mit einer initialen Wellbedeckung von 10-25% ein, um ausreichend Freiraum für die weitere Zellproliferation zu gewährleisten. Bei Proliferationsversuchen mit molekularem Hintergrund wurde das obere Randlimit auf 30% erhöht, da Zellen in einer höheren Ausgangsdichte eine höhere Stabilität aufwiesen und somit die transfektionsbedingten Effekte minimiert wurden.

Nach der ersten Messung fand im Abstand von 6h zum vorausgegangenen Mediumwechsel die Stimulation der MSCs mit den Zytokinen IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  und TGF- $\beta$ 1 statt. Bei weiteren Experimenten wurde TGF- $\beta$ 1 zusätzlich in Kombination mit den anderen Zytokinen untersucht. Bei allen Stimulationen wurden immer vier Vertiefungen identisch behandelt und diese per Zufallsprinzip auf der Mikrotiterplatte verteilt. Somit konnte systematischen Fehlern durch Einwirken unerkannter Störvariablen entgegen gewirkt werden.

Die weiteren Messungen der MSC-Proliferation fanden in 24h-Intervallen bis zur letzten Aufnahme bei 120h statt. Das Bildmaterial wurde anschließend auf eine Datenbank übertragen und der berechnete Bedeckungsgrad in Prozent über einen beliebigen Zeitraum angegeben. Vertiefungen mit übermäßiger Anzahl an Zelldetritus, Luftblasen und sonstigen Artefakten wurden nach visueller, einzelner Bewertung systematisch ausgeschlossen, wobei aufgrund der exakten Messgenauigkeit nur selten einzelne Wells der vier gleich stimulierten Vertiefungen aus der Analyse genommen werden mussten.

Die Messwerte wurden nach Excel exportiert und die Zellbedeckungswerte der jeweils immer vier gleich stimulierten Vertiefungen gemittelt. Für eine bessere visuelle Vergleichbarkeit der stimulierten und nicht stimulierten MSCs in einem Wachstumsdiagramm wurde zusätzlich ein gemeinsamer Startpunkt der verschiedenen Proliferationskurven erstellt. Dazu wurde die Wellbedeckung der stimulierten Zellen auf die Anfangs-Wellbedeckung der Kontrolle zum Zeitpunkt der Stimulation mit der Formel

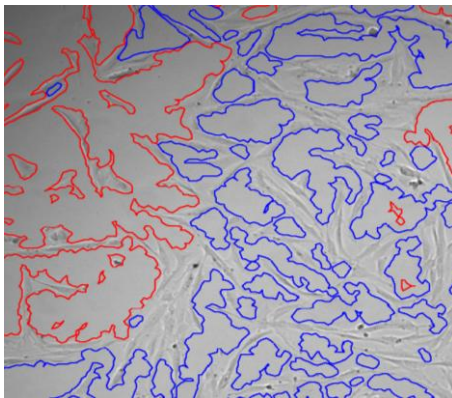


*Wellbedeckung der stimulierten Zellen zum Zeitpunkt  $t[x]$  x (Wellbedeckung der Kontrolle zum Zeitpunkt  $t[0]$  / Wellbedeckung der stimulierten Zellen zum Zeitpunkt  $t[0]$ )*

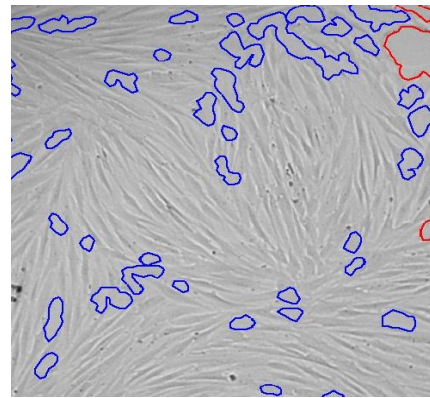
normiert. Zusätzlich wurde der Proliferationsindex (PI) aus den Mittelwerten der Zellbedeckungen nach der Formel

$$PI = \text{Bedeckung zum Zeitpunkt } t[x] / \text{Anfangsbedeckung zum Zeitpunkt } t[0]$$

für jeden Zeitpunkt  $t[0h]$  bis  $t[120h]$  berechnet.



Messung zum Zeitpunkt  $t[0h]$



Messung zum Zeitpunkt  $t[96h]$

**Abbildung 14:** Beispielhafte Darstellung einer der vier Sektoren im Cellscreen-Mikroskop. Die spindelförmigen mesenchymalen Stromazellen werden scharf erkannt und unbedeckte Flächen nach außen hin durch rote Linien, unbedeckte Flächen zwischen den MSCs durch blaue Linien abgegrenzt. Zur Berechnung der Wellbedeckung wird die Fläche zwischen der roten und blauen Umrandung herangezogen und in % der Gesamtfläche angegeben.

### 3.2.5. Bestimmung des Wachstums der MSCs mittels elektronischer Impedanzmessung

Eine weitere Methode zur nicht-invasiven, automatisierten Untersuchung von Wachstumsgeschwindigkeit und Zelldichte bietet das xCELLigence-System (Roche). Hierbei werden spezielle Mikrotiterplatten (E-plate 16) verwendet, die in den jeweiligen Vertiefungen Sensorelektroden enthalten, die 80% der Bodenfläche bedecken. Zwischen diesen Goldelektroden wird die Impedanz gemessen, die v.a. von der Zusammensetzung der Umgebungsflüssigkeit, dem Ausmaß der Zelladhärenz und der Zelldichte beeinflusst wird. Auf den Elektroden adhären Zellen wirken als Isolator und erhöhen somit die Impedanz. Der Zellindex ist ein dimensionsloser Parameter, der die relative Impedanzänderung widerspiegelt. Er setzt sich aus der Formel

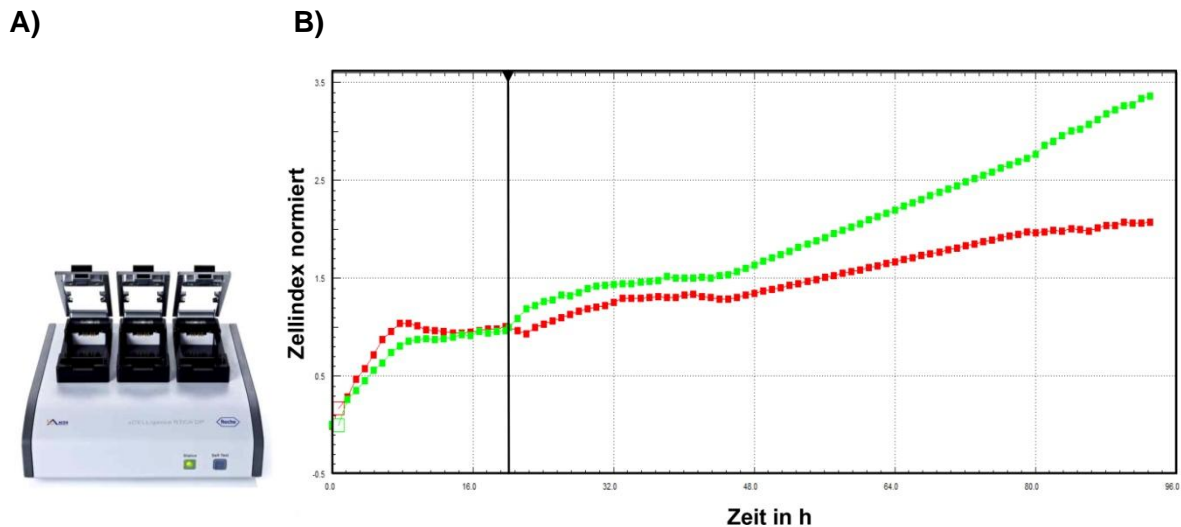
$$\text{Zellindex (CI)} = (Z_i - Z_0)/15\Omega$$

zusammen. Hierbei ist  $Z_i$  die zu einem bestimmten Zeitpunkt gemessene Impedanz,  $Z_0$  die Impedanz der Hintergrundmessung am Start des Experiments. Bei einem Anstieg der Zellzahl nimmt folglich auch der Zellindex durch Erhöhung von  $Z_i$  entsprechend zu.

Vor Beginn der Hintergrundmessung am Anfang eines Proliferationsexperiments wurden zunächst an der fest im Inkubator platzierten Messstation (RTCA DP Analyzer) die Grundeinstellungen des Experiments festgelegt. Hierbei wurde bestimmt, ob an den drei zur Verfügung stehenden Messeinheiten der Messstation drei unabhängige oder, bei Benötigung einer größeren Wellenzahl, ein zusammenhängendes Experiment durchgeführt werden soll. Des Weiteren wurde ein Messintervall von einer Impedanzmessung pro Stunde über fünf Tage eingerichtet und somit die kontinuierliche Verfolgung des Zellindexes mittels Echtzeitmessung direkt im Inkubator ermöglicht. Im Anschluss an die Festlegung der Experimenteinstellungen wurde in der Hintergrundmessung der mit 100µl Standardmedium mit 20% FCS pro Well gefüllten Mikrotiterplatten (E-plate 16) die Hintergrundimpedanz des Kulturmediums  $Z_0$  als Referenzwert für den Zellindex ermittelt.

Danach wurden die Mikrotiterplatten nochmals kurzfristig aus der Messstation entnommen und weitere 100µl Standardmedium mit 20% FCS pro Well sowie mit MSCs in einer Dichte von 0,02 Millionen Zellen/ml zugegeben. Ziel war eine initiale Bodenbedeckung von 10-25%, die über eine parallele Aussaat einer 96-Well-Nunc-Platte im Cellscreen überprüft wurde. Direkt nach Aussaat der MSCs wurden die Mikrotiterplatten (E-plate 16) zurück auf ihre Messeinheit im Inkubator gestellt und die erste Impedanzmessung  $Z_1$  vorgenommen. Die Platten verblieben nun unter fünftägiger Messung in 60-minütigen Intervallen, mit Ausnahme von Mediumwechsel und Zytokinstimulation am Folgetag (siehe 3.2.3.), in der Messstation. Zum Ausschluss systematischer Effekte und Störvariablen im Versuchsaufbau wurde bei Experimenten, die nur eine Messeinheit der drei benötigten, diese grundsätzlich zufällig gewählt. Ebenso wurden, entsprechend dem Aufbau der Cellscreenversuche, immer vier Vertiefungen gleich stimuliert und diese ebenfalls zufällig auf der E-plate 16 verteilt.

Nach Beendigung der letzten Impedanzmessung wurde der über die angeschlossene RTCA- (Real-Time Cell Analysis) Software berechnete Zellindex für jeden Messzeitpunkt in ein Diagramm über die Zeit eingetragen, auf den Zeitpunkt der Stimulation normiert und die Mittelwerte für die jeweils vier gleich stimulierten Vertiefungen berechnet (s. Abbildung 15).



**Abbildung 15:**

**A)** aus dem RTCA DP Handbuch von Roche, Version November 2009, Seite 23, Figure 5. Darstellung der dauerhaft im Inkubator lokalisierten Messstation (RTCA DP Analyzer) mit den 3 einzelnen Messeinheiten. Diese können sowohl separat für drei einzelne Experimente, als auch zusammenhängend für ein großes Experiment verwendet werden.

**B)** Darstellung des auf den Zeitpunkt der Stimulation normierten Zellindexes (Ordinate) gegenüber der Zeit in h (Abszisse). Die rote Kurve stellt die Zellindizes der unbehandelten Kontroll-MSCs dar, die grüne Kurve die der hier exemplarisch mit TNF- $\alpha$  stimulierten MSCs über die Zeit. Die Einzelwerte der jeweils vier gleich behandelten Vertiefungen wurden hierbei gemittelt und in einer Kurve zusammengefasst. Der Stimulationszeitpunkt wird durch die schwarze, vertikale Linie verkörpert. Zu diesem Zeitpunkt wurden die parallel erfassten Impedanzmessungen aller Vertiefungen auf eine gemeinsame Ausgangsbasis normiert. Durch den gemeinsamen Startpunkt zu Beginn der Zytokinwirkung konnten Unterschiede in der folgenden Proliferation sofort erfasst und mit der Kontrolle verglichen werden.

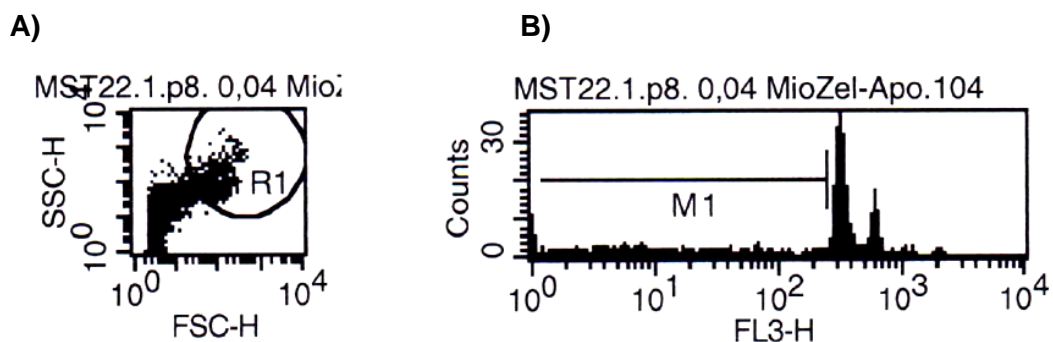
### 3.2.6. Bestimmung der Apoptoserate mittels Durchflusszytometrie

In der Durchflusszytometrie (FACS – Fluorescence Activated Cell Sorting) wird durch Anregung von markierten Zellen durch einen fokussierten Laserstrahl von diesen emittiertes Fluoreszenzlicht detektiert und gleichzeitig eine Lichtstreuung erzeugt. Diese wird weiter in ein Vorwärtsstreulicht (FSC – Forward Scatter), das v.a. mit dem Zellvolumen korreliert und in ein Seitwärtsstreulicht (SSC – Sideward Scatter), das v.a. von der Zellgranularität, Größe und Struktur des Zellkerns beeinflusst wird, untergliedert.

Um den Einfluss der pro-inflammatorischen Zytokine auf die Apoptose von mesenchymalen Stromazellen aus dem Trachealsekret Frühgeborener zu untersuchen, wurde die Färbemethode nach Nicoletti (Nicoletti, Migliorati et al. 1991) verwendet. Dazu wurde der Zellüberstand der 24 Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (s. 3.2.3.) in 1,5ml Reaktionsgefäße überführt, 5 Minuten bei 2000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das im Reaktionsgefäß verbliebene Pellet bestand somit aus losgelösten lebenden und toten Zellen, sowie Zelldetritus. Auf die unbedeckten MSCs in der Mikrotiterplatte wurde pro Vertiefung 300 $\mu$ l Nicolettipuffer (s. 3.1.4., Tab. 3) für 15 Minuten

bei 4°C gegeben, so die Zellmembranen lysiert und die Kerne freigesetzt. Diese Suspension wurde in die entsprechenden 1,5ml Reaktionsgefäße mit den abzentrifugierten Zellbestandteilen überführt und die dadurch wieder vollständig vereinten zellulären Anteile mit 50µg/ml Propidiumiodid gefärbt. Propidiumiodid interkaliert in die DNA des Zellkerns und kann somit genutzt werden, apoptotische von vitalen Zellen zu unterscheiden, da der programmierte Zelltod von einer ausgedehnten DNA Fragmentierung begleitet wird. Aufgrund dessen weisen die gefärbten, hypodiploiden, apoptotischen Zellen eine geringere Fluoreszenzintensität auf als normale diploide Zellen. Im Histogramm präsentiert sich daher ein sub-G0/G1 Peak.

Die so erstellten Daten wurden mit Hilfe der Cell Quest Pro Software (BD Bioscience) analysiert (s. Abbildung 16). Die Zahl der apoptotischen Zellen wurde mittels absoluter Apoptoserate quantifiziert. Die absolute Apoptoserate stellte hierbei den Anteil der apoptotischen MSCs an allen MSCs in % dar.



**Abbildung 16:** Ermittlung der Apoptoserate mittels Durchflusszytometrie

Die in **16 A** im Dot Plot in R1 markierten Zellkerne wurden zur Bestimmung der Apoptoserate herangezogen. Das Histogramm (**16 B**) stellt die MSCs im FL3-H Kanal dar, der die Fluoreszenzintensität des Propidiumiodids erfasst. M1 enthält die Fraktion der apoptotischen Zellen.

### 3.2.7. Proteinbiochemie – Western Blot

#### 3.2.7.1. Herstellung von Zelllysaten

Zelllysate zur Western Blot Analyse wurden aus MSC-Kulturen gewonnen, die, wie unter 3.2.3. beschrieben, zuvor auf 6-Well-Platten ausgesät und nach standardisiertem Schema mit den Zytokinen IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 und TGF- $\beta$ 1 stimuliert worden waren. Einige Vertiefungen wurden im Rahmen von Kombinationsversuchen mit TGF- $\beta$ 1 und einem weiteren Zytokin stimuliert.

Die adhärennten Zellen wurden aus der Mikrotiterplatte mit 300µl warmem Trypsin/Well gelöst und in 1,5ml Reaktionsgefäße überführt, in die zuvor bereits je 600µl Medium aus

der entsprechenden Vertiefung der Mikrotiterplatte vorgelegt worden waren. Die Reaktionsgefäße wurden nun 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die am Gefäßboden verbliebenen Zellen wurden in je 100µl 1xSDS-Lysepuffer mit 1% 1xProteinase-Inhibitor-Cocktail und 10% Natriumorthovanadat (5 mM) als Phosphataseinhibitor aufgenommen und somit vollständig lysiert. Die hierbei aus dem Zellkern freigesetzte hochviskose DNA führte zu einer stark zähflüssigen Konsistenz der Probe und machte eine Wiederverflüssigung durch DNA-Fragmentierung im Ultraschall nötig, um die Zellysate problemlos in der nachfolgenden SDS-PAGE auf das Gel auftragen zu können. Zur DNA-Fragmentierung wurde jedes Zellysate im Ultraschallgerät (Branson Digital 250-D) einer Amplitude von 10%, einer Impulslänge von 0,1 Sekunde und insgesamt 20 Ultraschallstößen ausgesetzt. Im Anschluss wurden die Lysate, die bis jetzt während allen Arbeitsschritten auf Eis gelagert waren, 5 Minuten auf 95°C erhitzt und so die Proteine denaturiert.

Die auf diese Weise aufbereiteten Zellysate dienten nun zur Analyse der Proteine  $\alpha$ -SMA, GAPDH, p-Smad2 und p-Smad3, bei denen eine Trennung von Kern und Zytosol nicht notwendig ist, um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten.

Zur spezifischen Untersuchung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ Bp65 wurde zu den wie oben abzentrifugierten Zellpellets der Zellysepuffer "Kern A", der zwar die Zellmembranen zerstört, jedoch die Kernmembran verschont, zusammen mit den Protease- und Phosphataseinhibitoren zugegeben. Die Lysate wurden nun 15 Minuten auf Eis belassen und in dieser Zeit dreimal gut vermischt. Anschließend wurden die 1,5ml Reaktionsgefäße 1 Minute bei 10000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in weitere Reaktionsgefäße überführt, mit 1xLämmli versetzt und 5 Minuten bei 95°C gekocht. Die verbliebenen Kernpellets wurden in "Kern B" gelöst, welches die Kernmembranen zerstört. Anschließend wurde ebenfalls 1xLämmli mit Protease- und Phosphataseinhibitoren zugegeben. Die Lysate wurden bei gleichbleibenden Einstellungen mit Ultraschall behandelt und anschließend für 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Auf diese Weise konnte die nukleäre Akkumulation des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ Bp65 nach Zytokinstimulation mit Hilfe der Kernfraktion, im Gegensatz zu obiger unfraktionierter Zellyse, exakt bestimmt werden.

### **3.2.7.2. Protein SDS-PAGE**

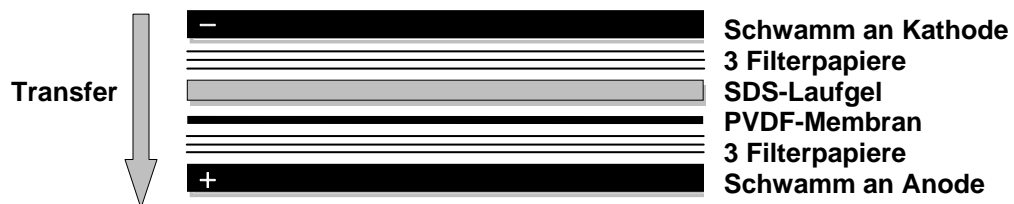
Mit Hilfe der Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine nach ihrer Größe und Ladung im elektrischen Feld aufgetrennt. Hierfür wurde ein Polyacrylamidgel als Trennmedium und SDS (Natrium-Dodecylsulfat) als

anionisches Tensid verwendet, das an die im Zellysat enthaltenen Proteine bindet und ihnen eine negative Ladung verleiht. Wird nun Spannung angelegt, wandern die Proteine, deren Eigenladung durch das SDS überdeckt wurde, entsprechend ihrer Größe und Negativität der Ladung unterschiedlich schnell Richtung Anode und trennen sich dementsprechend auf.

Für die Experimente wurden 12% Polyacrylamid-Trenngele und 5% Sammelgele mit einer Geldicke von 1,5mm verwendet. Von den 15 Taschen des Gels wurde in die erste 3µl Marker gegeben, um die Proteine anhand ihrer Größe identifizieren zu können. Die restlichen Taschen enthielten jeweils 20µl Zellysat. Anschließend wurde für die ersten 30 Minuten eine Spannung von 80V angelegt. Während dieser Zeit passierten die Proteine das Sammelgel und wurden dort aufkonzentriert. Dies ermöglichte eine hohe Trennschärfe der Banden. Im Trenngel wurde die Spannung für ungefähr 1,5h auf 160V erhöht. Während der gesamten Durchführung der SDS-PAGE standen die Laufkammern auf Eis.

### 3.2.7.3. Wet Blot

Der sich anschließende Wet Blot diente dazu, die Proteine aus dem Laufgel senkrecht auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran zu übertragen. Dazu wurde ein Stapel aus drei in Transferpuffer getränkten Whatman-Filterpapieren verwendet, auf den eine PVDF-Membran gelegt wurde. Auf diese wurden das 10 Minuten in Transferpuffer geschwenkte Laufgel und darauf wiederum drei mit Transferpuffer getränkte Whatman-Filterpapiere geschichtet (s. Abbildung 17). Die PVDF-Membran wurde vor Verwendung mittels Ethanol aktiviert und anschließend 2 Minuten in destilliertem Wasser und 5 Minuten in Transferpuffer geschwenkt. Der fertige Stapel wurde zur Vermeidung von Übertragungsfehlern durch Luftblasen glattgestrichen und in eine Blotzelle eingeklemmt. An die mit Transferpuffer gefüllten Kammern wurde jeweils eine Spannung von 200mA für 3h angelegt.

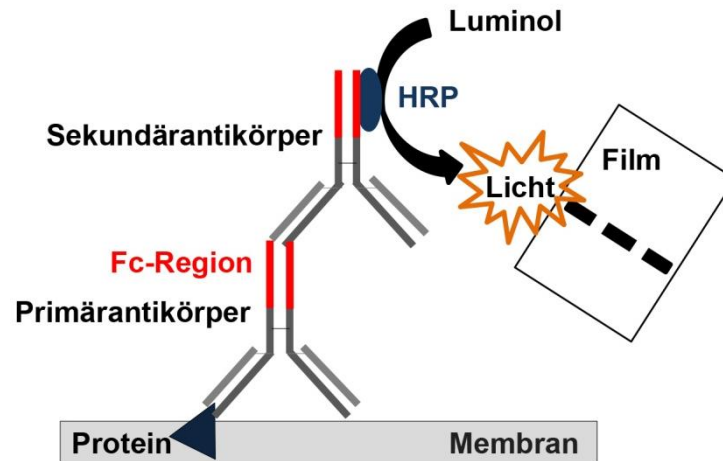


**Abbildung 17:** Darstellung des "Sandwich-Prinzips" beim Aufbau des Wet-Blot Transfersystems. Die Proteine werden hierbei senkrecht zum elektrischen Feld der SDS-PAGE Richtung Anode auf die PVDF-Membran übertragen.

Nach dem Transfer wurden die Membranen, zur Reduktion unspezifischer Antikörperbindungen in den folgenden Schritten, zunächst 30 Minuten in 5% Milchpulver in TBS/T geschwenkt und anschließend nochmal für 3 x 10 Minuten in reinem TBS/T gewaschen.

#### **3.2.7.4. Immundetektion und Quantifizierung der Proteinmenge**

Zur Identifikation der Proteinbanden auf der PVDF-Membran wurde das Verfahren der Immundetektion verwendet, bei dem die Proteine durch eine antikörpervermittelte Chemilumineszenzreaktion visualisiert werden (s. Abbildung 18). Hierzu fand zunächst über Nacht bei 4°C eine Inkubation der Membranen mit jeweils einem bestimmten Primärantikörper (s. 3.1.7., Tabelle 6) statt. Damit die mono- oder polyklonal gewonnenen Primärantikörper dabei gleichmäßig an die spezifischen Epitope ihres Proteins binden können, wurden die Membranen während der Inkubationszeit in 50ml Zentrifugenröhrchen (Falcon), welche je 5ml Primärantikörperverdünnung enthielten, gelegt und diese zur gleichmäßigen Benetzung der Membranen auf einem Rollator (Rollermixer SRT9) gedreht. Am nächsten Tag wurden unspezifische Bindungen durch einen 3 x 10-minütigen Waschschrift in reinem TBS/T entfernt. Es folgte nun eine weitere, zweistündige Inkubation der Membranen auf einem Rollator bei Raumtemperatur mit einem HRP (Horseradish Peroxidase)-gekoppelten Sekundärantikörper, der an den Fc-Teil der Primärantikörper band. Nach einem weiteren Waschschrift von 3 x 10 Minuten in TBS/T wurden pro Membran 600µl der ECL ("Enhanced Chemilumineszenz") - Entwicklungslösung zugegeben (300µl Lösung A, 300µl Lösung B). ECL enthält Luminol, einen Chemilumineszenz-Farbstoff, der von der sekundärantikörpergekoppelten Peroxidase als Substrat erkannt und oxidiert wird. Bei dieser Oxidationsreaktion kommt es zur Emission sichtbaren, bläulichen Lichts, das auf einem aufgelegten Röntgenfilm, nach Entwicklung in der Dunkelkammer, schwarze Banden hinterlässt. Die Intensität der Schwarzfärbung korreliert hierbei mit der Menge des Proteins und der daran gebundenen Sekundärantikörper, die eine entsprechend starke Lichtreaktion vermitteln.



**Abbildung 18:** Prinzip der Immundetektion von Proteinen mittels Antikörper-vermittelter Chemilumineszenzreaktion

Nach abgeschlossener Entwicklung der Membranen in Hinsicht auf ein bestimmtes Protein wurden die Membranen ein zweites Mal mit dem Primärantikörper GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) inkubiert. GAPDH ist ein im Gewebe und daher in allen Proben gleichmäßig, dauerhaft und stark exprimiertes Protein und Enzym der Glykolyse, das daher zum Nachweis einer gleichmäßigen Beladung der Taschen im SDS-Gel verwendet werden kann. Es unterscheidet sich mit seiner Größe von 36kDa deutlich von der Größe der anderen untersuchten Proteine und konnte somit in einer Zweifärbung der gleichen Membran problemlos als Ladekontrolle identifiziert werden. Nach gleichem Prinzip wurde als Ladekontrolle für die Kernlysate in einer Zweifärbung das Gerüstprotein des DNA-Doppelstrangs Histon H1 verwendet. Aufgrund der geringen Histon H1 Expression und der nur schwach detektierbaren Signale wurde im Verlauf jedoch auf das nukleäre Filamentprotein Lamin A als Ladekontrolle für Kernlysate gewechselt.

Zur exakten Quantifizierung der Proteinmenge wurden die Röntgenfilme eingescannt und mit Hilfe der AIDA Image Analyzer Software (Raytest, Straubenhardt) ausgewertet. Hierzu wurden die Proteinbanden mit Analysekästen definierter Größe (siehe Abbildung 19 A) umrandet und innerhalb dieser die Lichtintensität der Pixel als Korrelat zur Proteinmenge gemessen. Helligkeitsunterschiede der Pixel, die eventuell durch Hintergrundrauschen verursacht worden waren, wurden durch die Formel

$$\text{Proteinsignal des Zielproteins } Z_i \text{ bzw. Proteinsignal der Ladekontrolle } L_i = \text{Pixelhelligkeit des jeweiligen Analysekastens} - \text{Pixelhelligkeit des „Background“Kastens}$$

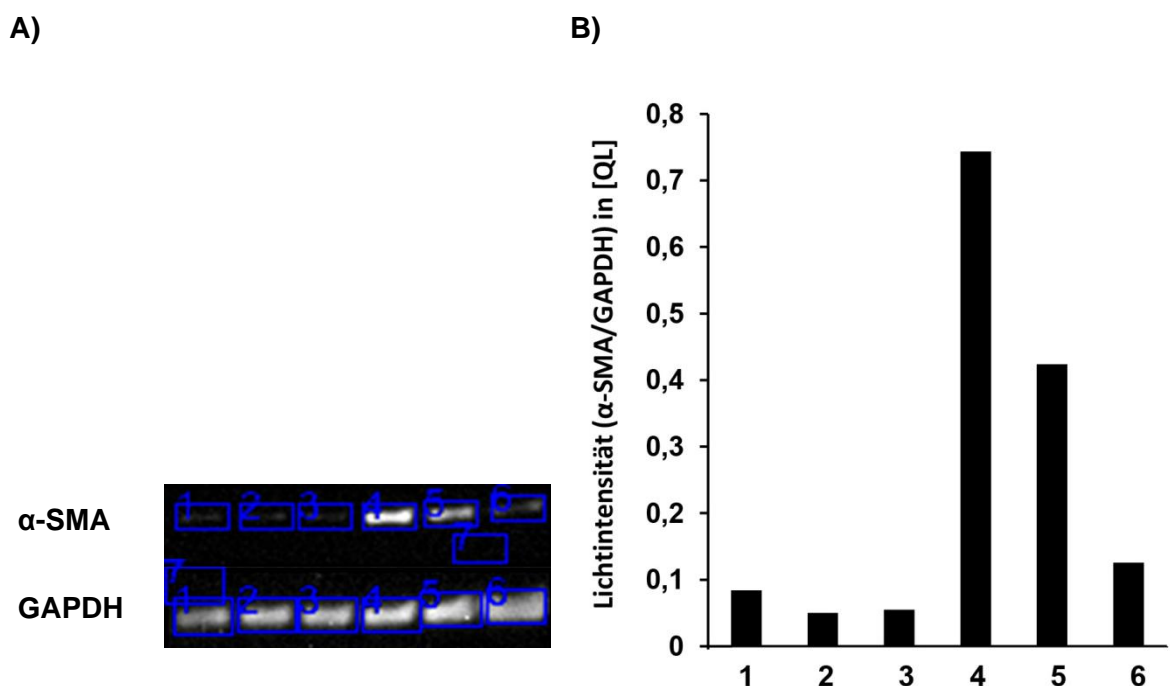
herausgerechnet. Danach wurden die Banden des untersuchten Proteins jeweils mit den entsprechenden Banden der Ladekontrolle nach der Formel



$$\text{quantifiziertes Zielproteinsignal} = \frac{\text{Proteinsignal des Zielproteins } Z_i}{\text{Proteinsignal der Ladekontrolle } L_i}$$

ins Verhältnis gesetzt. Die quantifizierte Lichtintensität (quantifiziertes Zielproteinsignal) wurde im Anschluss auf der y-Achse der erstellten Diagramme aufgetragen (s. Abbildung 19 B).

Dieses Quantifizierungsverfahren ermöglichte das Herausrechnen selbst feinsten Ladeunterschiede. Somit konnte die Regulation der untersuchten Proteine nach Zytokinstimulation sehr exakt auf die Wirkung derselben zurückgeführt werden.



**Abbildung 19:**

**A)** Darstellung der Protein-Analysekästchen 1 - 6 und des "Background"-Kästchens 7 (1 = Kontrolle, 2 = IL-1 $\beta$ , 3 = TNF- $\alpha$ , 4 = TGF- $\beta$ 1, 5 = IL-1 $\beta$  + TGF- $\beta$ 1, 6 = TNF- $\alpha$  + TGF- $\beta$ 1). Innerhalb dieser Kästchen wurden die Pixel an Hand der Intensität ihrer Helligkeit ausgewertet.

**B)** Darstellung des nach obigen Formeln quantifizierten und auf die Ladekontrolle standardisierten  $\alpha$ -SMA Signals im Säulendiagramm. Für jede  $\alpha$ -SMA-Bande 1 - 6 wurde nach Subtraktion der Backgroundintensität der entsprechende Quotient mit der zugehörigen Ladekontrollbande GAPDH 1 - 6 gebildet und das Ergebnis aufgetragen. Das somit errechnete Zielproteinsignal von  $\alpha$ -SMA korreliert in seiner Pixelhelligkeit ([QL] = Quanten Licht) direkt mit der exprimierten Proteinmenge und ist durch die Normierung auf die Ladekontrolle in seiner Regulation direkt auf die Wirkung der eingesetzten Zytokine zurückzuführen. Zahlen 1 - 6 unter den Säulen: 1 = Kontrolle, 2 = IL-1 $\beta$ , 3 = TNF- $\alpha$ , 4 = TGF- $\beta$ 1, 5 = IL-1 $\beta$  + TGF- $\beta$ 1, 6 = TNF- $\alpha$  + TGF- $\beta$ 1.

### 3.2.8. Transfektion der MSCs mittels RNA Interferenz

Die Transfektion ist ein zellbiologisches Verfahren zur Einschleusung genetischer Information in eukaryotische Zellen. Wird die Information nur zeitweilig, z.B. über RNA Interferenz, in die Zellen eingebracht, spricht man von einer "transienten Transfektion". Bei dauerhafter Aufnahme genetischen Materials über codierende Plasmideinschleusung handelt es sich um eine "stabile Transfektion".

Bei der hier angewandten "transienten Transfektion" wurde die genetische Information als si (small interfering) RNA durch Lipofektion in die MSCs eingebracht. Bei diesem Verfahren wird die durch ihre Phosphatgruppen negativ geladene siRNA mit kationischem Lipofektamin komplexiert und in Form von Liposomen via Endozytose in die Zellen aufgenommen. Die im Zytoplasma wieder freigesetzte siRNA interagiert nun mit den ihr komplementären Basen der posttranskriptionellen mRNA des Genoms und verhindert durch Initiierung des proteasomalen Abbaus der mRNA spezifisch die Translation bestimmter Gene.

Am ersten Versuchstag wurden die Zellen standardisiert, wie unter 3.2.3. beschrieben, auf 96-Well-Platten für die anschließende Proliferationsbestimmung im Cellscreen und auf 6-Well-Platten für die nachfolgende Analyse im Western Blot in Standardmedium mit 20% FCS ausgesät. Nach der Adhäsion der Zellen über Nacht fand am zweiten Versuchstag die Lipofektion statt. Hierfür wurden drei 1,5ml Reaktionsgefäße mit folgendem Inhalt vorbereitet:

- Gefäß 1:** DMEM-Medium (mit 1% Glutamin, 1% HEPES, ohne FCS und Antibiotika) mit Lipofektamin 2000
- Gefäß 2:** DMEM-Medium (mit 1% Glutamin, 1% HEPES, ohne FCS und Antibiotika) mit Kontroll-siRNA
- Gefäß 3:** DMEM-Medium (mit 1% Glutamin, 1% HEPES, ohne FCS und Antibiotika) mit Ziel-siRNA (siNFkBp65)

Für einen Versuchsansatz auf 96-Well-Platten wurden in Gefäß 1, 2 und 3 jeweils 12,5µl Medium in obiger Zusammensetzung pro benötigter Vertiefung zugegeben. Zu Gefäß 1 wurde zusätzlich 0,25µl Lipofektamin 2000/Vertiefung zugefügt. Zu Gefäß 2 und 3 wurde zusätzlich siRNA für eine Endkonzentration von 20nM zur anschließenden Messung der Spontanproliferation ohne Zytokinstimulation, bzw. in separaten Versuchen siRNA für eine Endkonzentration von 2nM zur anschließenden Messung der Zellproliferation mit begleitender Zytokinstimulation zugegeben. In den Stimulationsversuchen mit den pro-

inflammatorischen Zytokinen wurde die niedriger dosierte Transfektion gewählt, um die basale NF $\kappa$ B Expression und damit die spontane Zellproliferation möglichst wenig zu beeinflussen.

Für einen Versuchsansatz auf 6-Well-Platten zur anschließenden Western Blot Analyse wurde das Transfektionssetting gemäß der veränderten Oberfläche modifiziert und in Gefäß 1, 2 und 3 jeweils 200 $\mu$ l Medium/Vertiefung zugegeben, zu Gefäß 1 zusätzlich 4 $\mu$ l Lipofektamin 2000/Vertiefung und zu Gefäß 2 und 3 zusätzlich siRNA für eine Endkonzentration von 20nM bzw. 2nM je nach zugehörigem Proliferationsversuch mit bzw. ohne Zytokinstimulation.

Nach fünfminütiger Inkubation der 3 Reaktionsansätze wurde der Inhalt aus Gefäß 1 zu gleichen Teilen auf Gefäß 2 und 3 aufgeteilt und für weitere 30 Minuten inkubiert. Diese Zeit diente zur oben beschriebenen Komplexierung der siRNA mit Lipofektamin 2000. Als Negativkontrolle, "mock", wurde die "AllStars Negative Control siRNA" (Qiagen) verwendet, um unspezifische Effekte und zytotoxische Veränderungen durch den Transfektionsprozess und die siRNA per se identifizieren zu können. Ebenfalls wurde eine Vertiefung als Negativkontrolle vollständig unbehandelt belassen.

Während der 30-minütigen Inkubationszeit der Reagenzien wurde auf den Mikrotiterplatten der MSCs das Standardmedium von der Aussaat mit 20% FCS durch 50 $\mu$ l/Vertiefung auf den 96-Well-Platten und 800 $\mu$ l/Vertiefung auf den 6-Well-Platten DMEM Medium ohne Antibiotika und FCS, aber mit Supplementierung von 2mM Glutamin und 10mM HEPES ersetzt. Danach wurden die siRNA-Liposomen-Gemische aus Gefäß 2 und 3 mit 25 $\mu$ l bzw. 400 $\mu$ l pro Vertiefung je nach Plattenformat auf die MSCs gegeben und die Mikrotiterplatten 3h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden zusätzlich in jede Vertiefung 200 $\mu$ l bzw. 4ml, je nach Plattenformat, DMEM Medium mit 10% FCS, ohne Antibiotika und mit je 2mM Glutamin und 10mM HEPES gegeben.

Am dritten Versuchstag wurde das Medium gewechselt und 100 $\mu$ l/Vertiefung im 96-Well-Format und 2ml/pro Vertiefung im 6-Well-Format Standardmedium mit 10% FCS verwendet. Im Anschluss wurde auf den 96-Well-Platten die erste Proliferationsbestimmung vorgenommen. Bei der Versuchsreihe mit Zytokinstimulation wurden zusätzlich 6h nach Mediumwechsel alle Mikrotiterplatten mit den pro-inflammatorischen Zytokinen stimuliert. Die siRNA gegen NF $\kappa$ Bp65 hatte folglich bis zum Stimulationszeitpunkt 24h Zeit, um mit dem NF $\kappa$ B-Signalweg zu interferieren. Weitere Proliferationsmessungen wurden im 24h-Rhythmus im Cellscreen durchgeführt und somit der Interaktionseffekt zwischen siRNA und dem NF $\kappa$ B-Signalweg auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen aufgezeichnet.

Auf den 6-Well-Platten wurden 2h nach Stimulation für die Untersuchung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ Bp65 und 48h nach Stimulation für die Untersuchung des zytoskelettalen Proteins  $\alpha$ -SMA Zellpellets zur Analyse im Western Blot gewonnen.

### 3.2.9. Statistische Methoden

Um die statistische Signifikanz der Proliferationsmessungen zu berechnen, wurden alle Messwerte gleich stimulierter Vertiefungen einer Zellkultur, sowie alle an einer identischen MSC-Kultur durchgeführten Einzelversuche gemittelt und geprüft, ob sich die mittlere Differenz zweier verbundener Stichproben signifikant von Null unterscheidet (gepaarter t-Test nach Student). Zum Vergleich von mehr als zwei Stichproben wurde die Varianzanalyse ANOVA ("**A**nalysis **o**f **V**ariance"; SigmaStat, Jandel Scientific) angewendet. Des Weiteren wurde grundsätzlich eine Adjustierung für multiples Testen (nach Bonferoni) vorgenommen. Eine statistische Analyse verschiedener MSC-Kulturen unter identischen experimentellen Bedingungen erfolgte u.a. mit Hilfe eines gemischten, linearen Modells mit Random Effekt (Schätzung mittels R Package lme4 [1]), mittels Wilcoxon Signed Rank Test oder ebenfalls mittels gepaartem t-Test nach Student. Diese kulturübergreifenden Analysen wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Jan Gertheiss, Technische Universität Clausthal, Institut für Angewandte Stochastik und Operations Research/Gertheiss Groll Consulting durchgeführt. Hierfür wurde für alle Berechnungen das Statistik-Programm R [3] angewendet.

Das statistische Signifikanzniveau wurde für alle Analysen bei  $p < 0,05$  festgelegt. Unterschiede mit einer dementsprechend niedrigen Fehlerwahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurden daher als statistisch signifikant bezeichnet und mit \* markiert. Lag das Signifikanzniveau bei  $p < 0,01$  wurde eine Markierung mit \*\* und bei einem Signifikanzniveau mit  $p < 0,001$  mit \*\*\* angebracht.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Einfluss der BPD-assoziierten Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 und TGF- $\beta$ 1 auf die phänotypischen Eigenschaften von MSCs aus dem Trachealsekret Frühgeborener**

Zwischen der Präsenz von mesenchymalen Stromazellen (MSC - engl.: „mesenchymal stromal cell“) im Trachealsekret Frühgeborener und der Entwicklung einer bronchopulmonalen Dysplasie, der Dauer der Beatmung und dem Sauerstoffbedarf des jeweiligen Kindes konnte ein bedeutender Zusammenhang nachgewiesen werden (Hennrick, Keeton et al. 2007, Popova, Bozyk et al. 2010). In der vorgelegten Arbeit wurden diese Zellen aus dem Trachealsekret beatmeter Frühgeborener mit einem Gestationsalter unter 29+0 vollendeten Schwangerschaftswochen isoliert (s. 1.2.4. und 3.2.2.1.). In Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass nicht, wie bei Popova et al. beschrieben, die alleinige Präsenz von MSCs im Trachealsekret mit dem Auftreten der BPD assoziiert ist (Popova, Bozyk et al. 2010), sondern, dass eine Dysregulation des Phänotyps bei den Kindern vorliegt, die später eine schwere Form der BPD entwickeln. Das Ausmaß der Dysregulation korrelierte hierbei mit dem Schweregrad der BPD: Das Vorliegen von MSCs mit hoher Spontanproliferation, hoher basaler Expression des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B und geringem intrazellulären Gehalt des zytoskelettalen Proteins  $\alpha$ -SMA war dabei mit einem schlechteren pulmonalen Outcome assoziiert, als die Präsenz von MSCs mit niedriger Spontanproliferation, gleichzeitig höherem intrazellulären Gehalt von  $\alpha$ -SMA und niedriger basaler Expression von NF $\kappa$ B (Reicherzer et al. 2016).

Da die pulmonale Inflamationsreaktion die zentrale Dysregulation in der Pathogenese der BPD darstellt (s. 1.2.3.), ist es besonders interessant einen möglichen Zusammenhang zwischen der Dysregulation der phänotypischen Eigenschaften der MSCs und dem Entzündungsprozess als potentielle Ursache zu überprüfen. Im Folgenden wurde daher die Wirkung der in Vorstudien durch andere Arbeitsgruppen identifizierten, führenden pro-inflammatorischen Zytokine der pulmonalen Inflamationsreaktion, Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Tumor Necrosis Factor - alpha (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8) (Bose, Dammann et al. 2008, Ambalavanan, Carlo et al. 2009) auf die MSCs untersucht. Insbesondere wurden die Effekte auf das Apoptose- und Proliferationsverhalten der MSCs sowie auf die Expression des Transkriptionsfaktors Nuclear Factor- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) und die Regulation von  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA) evaluiert.

Zusätzlich zu den pro-inflammatorischen Zytokinen wurde die Wirkung des Transforming Growth Factors - beta1 (TGF- $\beta$ 1) auf die phänotypischen Eigenschaften der MSCs untersucht. Dieser Faktor, der besonders zur Reparatur geschädigten Gewebes dient, führt einerseits bei übermäßiger, reaktiver Freisetzung zur fibrotischen Umstrukturierung des Lungengewebes und wirkt daher sowohl bei der Lungenerkrankung des Frühgeborenen als auch bei Lungenerkrankungen im Erwachsenenalter krankheitsverstärkend (Bartram and Speer 2004), andererseits wirkt TGF- $\beta$ 1 über seinen anti-inflammatorischen Effekt auch protektiv und inhibiert die Synthese der pro-inflammatorischen Zytokine (Bose, Dammann et al. 2008) (s. auch 1.2.3.3.).

Tabelle 8 gibt einen Überblick über die klinischen Charakteristika der Frühgeborenen, deren MSC-Isolate für die nachfolgenden Untersuchungen verwendet wurden.

<b>MSC</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Gestations- Alter [Tage]</b>	<b>Geburts- gewicht [Gramm]</b>	<b>Invasive Beatmung [Tage]</b>	<b>Mechanische Atemunterstüt- zung [Tage]</b>	<b>BPD- Grad</b>
10	weiblich	171	740	18	51	mild
16	männlich	166	560	39	82	mild
19	männlich	176	680	16	65	mild
20	männlich	185	770	30	91	schwer
21	männlich	176	840	30	78	schwer
22	männlich	176	690	45	114	schwer
24	weiblich	170	600	99	208	schwer
25	männlich	189	1050	22	81	schwer
28	männlich	192	850	27	87	schwer
29	männlich	169	550	42	100	moderat
30	männlich	170	650	38	83	moderat
32	weiblich	169	450	1		Tod
34	weiblich	179	540	19	76	moderat
36	weiblich	184	870	1	48	mild
37	weiblich	169	650	24	70	mild
45	weiblich	159	530	50	80	schwer
47	weiblich	178	540	47	91	mild
49	männlich	183	570	29	80	schwer
50	männlich	168	620			Tod
51	männlich	177	760	21	86	moderat
52	männlich	177	710	21	70	moderat
54	weiblich	169	590	19	66	mild

55	weiblich	169	600	30	74	schwer
59	weiblich	175	700	27	80	moderat

**Tabelle 8:** klinische Charakteristika der Frühgeborenen, deren MSC-Isolate für die Studien verwendet wurden.

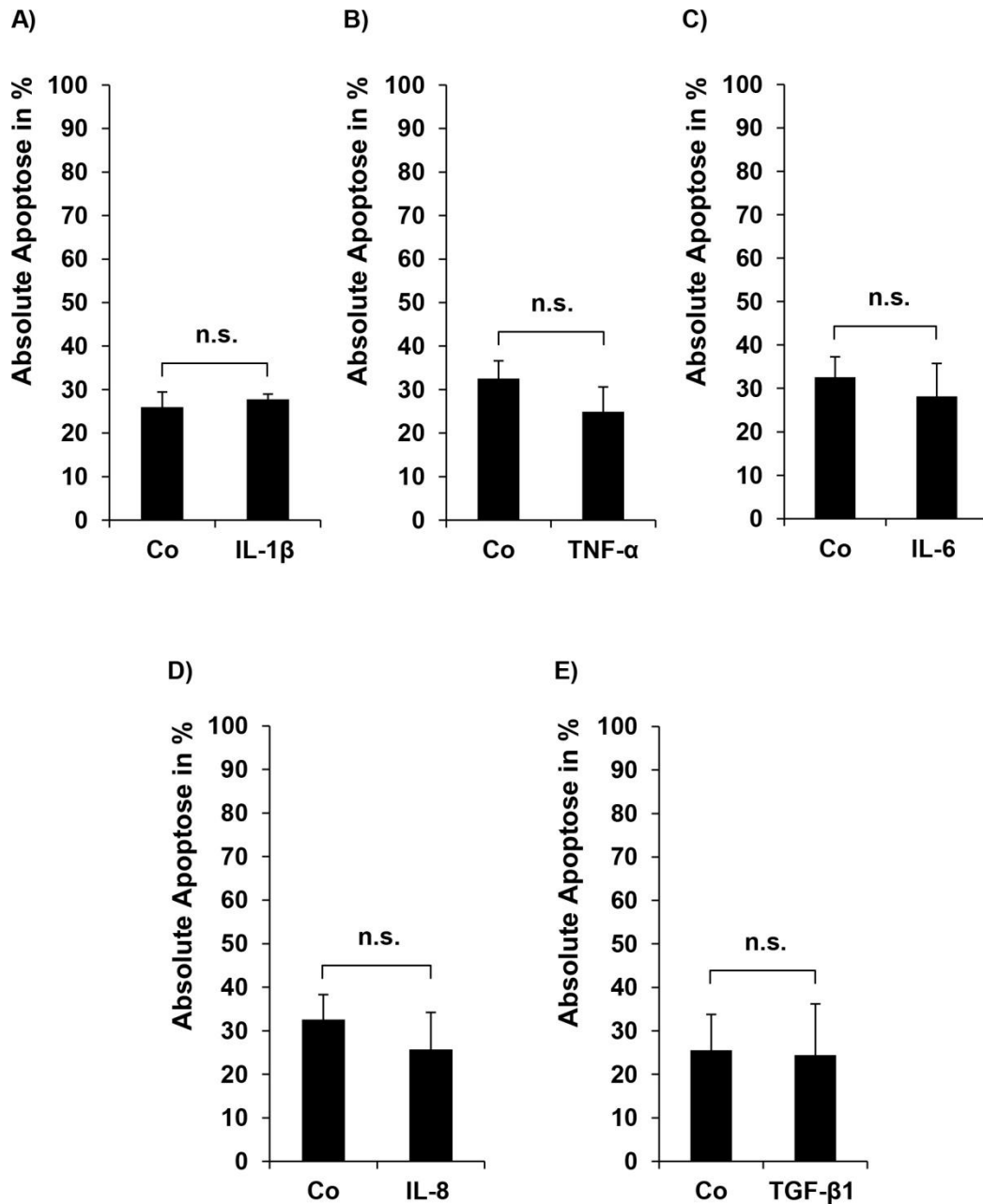
MSC („mesenchymale Stromazelle“ / engl.: „mesenchymal stromal cell“): Kultur eines bestimmten Frühgeborenen mit entsprechender Patientenummer; BPD-Grad: Einteilung nach der Definition nach A. Jobe und E. Bancalari in mild, moderat und schwer (Jobe and Bancalari 2001). Bei Tod des Frühgeborenen existieren keine Angaben zum Ende der Intubations- und Beatmungszeit.

#### 4.1.1. Einfluss von IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 und TGF- $\beta$ 1 auf das Apoptoseverhalten von MSCs

Um den Effekt der pro-inflammatorischen Zytokine auf das Apoptoseverhalten von mesenchymalen Stromazellen aus dem Trachealsekret Frühgeborener zu beurteilen, wurden MSC-Isolate verschiedener Frühgeborener mit unterschiedlichen Schweregraden der BPD mit den Zytokinen IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 und TGF- $\beta$ 1 stimuliert und nach 48h die absolute Apoptoserate (Anteil der apoptotischen MSCs an allen MSCs in %) mit Hilfe der Propidiumiodid-abhängigen Färbemethode nach Nicoletti bestimmt (s. 3.2.3. und 3.2.6.).

Die Stimulation mit IL-1 $\beta$  führte weder bei wiederholten Einzelerperimenten an der identischen MSC-Kultur, noch in Einzelerperimenten an MSC-Isolaten unterschiedlicher Frühgeborener zu einer Änderung der absoluten Apoptoserate im Vergleich zur Kontrolle. Dementsprechend wies die zusammenfassende statistische Analyse aller stimulierten MSC-Kulturen (s. Abb. 20 A) keine statistisch signifikante Änderung der Apoptoserate durch IL-1 $\beta$  auf. Analog zu IL-1 $\beta$  bewirkten weder die Stimulation mit den pro-inflammatorischen Zytokinen TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8, noch die zusätzlich erfolgten Experimente mit TGF- $\beta$ 1 Stimulation eine Änderung der Zellapoptose der MSC-Kulturen (s. Abb. 20 B, C, D, E). Das Ergebnis der kulturübergreifenden, zusammenfassenden Analysen aller durchgeführten Stimulationen zeigte folglich für keines der eingesetzten Zytokine einen signifikanten Unterschied der absoluten Apoptoserate nach Stimulation im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (s. Abb. 20 A, B, C, D, E).

Zusammenfassend kann daher festgehalten werden, dass weder die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8, noch TGF- $\beta$ 1 die Apoptoserate von MSCs aus dem Trachealsekret beatmeter Frühgeborener beeinflussen.



**Abbildung 20:** Kein signifikanter Unterschied der absoluten Apoptoserate nach Stimulation der MSCs mit IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 oder TGF- $\beta$ 1 im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen 48h nach Stimulation verschiedener MSC-Kulturen mit 100ng/ml IL-1 $\beta$  (20 A; n = 4 Experimente), 300ng/ml TNF- $\alpha$  (20 B; n = 6 Experimente), 100ng/ml IL-6 (20 C; n = 5 Experimente), 300ng/ml IL-8 (20 D; n = 3 Experimente) oder 10ng/ml TGF- $\beta$ 1 (20 E; n = 4 Experimente) erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung der absoluten Apoptoserate nach Nicoletti (für Details s. 3.2.3. und 3.2.6.). Die Experimente wurden, nach Berechnung der Mittelwerte identischer MSC-Kulturen, für die statistische Analyse kulturübergreifend zusammengefasst, der Standardfehler berechnet und die statistische Analyse mittels gepaartem t-Test zum Niveau 5% durchgeführt. Signifikant:  $p < 0,05$ ; n.s. = nicht signifikant; Co = Kontrolle.



#### 4.1.2. Einfluss von IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 und TGF- $\beta$ 1 auf das Proliferationsverhalten von MSCs

Da in Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe (s. 1.2.4., Abb. 10) bereits gezeigt werden konnte, dass der Proliferationsindex (Bedeckung zum Zeitpunkt  $t[x]$ /Anfangsbedeckung zum Zeitpunkt  $t[0]$ ) der aus dem Trachealsekret isolierten MSCs direkt mit der Anzahl der Tage invasiver Beatmung und der Schwere der BPD-Erkrankung korreliert (Reicherzer et al. 2010), wurde nun der Einfluss der zentralen Zytokine der pulmonalen Inflammationsreaktion IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 und TGF- $\beta$ 1 auf das Wachstumsverhalten der MSCs untersucht.

Unter standardisierten Bedingungen, die identisch zu den Versuchsbedingungen der Apoptosemessungen bezüglich Aussaat, Mediumwechsel und Zytokinstimulation gewählt wurden (s. 3.2.3.), wurde das MSC-Wachstum, wie unter 3.2.4. beschrieben, mittels automatisierter, repetitiver, lichtmikroskopischer Messung im Cellscreen auf 96-Well-Platten aufgezeichnet. Der durch MSCs bedeckte Anteil der Vertiefungsfläche wurde jeweils in % der gesamten analysierten Vertiefungsfläche abgebildet. Die erste Messung zum Startzeitpunkt  $t[0]$  erfolgte zur Aufzeichnung der initialen Wellbedeckung kurz vor Zytokinstimulation, danach in 24 - stündigen Intervallen zur Detektion Zytokin-induzierter Wachstumsunterschiede.

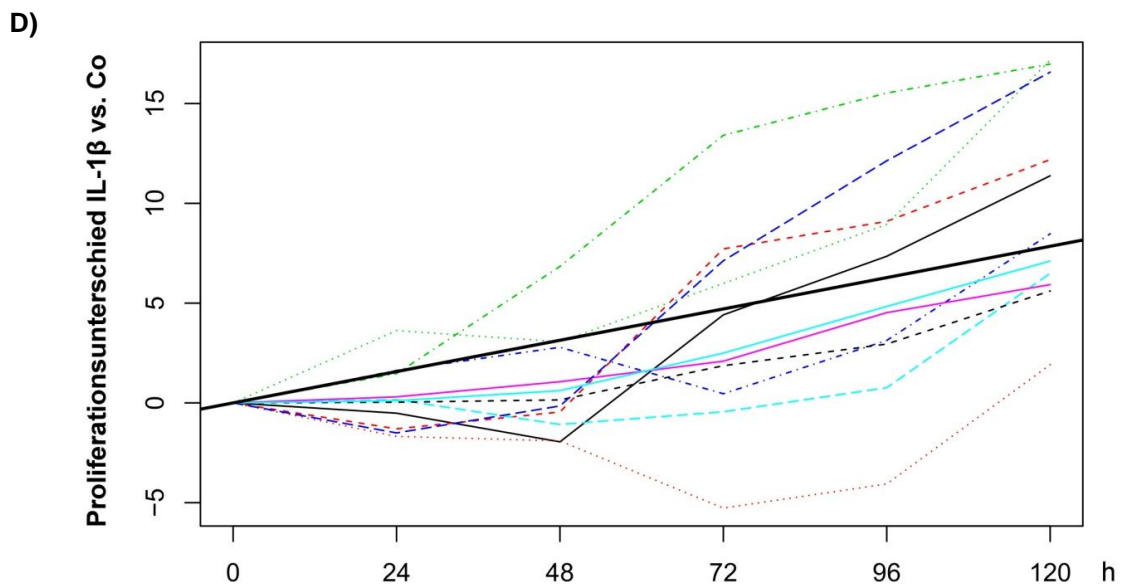
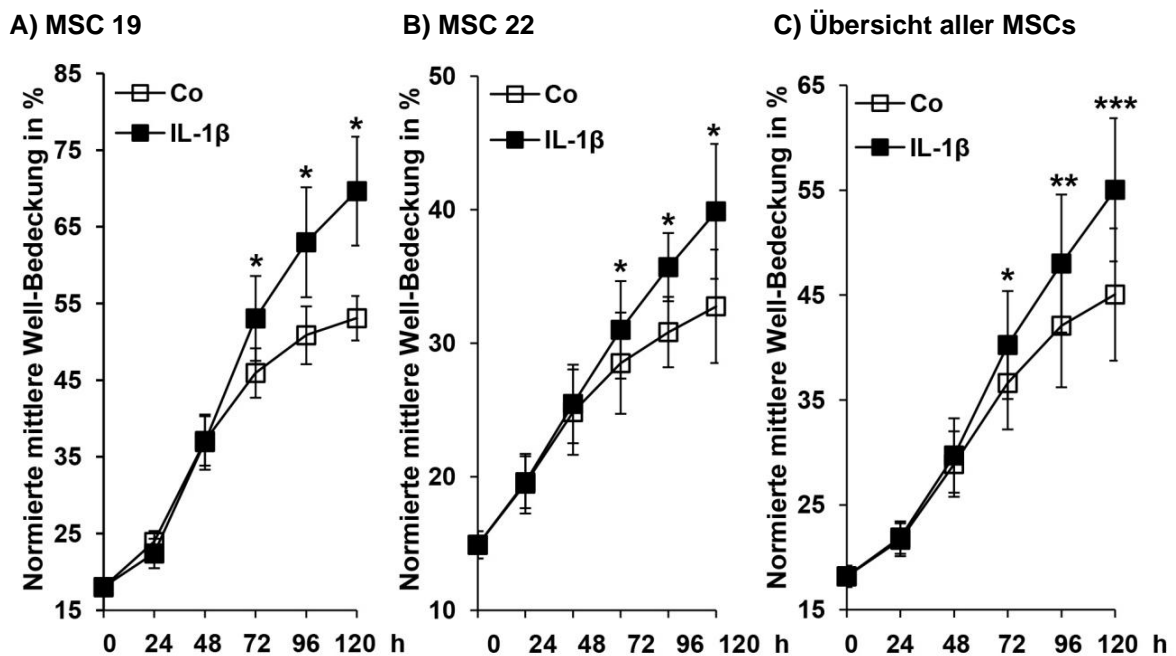
Für jedes Zytokin schlossen die Untersuchungen Stimulationen der Kultur MSC 19 repräsentativ für ein Kind mit milder BPD ein (Abb. 21 A - 25 A) sowie Stimulationen der Kultur MSC 22 repräsentativ für ein Kind mit schwerer BPD (Abb. 21 B - 25 B). Zusätzlich wurden weitere MSC-Isolate verschiedener Frühgeborener stimuliert und das kulturübergreifende Ergebnis aller durchgeführten Stimulationen analysiert (Abb. 21 C - 25 C und 21 D - 25 D) (für klinische Charakteristika der Frühgeborenen s. 4.1., Tab. 8).

Nach Stimulation von MSCs aus dem Trachealsekret Frühgeborener mit dem pro-inflammatorischen Zytokin IL-1 $\beta$  wiesen sowohl die Zellen der Kultur MSC 19 (Abb. 21 A), als auch die Zellen der Kultur MSC 22 (Abb. 21 B) eine beschleunigte Zellproliferation auf, die sich ab dem Zeitpunkt 72h nach Stimulation bis zum Endzeitpunkt 120h nach Stimulation signifikant von der Spontanproliferation der unstimulierten Kontrollzellen unterschied. Zum Endzeitpunkt 120h war die mittlere Flächenbedeckung in den mit IL-1 $\beta$  stimulierten Wells der Kultur MSC 19 (21 A) um 31% bzw. bei MSC 22 (21 B) um 21% höher als die der Kontrollvertiefungen.

Der wachstumsfördernde Effekt des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  konnte auch in den kulturübergreifenden Analysen von Untersuchungen an  $n = 11$  MSC-Kulturen verschiedener Frühgeborener reproduziert werden (21 C und 21 D). Das deutlich beschleunigte Wachstum der mit IL-1 $\beta$  stimulierten Zellen resultierte in einer um 22%

dichteren Wellbedeckung zum Endzeitpunkt 120h (21 C). Zu den Zeitpunkten 72h und 96h nach Stimulation unterschied sich die mittlere Wellbedeckung der stimulierten MSCs signifikant sowie nach 120h mit einem  $p < 0,001$  hochsignifikant von der mittleren Wellbedeckung der Kontrolle (21 C). Ebenfalls führte die stetige Mehrproliferation der stimulierten Zellen gegenüber der zugehörigen Kontrolle über den zeitlichen Verlauf zu einer kontinuierlichen Zunahme des Wachstumsunterschieds "IL-1 $\beta$  vs. Co" für jede MSC-Kultur (21 D; bunte Linien). Ein fester, positiver, kulturübergreifender linearer Zeit-Effekt nach IL-1 $\beta$  Stimulation (21 D; schwarze Linie) konnte nachgewiesen werden und war mit einem  $p < 0,001$  hochsignifikant.

Der proliferationsinduzierende Effekt von IL-1 $\beta$  konnte somit kulturübergreifend an MSC-Kulturen verschiedener Frühgeborener und unabhängig vom Schweregrad der BPD gezeigt werden.



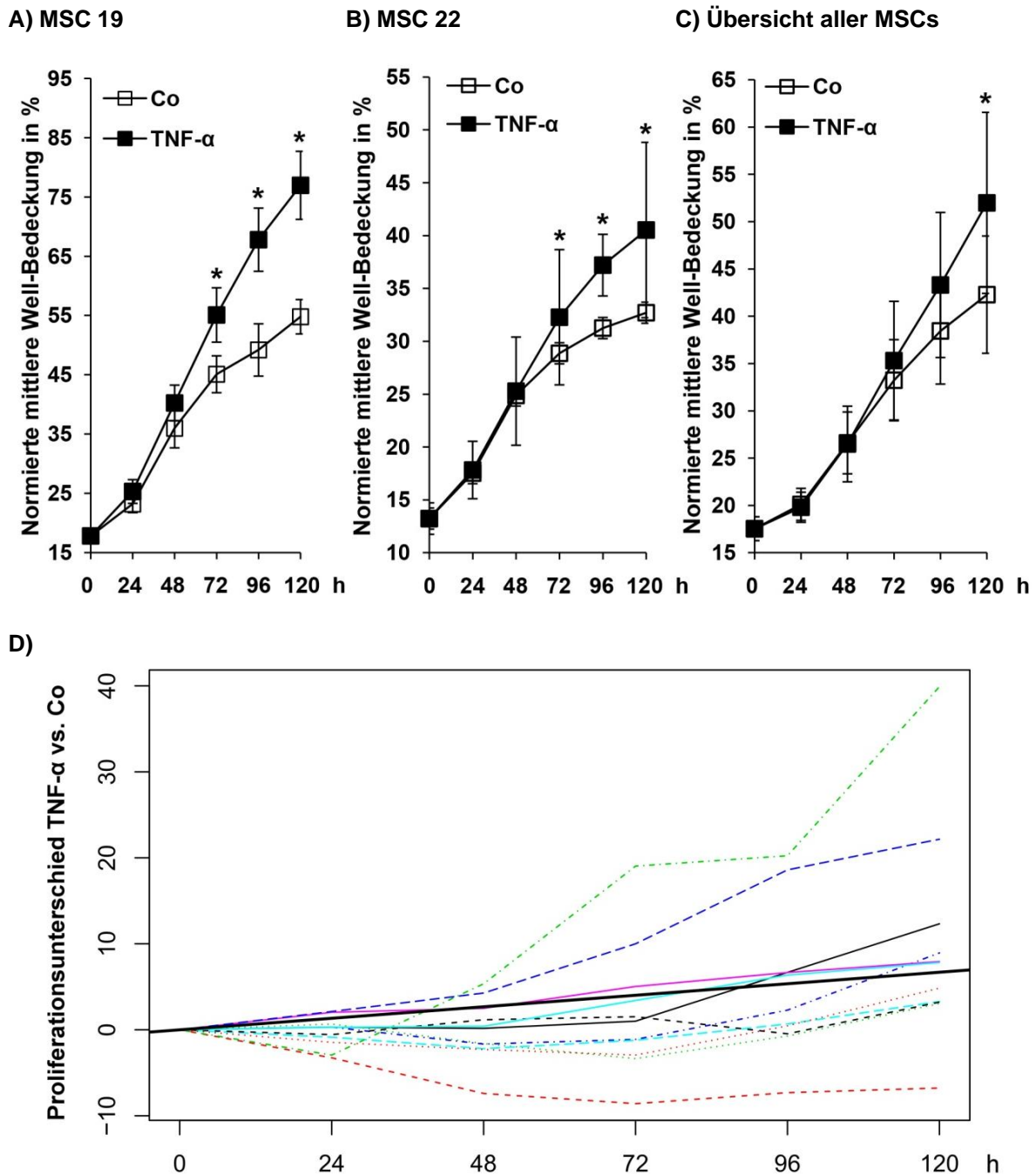
**Abbildung 21:** Steigerung der MSC-Proliferation durch Stimulation mit IL-1 $\beta$ 

Analyse des Wachstumsverhaltens von MSC-Kulturen nach Stimulation mit 100ng/ml IL-1 $\beta$  mittels repetitiver Messung der Flächenbedeckung im Cellscreen. Präsentation der Ergebnisse nach Normierung der Wellbedeckung der stimulierten Zellen auf die Wellbedeckung der Kontrolle zum Startzeitpunkt t[0] (für Details s. 3.2.3. und 3.2.4.).

**21 A** fasst n = 10 Stimulationen an der Kultur MSC 19 zusammen. **21 B** fasst n = 9 Stimulationen an der Kultur MSC 22 zusammen. **21 C** zeigt die kulturübergreifende Analyse von n = 11 Kulturen verschiedener Frühgeborener (MSC 10, 24, 29, 30, 37, 45, 47, 49, 50, 19 und 22). Die statistische Analyse erfolgte in 21 A, 21 B und 21 C nach Bildung der Mittelwerte der Einzelexperimente für jede Zellkultur und Berechnung der Standardfehler zu jedem Zeitpunkt t[0-120]h mit Hilfe des gepaarten t-Tests. Für **21 A - C** gilt die Kennzeichnung signifikanter Unterschiede zum Niveau 5%, 1% bzw. 0,1% mit \*(p<0,05), \*\*(p<0,01), \*\*\*(p<0,001). Die mit \* gekennzeichneten Wachstumsunterschiede "Co vs. IL-1 $\beta$ " zum Zeitpunkt t[x] sind auch nach Bonferoni - Adjustierung für multiples Testen signifikant.

**21 D)** Analyse des Proliferationsunterschieds Zytokin-stimulierter MSCs gegenüber unstimulierten Kontrollzellen durch Berechnung der Wachstumsdifferenz "IL-1 $\beta$  - Co" unter Einschluss aller mit IL-1 $\beta$  stimulierten n = 11 MSC-Kulturen (MSC 10, 24, 29, 30, 37, 45, 47, 49, 50, 19 und 22). Die Stimulationsergebnisse identischer Zellkulturen wurden für jeden Zeitpunkt t[0-120]h gemittelt und ein lineares gemischtes Modell (R Package lme4 [1]) mit festem Zeit-Effekt und Zellkultur-spezifischem Random Slope zur Berücksichtigung der Abhängigkeiten innerhalb einer Zellkultur angepasst. Bunte Linien: pro MSC-Kultur gemittelte Wachstumsdifferenz "IL-1 $\beta$  - Co" über die Zeit. Schwarze dicke Linie: fester linearer Zeit-Effekt (kulturübergreifend), der mit einem p<0,001 statistisch hochsignifikant ist.

Entsprechend der Stimulation mit IL-1 $\beta$  führte TNF- $\alpha$  zu einer signifikant beschleunigten Zunahme der Well-Bedeckung als Zeichen einer erhöhten Wachstumsgeschwindigkeit der stimulierten MSCs im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Für MSC 19 (22 A) und MSC 22 (22 B) zeigte sich der Proliferationsunterschied zu den Zeitpunkten 72h, 96h und 120h nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  dreimalig signifikant. Zum Endzeitpunkt 120h war die mittlere Wellbedeckung der stimulierten Zellen der Kultur MSC 19 um 40%, die der Kultur MSC 22 um 24% dichter als die Wellbedeckung der unstimulierten Kontrolle. Dieses Ergebnis konnte in den kulturübergreifenden Analysen aus n = 11 mit TNF- $\alpha$  stimulierten MSC-Kulturen verschiedener Frühgeborener reproduziert werden: Es war sowohl die absolute Wellbedeckung in den stimulierten Vertiefungen zum Endzeitpunkt 120h mit 23% statistisch signifikant gegenüber den spontan proliferierenden MSCs erhöht (22 C), als auch eine kontinuierliche Zunahme des Proliferationsunterschieds "TNF- $\alpha$  vs. Co" für die stimulierten MSC-Kulturen nachweisbar (22 D; bunte Linien). Ein fester, linearer, positiver Zeit-Effekt konnte kulturübergreifend detektiert werden und war mit einem p<0,05 statistisch signifikant (22 D; schwarze Linie).



**Abbildung 22:** Steigerung der MSC-Proliferation durch Stimulation mit TNF- $\alpha$

Analyse des Wachstumsverhaltens von MSC-Kulturen nach Stimulation mit 300ng/ml TNF- $\alpha$  mittels repetitiver Messung der Flächenbedeckung im Cellscreen. Präsentation der Ergebnisse nach Normierung der Wellbedeckung der stimulierten Zellen auf die Wellbedeckung der Kontrolle zum Startzeitpunkt  $t[0]$  (für Details s. 3.2.3. und 3.2.4.).

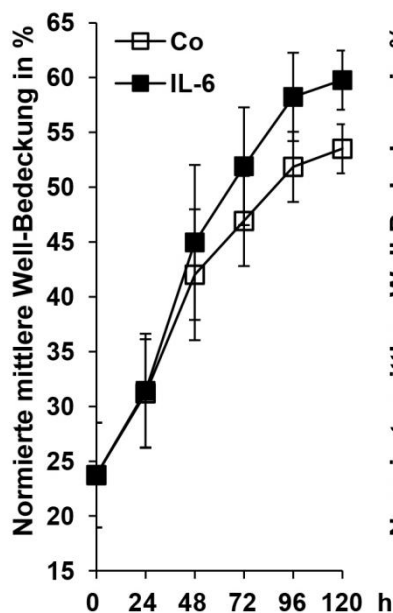
**22 A** fasst  $n = 10$  Stimulationen an der Kultur MSC 19 zusammen. **22 B** fasst  $n = 5$  Stimulationen an der Kultur MSC 22 zusammen. **22 C** zeigt die kulturübergreifende Analyse von  $n = 11$  Kulturen verschiedener Frühgeborener (MSC 10, 24, 29, 30, 37, 45, 47, 49, 50, 19 und 22). Die statistische Analyse erfolgte in 22 A, 22 B und 22 C nach Bildung der Mittelwerte der Einzelerperimente für jede Zellkultur und Berechnung der Standardfehler zu jedem Zeitpunkt  $t[0-120]h$  mit Hilfe des gepaarten t-Tests. Für **22 A - C** gilt die Kennzeichnung signifikanter Unterschiede zum Niveau 5% mit \* ( $p < 0,05$ ). Die mit \* gekennzeichneten Wachstumsunterschiede "Co vs. TNF- $\alpha$ " zum Zeitpunkt  $t[x]$  sind auch nach Bonferoni - Adjustierung für multiples Testen signifikant.

**22 D)** Analyse des Proiferationsunterschieds Zytokin-stimulierter MSCs gegenüber unstimulierten Kontrollzellen durch Berechnung der Wachstumsdifferenz "TNF- $\alpha$  - Co" unter Einschluss aller mit TNF- $\alpha$  stimulierten  $n = 11$  MSC-Kulturen (MSC 10, 24, 29, 30, 37, 45, 47, 49, 50, 19 und 22). Die

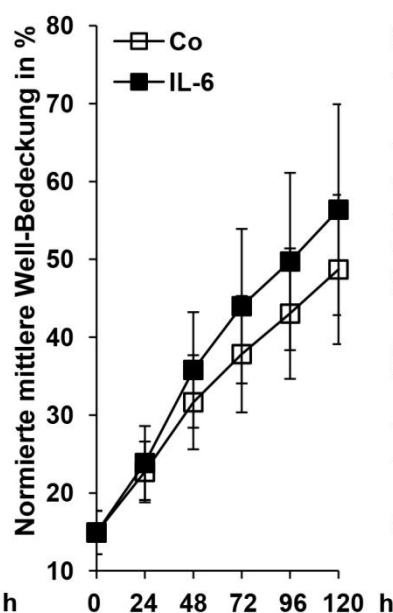
Stimulationsergebnisse identischer Zellkulturen wurden für jeden Zeitpunkt  $t[0-120]h$  gemittelt und ein lineares gemischtes Modell (R Package lme4 [1]) mit festem Zeit-Effekt und Zellkultur-spezifischem Random Slope zur Berücksichtigung der Abhängigkeiten innerhalb einer Zellkultur angepasst. Bunte Linien: pro MSC-Kultur gemittelte Wachstumsdifferenz "TNF- $\alpha$  - Co" über die Zeit. Schwarze dicke Linie: fester linearer Zeit-Effekt (kulturübergreifend), der mit einem  $p < 0,05$  statistisch signifikant ist.

Die Stimulation der Kulturen MSC 19 und MSC 22 mit dem Zytokin IL-6 führte zum Endzeitpunkt 120h mit einer um 17% (23 A/MSC 19) bzw. 16% (23 B/MSC 22) höheren Wellbedeckung der stimulierten Vertiefungen im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls zu einer deutlich, jedoch nicht signifikant beschleunigten Zellproliferation. In der kulturübergreifenden Analyse der absoluten Wellbedeckungen von  $n = 8$  MSC-Kulturen (23 C) war die mittlere Wellbedeckung der mit IL-6 stimulierten Zellen zum Zeitpunkt 120h mit 15% signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht (23 C). Nach Betrachtung jeweils der einzelnen Proliferationsunterschiede der mit IL-6 stimulierten Zellen gegenüber den Kontrollen durch Differenzbildung "IL-6 - Co" (23 D; bunte Linien: Proliferationsunterschiede der einzelnen MSC-Kulturen) ergab sich in Summe ein statistisch signifikanter, kulturübergreifender positiver linearer Zeit-Effekt mit  $p < 0,001$  (23 D; schwarze Linie).

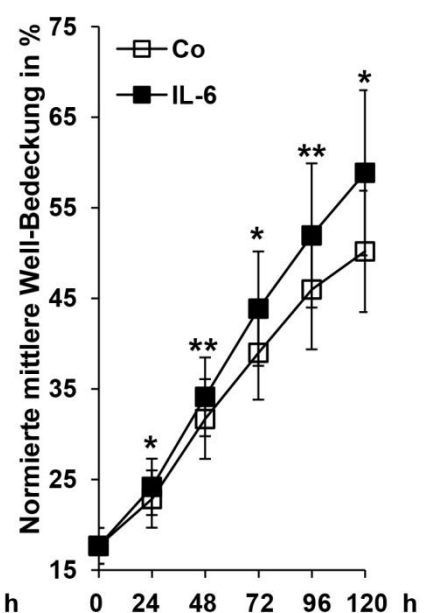
A) MSC 19

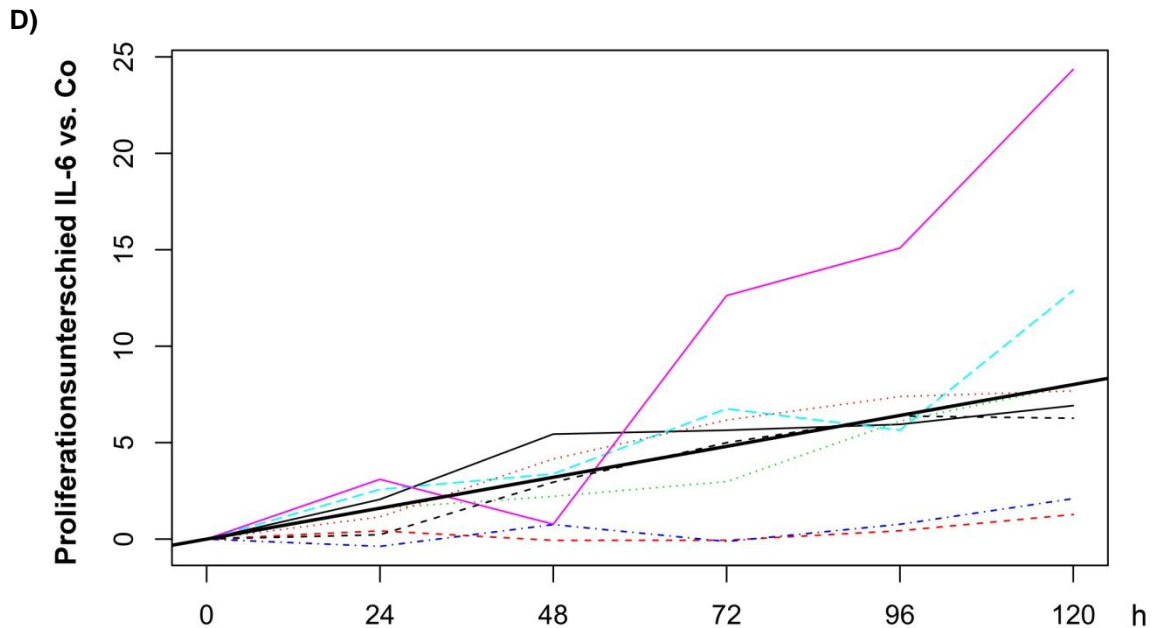


B) MSC 22



C) Übersicht aller MSCs





**Abbildung 23:** Steigerung der MSC-Proliferation durch Stimulation mit IL-6

Analyse des Wachstumsverhaltens von MSC-Kulturen nach Stimulation mit 100ng/ml IL-6 mittels repetitiver Messung der Flächenbedeckung im Cellscreen. Präsentation der Ergebnisse nach Normierung der Wellbedeckung der stimulierten Zellen auf die Wellbedeckung der Kontrolle zum Startzeitpunkt  $t[0]$  (für Details s. 3.2.3. und 3.2.4.).

**23 A** fasst  $n = 5$  Stimulationen an der Kultur MSC 19 zusammen. **23 B** fasst  $n = 6$  Stimulationen an der Kultur MSC 22 zusammen. **23 C** zeigt die kulturübergreifende Analyse von  $n = 8$  Kulturen verschiedener Frühgeborener (MSC 10, 30, 45, 47, 49, 50, 19 und 22). Die statistische Analyse erfolgte in 23 A, 23 B und 23 C nach Bildung der Mittelwerte der Einzelexperimente für jede Zellkultur und Berechnung der Standardfehler zu jedem Zeitpunkt  $t[0-120]h$  mit Hilfe des gepaarten  $t$ -Tests. Für **23 A - C** gilt die Kennzeichnung signifikanter Unterschiede zum Niveau 5% bzw. 1% mit  $*$  ( $p < 0,05$ ) bzw.  $**$  ( $p < 0,01$ ). Die mit  $*$  gekennzeichneten Wachstumsunterschiede "Co vs. IL-6" zum Zeitpunkt  $t[x]$  sind auch nach Bonferoni - Adjustierung für multiples Testen signifikant.

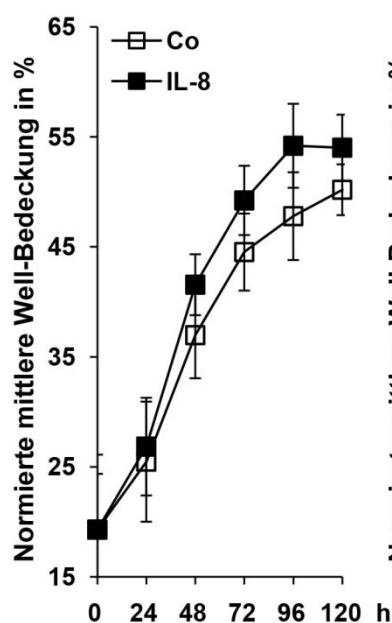
**23 D)** Analyse des Proliferationsunterschieds Zytokin-stimulierter MSCs gegenüber unstimulierten Kontrollzellen durch Berechnung der Wachstumsdifferenz "IL-6 - Co" unter Einschluss aller mit IL-6 stimulierten  $n = 8$  MSC-Kulturen (MSC 10, 30, 45, 47, 49, 50, 19 und 22). Die Stimulationsergebnisse identischer Zellkulturen wurden für jeden Zeitpunkt  $t[0-120]h$  gemittelt und ein lineares gemischtes Modell (R Package lme4 [1]) mit festem Zeit-Effekt und Zellkultur-spezifischem Random Slope zur Berücksichtigung der Abhängigkeiten innerhalb einer Zellkultur angepasst. Bunte Linien: pro MSC-Kultur gemittelte Wachstumsdifferenz "IL-6 - Co" über die Zeit. Schwarze dicke Linie: fester linearer Zeit-Effekt (kulturübergreifend), der mit einem  $p < 0,001$  statistisch hochsignifikant ist.

Bezüglich der MSC-Stimulation mit IL-8 zeigten sich heterogene Ergebnisse. An der Kultur MSC 19 zeigte sich entsprechend dem proliferationsinduzierenden Effekt der bereits untersuchten Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-6 ein stärkeres Zellwachstum der mit IL-8 stimulierten Zellen mit einer um 13% höheren Wellbedeckung 96h nach Stimulation. Diese sank zum Zeitpunkt 120h nach Stimulation durch Stagnierung der Proliferation der stimulierten Zellen auf eine Mehrbedeckung von nur noch 7% ab (24 A). Die Wachstumsunterschiede waren in der statistischen Analyse auf einem Niveau von 5% zu keinem Zeitpunkt signifikant. Im Gegensatz zu MSC 19 konnte an MSC 22 nur bei  $n = 3$  der insgesamt  $n = 7$  eingeschlossenen Stimulationen ein wachstumsfördernder Effekt

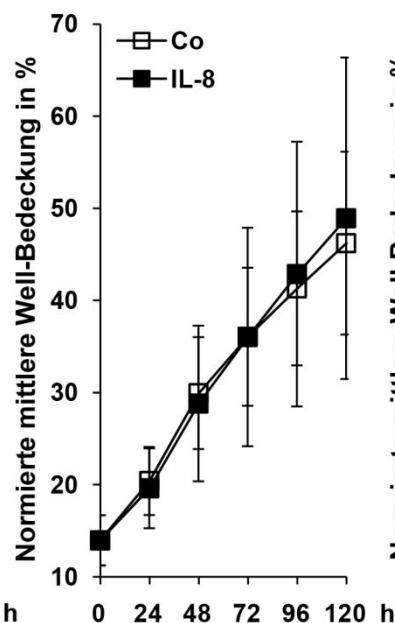
nachgewiesen werden, der in der Summe mit den  $n = 4$  Stimulationen, die keine Mehrproliferation hervorriefen, unten stehendes Bild mit fast deckungsgleich verlaufender Kontrolle "Co" und "IL-8" ergaben (24 B). Da bei den Stimulationen zwei IL-8 Präparationen verwendet worden waren, die sich strukturell in der Aminosäuresequenz unterschieden, wurde zunächst eine Abhängigkeit der Zytokin-Wirksamkeit von der Struktur des rekombinant hergestellten IL-8 vermutet. Allerdings induzierte sowohl Präparation 1 als auch Präparation 2 bei einem Teil der Versuche das MSC-Wachstum, während beide IL-8 Formen bei anderen Versuchen, z.T. auch innerhalb derselben MSC-Kultur, keinen Einfluss auf die Proliferation nahmen. Da für beide Präparationen kein dauerhaft stabiler Wachstumseffekt nachgewiesen werden konnte, erfolgte die gemeinsame Analyse. In der Summe aller stimulierten MSC-Kulturen resultierte ein fast deckungsgleiches Bild der Wellbedeckungen "Co" gegenüber "IL-8" (24 C) mit einem nicht signifikanten kulturübergreifenden Zeit-Effekt bezüglich des Proliferationsunterschieds "IL-8 vs. Co" (schwarze Linie in 24 D).

Insgesamt zeigte sich für IL-8 kein stabiler Effekt auf das Proliferationsverhalten von MSCs, wobei in einzelnen Versuchsserien, analog zu IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-6, ein wachstumsfördernder Effekt nachgewiesen werden konnte. Eine Abhängigkeit der Zytokinwirksamkeit von der Form des rekombinant hergestellten Zytokins IL-8 ist zwar möglich, wurde jedoch nicht weiter verfolgt, da die proliferationsverstärkende Wirkung der Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  klar zu erkennen war und die Arbeit im Weiteren auf die molekulare Untersuchung der Wirkweise dieser beiden Zytokine abzielte.

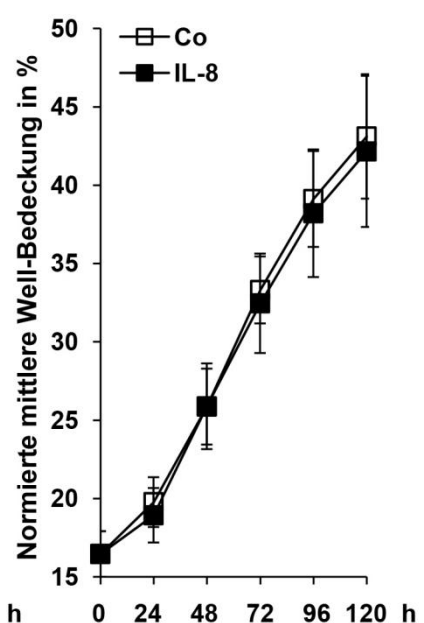
A) MSC 19



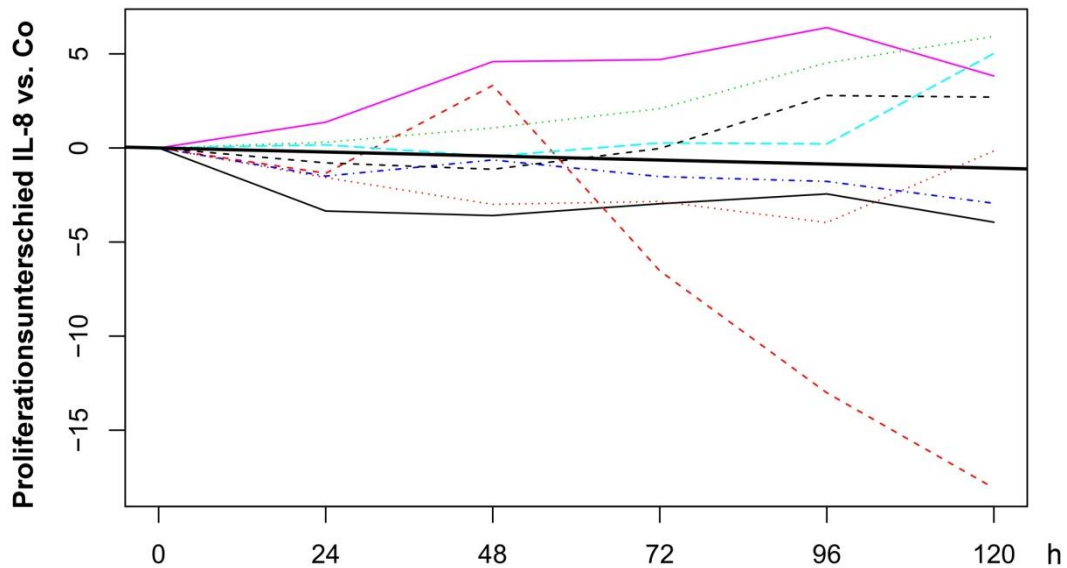
B) MSC 22



C) Übersicht aller MSCs



D)



**Abbildung 24:** Heterogene Proliferationsergebnisse nach Stimulation mit IL-8

Analyse des Wachstumsverhaltens von MSC-Kulturen nach Stimulation mit 300ng/ml IL-8 mittels repetitiver Messung der Flächenbedeckung im Cellscreen. Präsentation der Ergebnisse nach Normierung der Wellbedeckung der stimulierten Zellen auf die Wellbedeckung der Kontrolle zum Startzeitpunkt  $t[0]$  (für Details s. 3.2.3. und 3.2.4.).

**24 A** fasst  $n = 3$  Stimulationen an der Kultur MSC 19 zusammen. **24 B** fasst  $n = 7$  Stimulationen an der Kultur MSC 22 zusammen. **24 C** zeigt die kulturübergreifende Analyse von  $n = 8$  Kulturen verschiedener Frühgeborener (MSC 10, 24, 30, 45, 47, 49, 19 und 22). Die statistische Analyse erfolgte in 24 A, 24 B und 24 C nach Bildung der Mittelwerte der Einzelergebnisse für jede Zellkultur und Berechnung der Standardfehler zu jedem Zeitpunkt  $t[0-120]h$  mit Hilfe des gepaarten t-Tests. Für **24 A - D** gilt das Signifikanzniveau  $*p < 0,05$ .

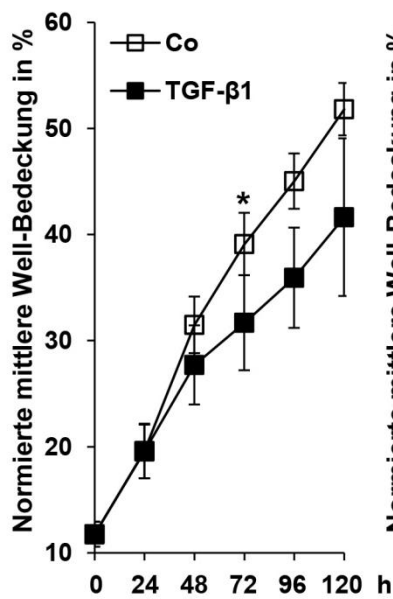
**24 D)** Analyse des Proliferationsunterschieds Zytokin-stimulierter MSCs gegenüber unstimulierten Kontrollzellen durch Berechnung der Wachstumsdifferenz "IL-8 - Co" unter Einschluss aller mit IL-8 stimulierten  $n = 8$  MSC-Kulturen (MSC 10, 24, 30, 45, 47, 49, 19 und 22). Die Stimulationsergebnisse identischer Zellkulturen wurden für jeden Zeitpunkt  $t[0-120]h$  gemittelt und ein lineares gemischtes Modell (R Package lme4 [1]) mit festem Zeit-Effekt und Zellkultur-spezifischem Random Slope zur Berücksichtigung der Abhängigkeiten innerhalb einer Zellkultur angepasst. Bunte Linien: pro MSC-Kultur gemittelte Wachstumsdifferenz "IL-8 - Co" über die Zeit. Schwarze dicke Linie: fester linearer Zeit-Effekt (kulturübergreifend, nicht signifikant).

Abschließend wurden die Effekte des Transforming Growth Factors - beta1 (TGF- $\beta$ 1) auf die MSCs ermittelt. Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Zytokinen, die unter Zellkulturbedingungen zu einer Verstärkung der Zellproliferation führten - vornehmlich IL- $1\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-6, teilweise auch IL-8 - inhibierte TGF- $\beta$ 1 das MSC-Wachstum (s. Abb. 25): Zum Endzeitpunkt 120h war die absolute Wellbedeckung der mit TGF- $\beta$ 1 stimulierten Vertiefungen um 18% (25 A/MSC19) bzw. 20% (25 B/MSC 22) vermindert. Zum Zeitpunkt 72h nach Stimulation unterschied sich die Proliferationsinhibition der stimulierten Zellen sowohl an der Kultur MSC 19 (25 A), als auch an der Kultur MSC 22 (25 B) signifikant vom Wachstum der Kontrolle. TGF- $\beta$ 1 verlangsamte somit das Zellwachstum unter das Niveau der Spontanproliferation. Diese Inhibition der MSC-Proliferation konnte kulturübergreifend an  $n = 6$  Kulturen verschiedener Frühgeborener mit einer Reduktion

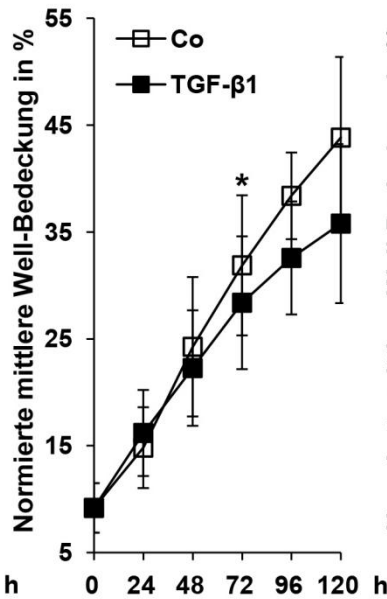


der Flächenbedeckung um 13% zum Endzeitpunkt 120h reproduziert werden (25 C). Analog dazu zeigten sich negativ zunehmende Wachstumsunterschiede der mit TGF- $\beta$ 1 stimulierten MSC-Kulturen gegenüber den jeweiligen Kontrollen (25 D; bunte Linien) mit einem insgesamt kulturübergreifenden, negativen, festen, linearen Zeit-Effekt (25 D; schwarze Linie). Das Ergebnis der kulturübergreifenden Analysen (25 C und 25 D) war statistisch zum Niveau 5% nicht signifikant, die Proliferationsinhibition jedoch klar als Trend erkennbar.

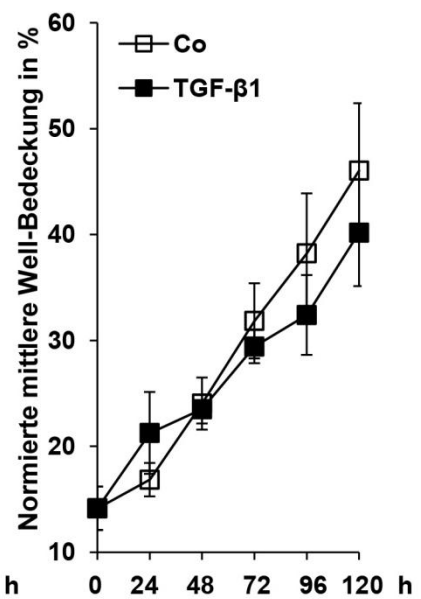
A) MSC 19



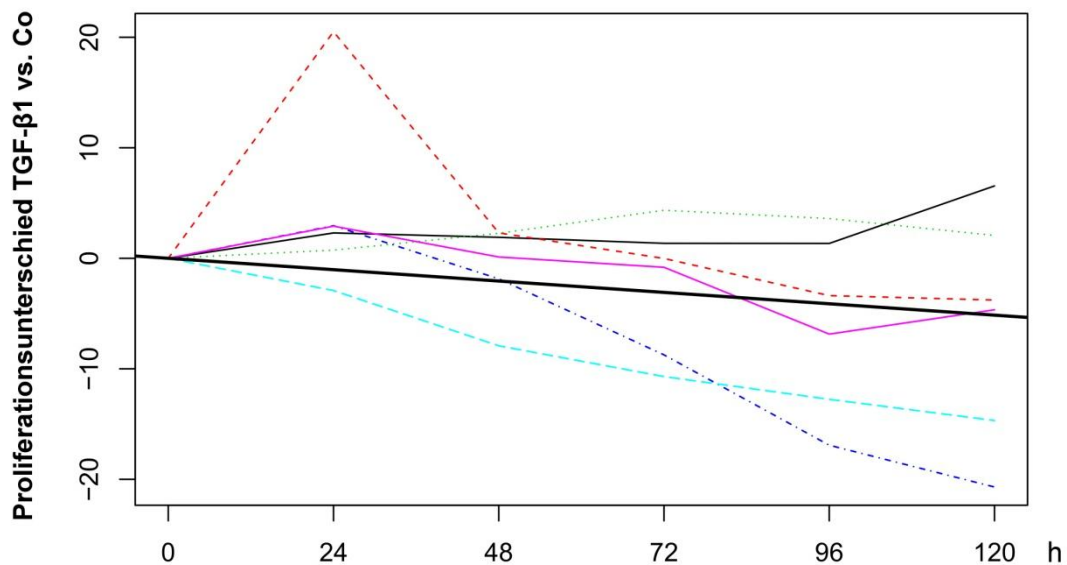
B) MSC 22



C) Übersicht aller MSCs



D)



**Abbildung 25:** Inhibition der MSC-Proliferation durch Stimulation mit TGF- $\beta$ 1

Analyse des Wachstumsverhaltens von MSC-Kulturen nach Stimulation mit 10ng/ml TGF- $\beta$ 1 mittels repetitiver Messung der Flächenbedeckung im Cellscreen. Präsentation der Ergebnisse

nach Normierung der Wellbedeckung der stimulierten Zellen auf die Wellbedeckung der Kontrolle zum Startzeitpunkt  $t[0]$  (für Details s. 3.2.3. und 3.2.4.).

**25 A** fasst  $n = 5$  Stimulationen an der Kultur MSC 19 zusammen. **25 B** fasst  $n = 3$  Stimulationen an der Kultur MSC 22 zusammen. **25 C** zeigt die kulturübergreifende Analyse von  $n = 6$  Kulturen verschiedener Frühgeborener (MSC 30, 45, 47, 49, 19 und 22). Die statistische Analyse erfolgte in 25 A, 25 B und 25 C nach Bildung der Mittelwerte der Einzelexperimente für jede Zellkultur und Berechnung der Standardfehler zu jedem Zeitpunkt  $t[0-120]$ h mit Hilfe des gepaarten t-Tests. Für **25 A - C** gilt die Kennzeichnung signifikanter Unterschiede zum Niveau 5% mit  $^*(p < 0,05)$ . Die mit \* gekennzeichneten Wachstumsunterschiede "Co vs. TGF- $\beta$ 1" zum Zeitpunkt  $t[x]$  sind auch nach Bonferoni - Adjustierung für multiples Testen signifikant.

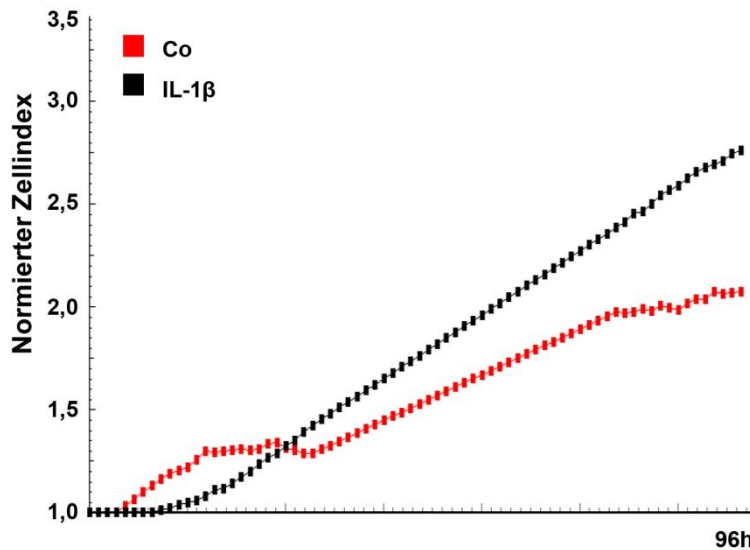
**25 D)** Analyse des Proliferationsunterschieds Zytokin-stimulierter MSCs gegenüber unstimulierten Kontrollzellen durch Berechnung der Wachstumsdifferenz "TGF- $\beta$ 1 - Co" unter Einschluss aller mit TGF- $\beta$ 1 stimulierten  $n = 6$  MSC-Kulturen (MSC 30, 45, 47, 49, 19 und 22). Die Stimulationsergebnisse identischer Zellkulturen wurden für jeden Zeitpunkt  $t[0-120]$ h gemittelt und ein lineares gemischtes Modell (R Package lme4 [1]) mit festem Zeit-Effekt und Zellkultur-spezifischem Random Slope zur Berücksichtigung der Abhängigkeiten innerhalb einer Zellkultur angepasst. Bunte Linien: pro MSC-Kultur gemittelte Wachstumsdifferenz "TGF- $\beta$ 1 - Co" über die Zeit. Schwarze dicke Linie: fester linearer Zeit-Effekt (kulturübergreifend, nicht signifikant).

Zur Verifizierung dieser Wachstumsergebnisse mit einer zweiten Methode wurde die elektronische Impedanzmessung mittels xCELLigence gewählt (s. 3.2.5.). Für die Untersuchung der Zellproliferation nach Stimulation mit IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 und TGF- $\beta$ 1 wurde bei diesem System die relative Impedanzänderung ermittelt, die maßgeblich von der Zelladhärenz und -dichte beeinflusst wird, und als Zellindex von der Experimentiereinheit berechnet ausgegeben wird (s. Abb. 26 - 30). Vorteil dieser Methode war, dass sich die Messstation im Brutschrank befand und die Zellproliferation ohne Unterbrechung der Bebrütung kontinuierlich in einstündigen Intervallen bis 96h nach Stimulation aufgezeichnet wurde. Diese zeitliche Begrenzung erfolgte, da nach diesem Zeitraum auf den verwendeten Platten keine stabilen Experimentalbedingungen mehr gegeben waren und die Zellen spontan bei fast kompletter Wellbedeckung abstarben.

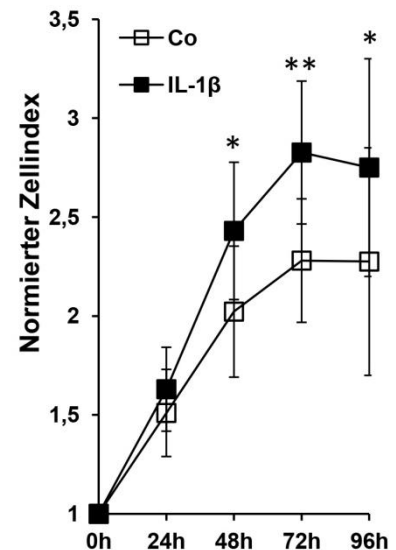
Analog zu den Ergebnissen der Cellscreenmessungen (s. Abb. 21) bestätigte sich im xCELLigence das proliferationsfördernde Potential von IL-1 $\beta$  (s. Abb. 26). In der Darstellung eines repräsentativen Einzelexperiments der Original-xCELLigence-Aufzeichnung war der Zellindex der mit IL-1 $\beta$  stimulierten Zellen (schwarz) zum Endzeitpunkt 96h im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (rot) um 31% erhöht (26 A). Die kulturübergreifende Analyse aus  $n = 5$  mit IL-1 $\beta$  stimulierten Versuchen an verschiedenen MSC-Kulturen ergab eine um 24% erhöhte Proliferation der stimulierten Zellen 72h und eine um 21% erhöhte Proliferation 96h nach Stimulation (26 B). Der Unterschied des mittleren, normierten Zellindex der stimulierten MSCs im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle war ab 48h bis 96h nach Stimulation dreimal in Folge statistisch signifikant (26 B), ebenso wie die kontinuierliche Zunahme des Proliferationsunterschieds "IL-1 $\beta$  vs. Co" mit einem kulturübergreifenden, festen, positiven, linearen Zeit-Effekt (26 C, schwarze Linie,  $p < 0,001$ ). Aufgrund dieser Messergebnisse und des Nachweises der

proliferationsfördernden Wirkung von IL-1 $\beta$  mit zwei unabhängigen Methoden ist die signifikante, proliferationsfördernde Wirkung dieses Zytokins auf die Wachstumseigenschaften von MSCs aus dem Trachealsekret Frühgeborener nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  bestätigt.

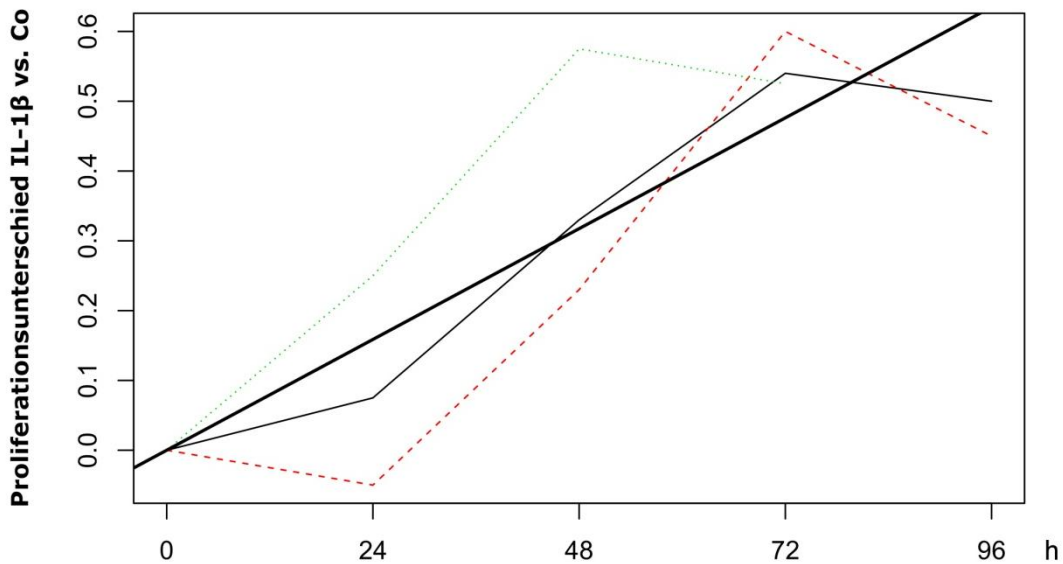
A) MSC 22



B) Übersicht aller MSCs



C)



**Abbildung 26:** Steigerung der MSC-Proliferation durch Stimulation mit IL-1 $\beta$   
 Analyse des Wachstumsverhaltens von MSC-Kulturen nach Stimulation mit 100ng/ml IL-1 $\beta$  durch Ermittlung der relativen Impedanzänderung (Zellindex) im xCELLigence. Präsentation der Ergebnisse nach Normierung des Zellindexes der stimulierten Zellen auf den Zellindex der Kontrolle zum Startzeitpunkt t[0] (für Details s. 3.2.3. und 3.2.5.).

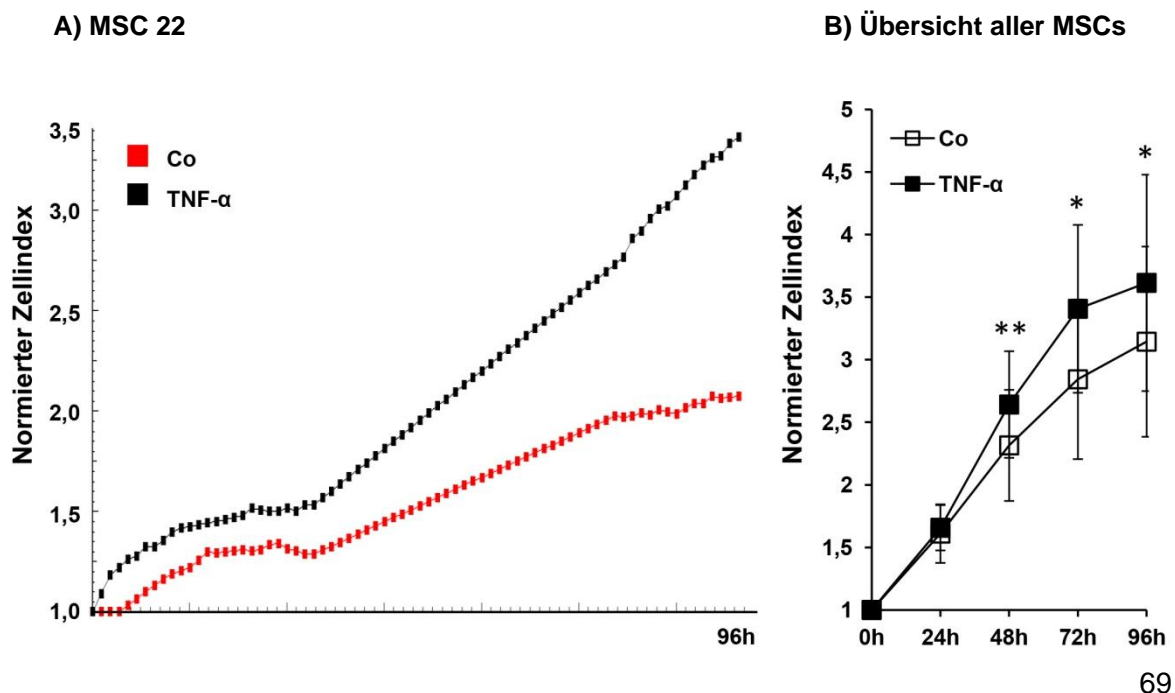
**26 A)** Darstellung einer Original-xCELLigence-Aufzeichnung der Messstation eines repräsentativen Einzelexperimentes an der Kultur MSC 22.

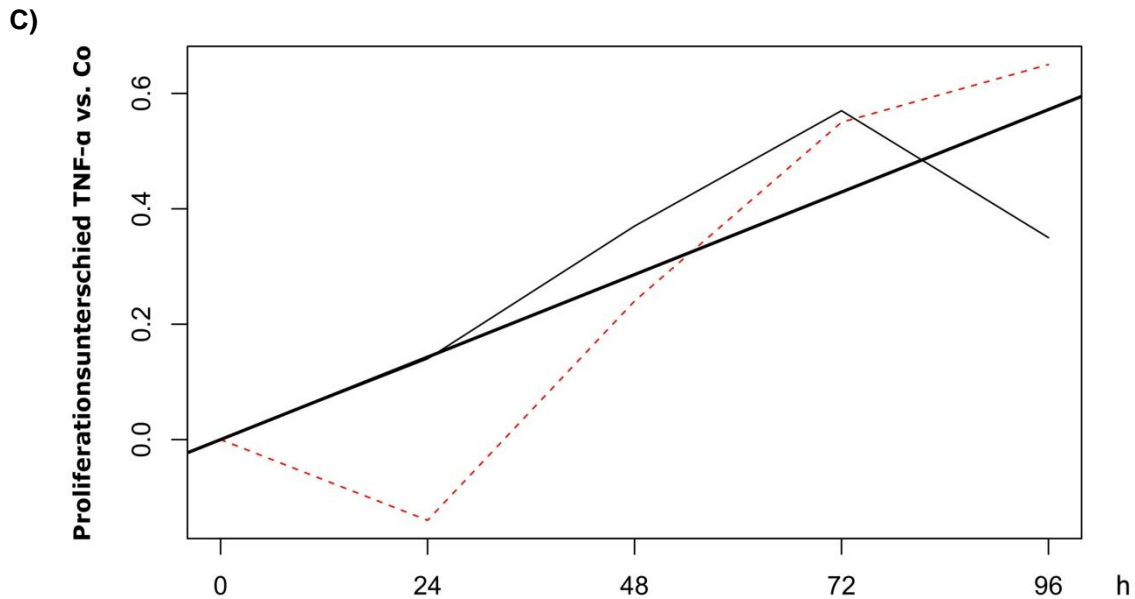
**26 B)** Kulturübergreifende Analyse von n = 5 unabhängigen, mit IL-1 $\beta$  stimulierten Versuchen an den Kulturen MSC 19, 21 und 22. Berechnung der Mittelwerte der Einzelexperimente pro MSC-Kultur und anschließend des kulturübergreifenden Mittelwerts zu jedem Zeitpunkt t[0-96]h sowie

der Standardfehler. Die statistische Analyse erfolgte mittels gepaartem t-Test. Es gilt die Kennzeichnung signifikanter Unterschiede zum Niveau 5% bzw. 1% mit  $^*$  ( $p < 0,05$ ) bzw.  $^{**}$  ( $p < 0,01$ ). Die mit  $^*$  gekennzeichneten Wachstumsunterschiede "Co vs. IL1 $\beta$ " zum Zeitpunkt  $t[x]$  sind auch nach Bonferoni - Adjustierung für multiples Testen signifikant.

**26 C)** Analyse des Proliferationsunterschieds Zytokin-stimulierter MSCs gegenüber unstimulierten Kontrollzellen durch Berechnung der Differenz des Zellindexes "IL-1 $\beta$  - Co" unter Einschluss der mit IL-1 $\beta$  stimulierten Kulturen MSC 19, 21 und 22. Die Stimulationsergebnisse identischer Zellkulturen wurden für jeden Zeitpunkt  $t[0-96]h$  gemittelt und ein lineares gemischtes Modell (R Package lme4 [1]) mit festem Zeit-Effekt und Zellkultur-spezifischem Random Slope zur Berücksichtigung der Abhängigkeiten innerhalb einer Zellkultur angepasst. Bunte Linien: pro MSC-Kultur gemittelte Differenz des Zellindexes "IL-1 $\beta$  - Co" über die Zeit. Schwarze dicke Linie: fester linearer Zeit-Effekt (kulturübergreifend), der mit einem  $p < 0,001$  statistisch hochsignifikant ist.

Analog zu IL-1 $\beta$  verstärkte TNF- $\alpha$  das Zellwachstum der MSCs (Abb. 27). In der Originalkurve der Kultur MSC 22 (27 A) war ein deutlich steilerer Anstieg des Zellindexes der stimulierten MSCs (schwarz) im Vergleich zur Kontrolle (rot), entsprechend einer TNF- $\alpha$  - induzierten Mehrproliferation sichtbar: Zum Endzeitpunkt 96h nach Stimulation war der Zellindex und damit die Zellproliferation um 59% im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle erhöht. xCELLigence - Proliferationsanalysen unterschiedlicher MSC-Kulturen bestätigten in  $n = 6$  Stimulationen mit TNF- $\alpha$  den proliferationsinduzierenden Effekt des Zytokins mit einer mittleren Mehrproliferation der stimulierten Zellen um 15% zum Endzeitpunkt 96h (27 B). Der mittlere, normierte Zellindex der stimulierten Zellen unterschied sich zu den Zeitpunkten 48h, 72h und 96h dreimal signifikant vom Zellindex der Kontrolle (27 B). Entsprechend nahm ebenfalls der Proliferationsunterschied "TNF- $\alpha$  vs. Co" bei den untersuchten Kulturen MSC 19 und MSC 22 zu (27 C, rote/grau Linie) und resultierte in einem kulturübergreifenden, statistisch hochsignifikanten, positiven, linearen Zeit-Effekt (27 C, schwarze Linie,  $p < 0,001$ ). Diese Ergebnisse bestätigen damit analog zu IL-1 $\beta$  die proliferationsinduzierende Wirkung von TNF- $\alpha$  mit Hilfe einer zweiten Methode.





**Abbildung 27:** Steigerung der MSC-Proliferation durch Stimulation mit TNF- $\alpha$

Analyse des Wachstumsverhaltens von MSC-Kulturen nach Stimulation mit 300ng/ml TNF- $\alpha$  durch Ermittlung der relativen Impedanzänderung (Zellindex) im xCELLigence. Präsentation der Ergebnisse nach Normierung des Zellindexes der stimulierten Zellen auf den Zellindex der Kontrolle zum Startzeitpunkt  $t[0]$  (für Details s. 3.2.3. und 3.2.5.).

**27 A)** Darstellung einer Original-xCELLigence-Aufzeichnung der Messstation eines repräsentativen Einzelexperimentes an der Kultur MSC 22.

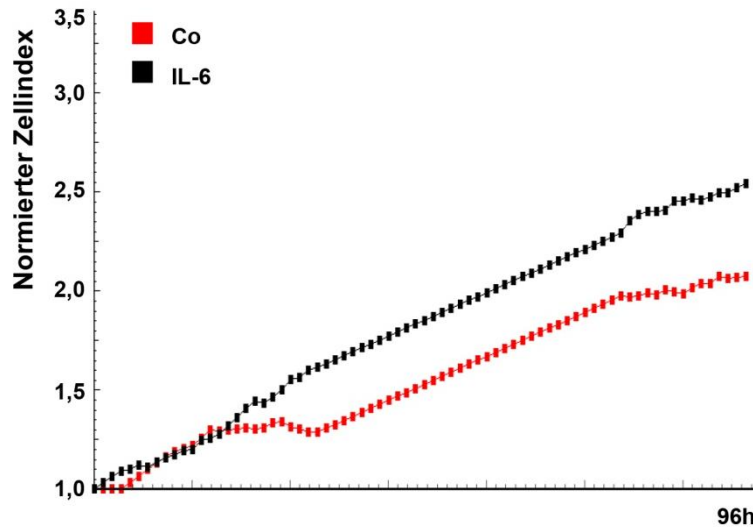
**27 B)** Kulturübergreifende Analyse von  $n = 6$  unabhängigen, mit TNF- $\alpha$  stimulierten Versuchen an den Kulturen MSC 19 und 22. Berechnung der Mittelwerte der Einzelexperimente pro MSC-Kultur und anschließend des kulturübergreifenden Mittelwerts zu jedem Zeitpunkt  $t[0-96]h$  sowie der Standardfehler. Die statistische Analyse erfolgte mittels gepaartem t-Test. Es gilt die Kennzeichnung signifikanter Unterschiede zum Niveau 5% bzw. 1% mit  $^*(p < 0,05)$  bzw.  $^{**}(p < 0,01)$ . Die mit  $^*$  gekennzeichneten Wachstumsunterschiede "Co vs. TNF- $\alpha$ " zum Zeitpunkt  $t[x]$  sind auch nach Bonferoni - Adjustierung für multiples Testen signifikant.

**27 C)** Analyse des Proliferationsunterschieds TNF- $\alpha$  stimulierter MSCs gegenüber ihrer unstimulierten Kontrolle durch Berechnung der Differenz des Zellindexes "TNF- $\alpha$  - Co" an den Kulturen MSC 19 und MSC 22. Die Stimulationsergebnisse identischer Zellkulturen wurden für jeden Zeitpunkt  $t[0-96]h$  gemittelt und ein lineares gemischtes Modell (R Package lme4 [1]) mit festem Zeit-Effekt und Zellkultur-spezifischem Random Slope zur Berücksichtigung der Abhängigkeiten innerhalb einer Zellkultur angepasst. Rote/Graue Linie: mittlere Differenz des Zellindexes "TNF- $\alpha$  - Co" der Kulturen MSC 19 bzw. MSC 22 über die Zeit. Schwarze dicke Linie: fester linearer Zeit-Effekt (kulturübergreifend), der mit einem  $p < 0,001$  statistisch hochsignifikant ist.

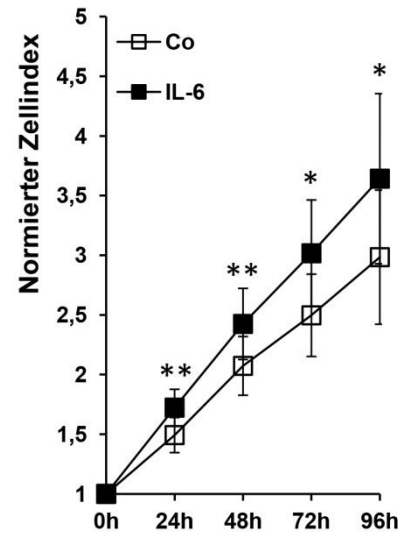
Ebenfalls konnte im xCELLigence das proliferationsfördernde Potential von IL-6 reproduziert werden (Abb. 28). In einem repräsentativen Einzelversuch an der Kultur MSC 22 wiesen die mit IL-6 stimulierten Zellen (schwarz) in der Original-xCELLigence-Aufzeichnung (28 A) 96h nach Stimulation einen um 21% erhöhten Zellindex im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (rot) auf. Der Unterschied des gemittelten Zellindexes aus  $n = 7$  Versuchen an verschiedenen MSC-Kulturen war viermalig ab 24h bis 96h nach Stimulation statistisch signifikant und 96h nach Stimulation um 22% gegenüber der Kontrolle vermehrt (28 B). Entsprechend eines schnelleren Zellwachstums der stimulierten Zellen war an allen untersuchten MSC-Kulturen eine kontinuierliche Zunahme des Wachstumsunterschieds "IL-6 vs. Co" (28 C, bunte Linien) und ein statistisch

hochsignifikanter, fester, positiver linearer Zeit-Effekt (28 C, schwarze Linie,  $p < 0,001$ ) kulturübergreifend nachweisbar. Dieses Ergebnis bestätigt folglich den wachstumsinduzierenden Effekt von IL-6 auf die Zellproliferation.

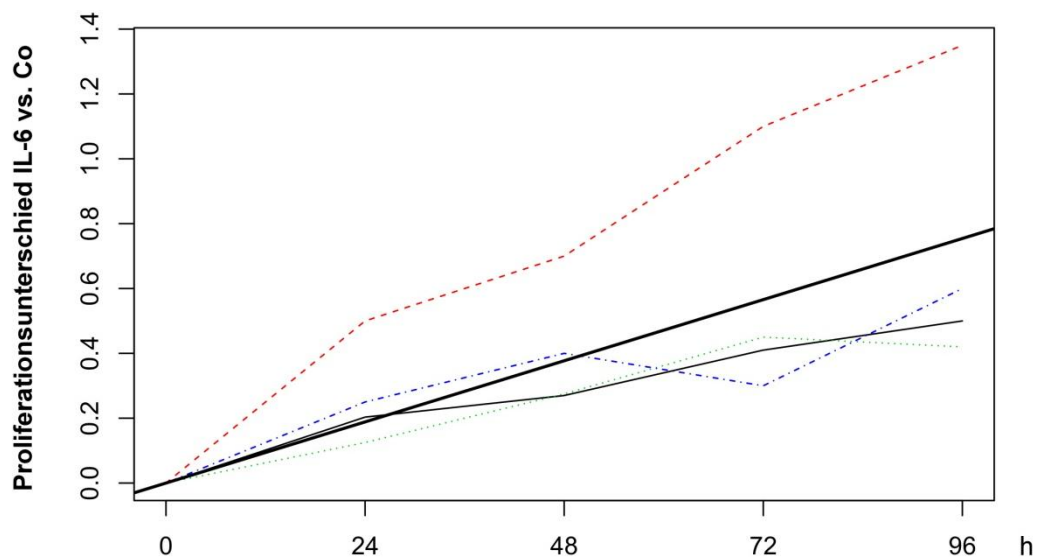
## A) MSC 22



## B) Übersicht aller MSCs



## C)

**Abbildung 28:** Steigerung der MSC-Proliferation durch Stimulation mit IL-6

Analyse des Wachstumsverhaltens von MSC-Kulturen nach Stimulation mit 100ng/ml IL-6 durch Ermittlung der relativen Impedanzänderung (Zellindex) im xCELLigence. Präsentation der Ergebnisse nach Normierung des Zellindex der stimulierten Zellen auf den Zellindex der Kontrolle zum Startzeitpunkt  $t[0]$  (für Details s. 3.2.3. und 3.2.5.).

**28 A)** Darstellung einer Original-xCELLigence-Aufzeichnung der Messstation eines repräsentativen Einzelexperimentes an der Kultur MSC 22.

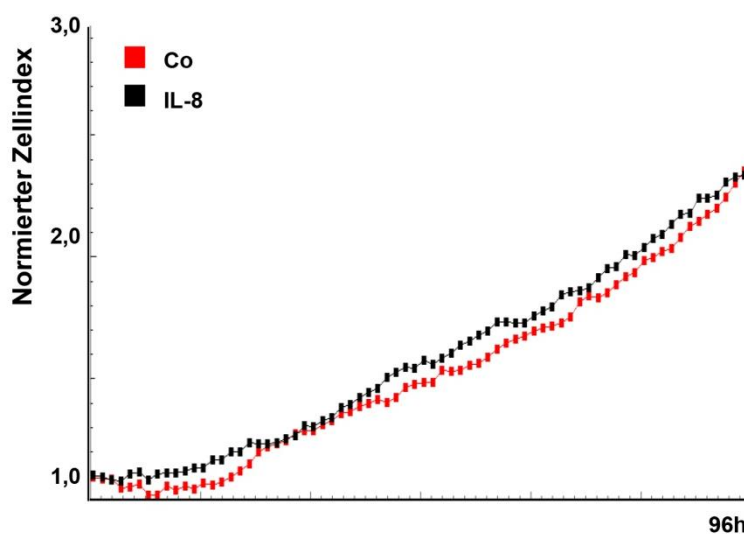
**28 B)** Kulturübergreifende Analyse von  $n = 7$  unabhängigen, mit IL-6 stimulierten Versuchen an den Kulturen MSC 19, 22, 25 und 29. Berechnung der Mittelwerte der Einzelexperimente pro MSC-Kultur und anschließend des kulturübergreifenden Mittelwerts zu jedem Zeitpunkt  $t[0-96]h$  sowie der Standardfehler. Die statistische Analyse erfolgte mittels gepaartem t-Test. Es gilt die Kennzeichnung signifikanter Unterschiede zum Niveau 5% bzw. 1% mit  $*$  ( $p < 0,05$ ) bzw.  $**$  ( $p < 0,01$ ).

Die mit \* gekennzeichneten Wachstumsunterschiede "Co vs. IL-6" zum Zeitpunkt t[x] sind auch nach Bonferoni - Adjustierung für multiples Testen signifikant.

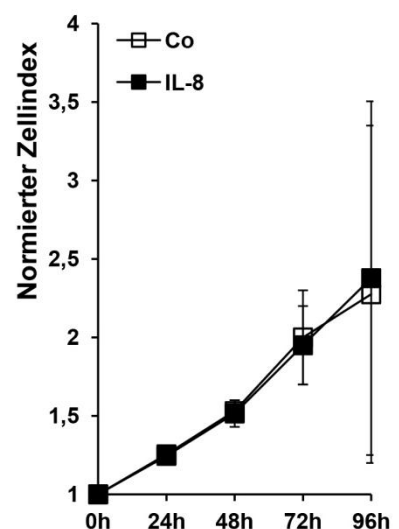
**28 C)** Analyse des Proliferationsunterschieds Zytokin-stimulierter MSCs gegenüber unstimulierten Kontrollzellen durch Berechnung der Differenz des Zellindex "IL-6 - Co" unter Einschluss der mit IL-6 stimulierten n = 4 Kulturen MSC 19, 22, 25 und 29. Die Stimulationsergebnisse identischer Zellkulturen wurden für jeden Zeitpunkt t[0-96]h gemittelt und ein lineares gemischtes Modell (R Package lme4 [1]) mit festem Zeit-Effekt und Zellkultur-spezifischem Random Slope zur Berücksichtigung der Abhängigkeiten innerhalb einer Zellkultur angepasst. Bunte Linien: pro MSC-Kultur gemittelte Differenz des Zellindexes "IL-6 - Co" über die Zeit. Schwarze dicke Linie: fester linearer Zeit-Effekt (kulturübergreifend), der mit einem  $p < 0,001$  statistisch hochsignifikant ist.

Entsprechend den vorangegangenen Untersuchungen im Cellscreen zeigte sich für IL-8 kein stabiler positiver Wachstumseffekt mit über die Zeit fast deckungsgleich verlaufendem Zellindex der Kontrolle und der mit IL-8 stimulierten Zellen. In der Original-xCELLigence-Kurve eines Einzelversuchs (29 A) war zeitweise eine leichte Proliferationssteigerung der stimulierten Zellen (schwarz) erkennbar, die sich jedoch nur um ca. 5% vom Wachstum der Kontrollzellen (rot) unterschied und sich bei 96h der Kontrolle anglich. Dieser Effekt war auch in der Übersicht (29 B) aus n = 2 Versuchen der Kulturen MSC 19 und MSC 29 zu beobachten, in der der Unterschied des Zellindexes der stimulierten Zellen zur Kontrolle maximal 4% betrug. Die hohen Standardabweichungen in 29 B sind durch die unterschiedliche Spontanproliferation der beiden Kulturen und die geringe Versuchsanzahl zu erklären. Analog zu den Ergebnissen in 29 A und 29 B war bezüglich des Proliferationsunterschieds "IL-8 vs. Co" ein schwach positiver Zeit-Effekt zu detektieren (29 C, schwarze Linie), der jedoch nicht statistisch signifikant war. Weitere Versuche mit IL-8 wurden aufgrund der schwachen proliferationsfördernden Wirkung nicht durchgeführt.

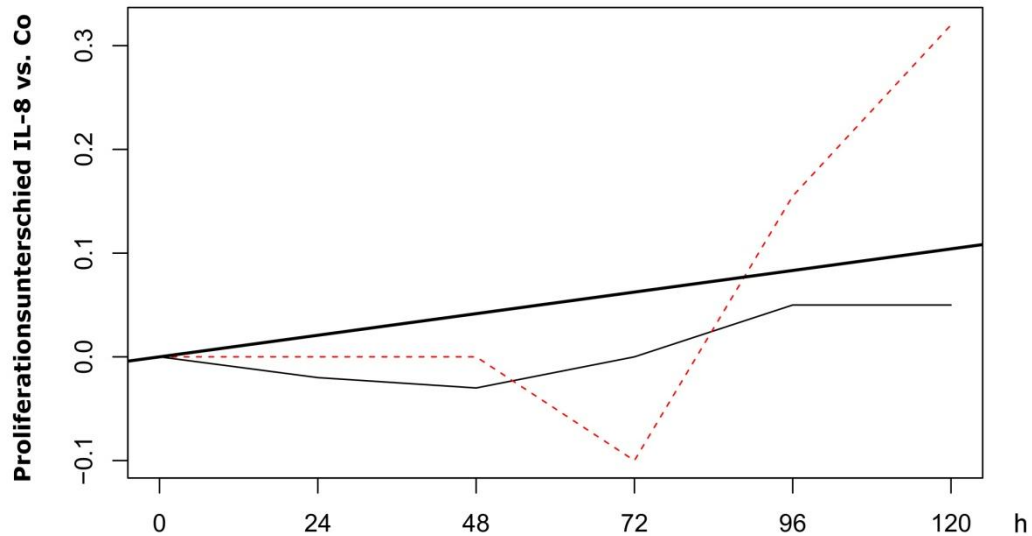
A) MSC 29



B) Übersicht aller MSCs



C)



**Abbildung 29:** Geringe Steigerung der MSC-Proliferation durch Stimulation mit IL-8

Analyse des Wachstumsverhaltens von MSC-Kulturen nach Stimulation mit 300ng/ml IL-8 durch Ermittlung der relativen Impedanzänderung (Zellindex) im xCELLigence. Präsentation der Ergebnisse nach Normierung des Zellindexes der stimulierten Zellen auf den Zellindex der Kontrolle zum Startzeitpunkt  $t[0]$  (für Details s. 3.2.3. und 3.2.5.).

**29 A)** Darstellung einer Original-xCELLigence-Aufzeichnung der Messstation eines Einzelexperimentes an der Kultur MSC 29.

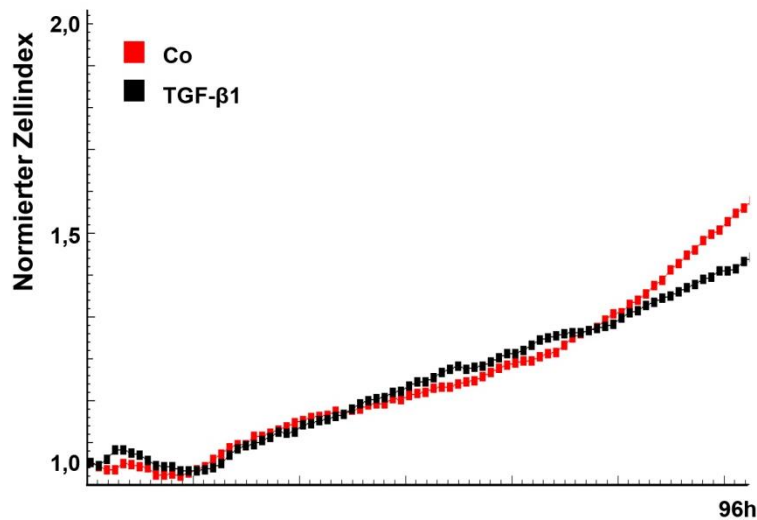
**29 B)** Kulturübergreifende Analyse von  $n = 2$  unabhängigen, mit IL-8 stimulierten Versuchen an den Kulturen MSC 19 und 29. Nach Bildung der Mittelwerte und Berechnung des Standardfehlers zu jedem Zeitpunkt  $t[0-96]h$  erfolgte die statistische Analyse mit Hilfe des gepaarten t-Tests. Es gilt das Signifikanzniveau  $*p < 0,05$ .

**29 C)** Analyse des Proliferationsunterschieds IL-8 stimulierter MSCs gegenüber ihren unstimulierten Kontrollzellen durch Berechnung der Differenz des Zellindexes "IL-8 - Co" an den Kulturen MSC 19 und MSC 29. Anpassung eines linearen gemischten Modells (R Package lme4 [1]) mit festem Zeit-Effekt und Zellkultur-spezifischem Random Slope zur Berücksichtigung der Abhängigkeiten innerhalb einer Zellkultur. Rote/Graue Linie: Differenz des Zellindexes "IL-8 - Co" der Kulturen MSC 19 bzw. MSC 29 über die Zeit. Schwarze dicke Linie: fester linearer Zeit-Effekt (kulturübergreifend, nicht signifikant).

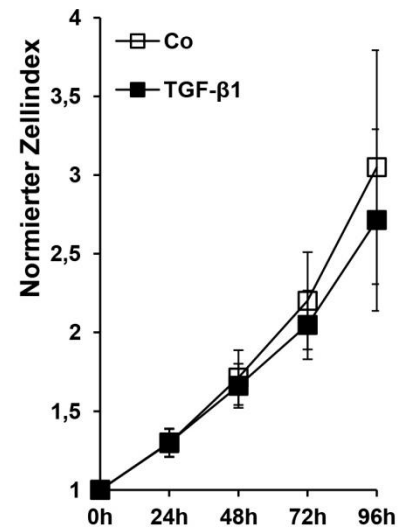
Abschließend wurde im xCELLigence die Wirkung des Transforming Growth Factors -  $\beta 1$  untersucht, der in der vorhergehenden Untersuchung die Spontanproliferation der MSCs gehemmt hatte. Analog zu den Cellscreenmessungen zeigte sich in den Originalaufzeichnungen der Messstation an einem repräsentativen Einzelversuch der Kultur MSC 22 eine Inhibition der Zellproliferation, die 96h nach Stimulation um 7% im Vergleich zur Kontrolle vermindert war (30 A). In der kulturübergreifenden Analyse von  $n = 9$  Stimulationen mit TGF- $\beta 1$  an verschiedenen MSC-Kulturen war die Spontanproliferation 96h nach Stimulation um 11% gegenüber der Kontrolle reduziert (30 B). Bezüglich des Wachstumsunterschieds "TGF- $\beta 1$  vs. Co" wurde kulturübergreifend ein fester, negativer Zeit-Effekt detektiert (30 C, schwarze Linie), der zum 10% Niveau signifikant war. Insgesamt konnte das Ergebnis der Cellscreen-Messungen reproduziert und die inhibitorische Wirkung des TGF- $\beta 1$  auf die MSC-Proliferation bestätigt werden.



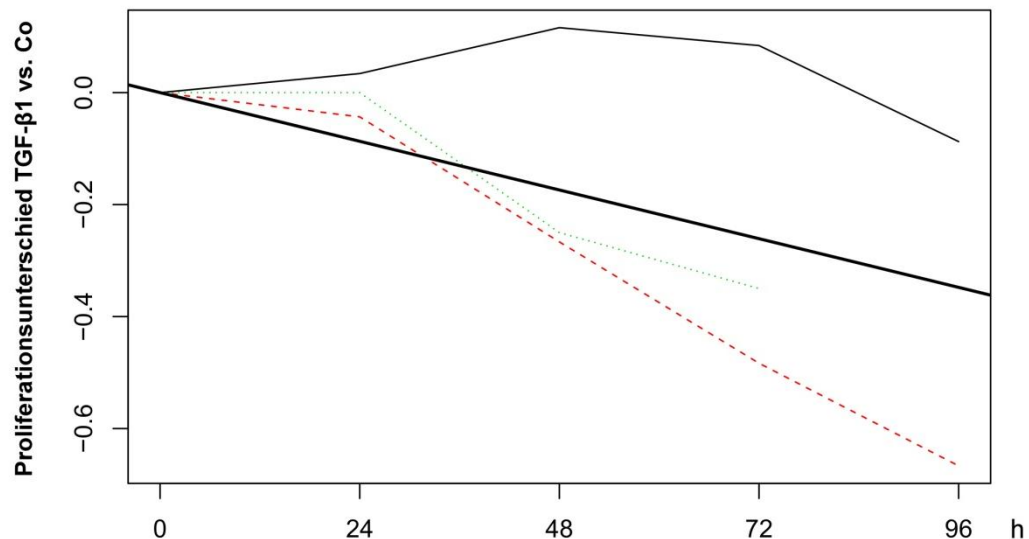
## A) MSC 22



## B) Übersicht aller MSCs



## C)

**Abbildung 30:** Inhibition der MSC-Proliferation durch Stimulation mit TGF-β1

Analyse des Wachstumsverhaltens von MSC-Kulturen nach Stimulation mit 10ng/ml TGF-β1 durch Ermittlung der relativen Impedanzänderung (Zellindex) im xCELLigence. Präsentation der Ergebnisse nach Normierung des Zellindexes der stimulierten Zellen auf den Zellindex der Kontrolle zum Startzeitpunkt  $t[0]$  (für Details s. 3.2.3. und 3.2.5.).

**30 A)** Darstellung einer Original-xCELLigence-Aufzeichnung der Messstation eines repräsentativen Einzelexperimentes an der Kultur MSC 22.

**30 B)** Kulturübergreifende Analyse von  $n = 9$  unabhängigen, mit TGF-β1 stimulierten Versuchen an den Kulturen MSC 21, 22 und 25. Berechnung der Mittelwerte der Einzelexperimente pro MSC-Kultur und anschließend des kulturübergreifenden Mittelwerts zu jedem Zeitpunkt  $t[0-96]h$  sowie der Standardfehler. Die statistische Analyse erfolgte mittels gepaartem t-Test. Es gilt das Signifikanzniveau  $*p < 0,05$ .

**30 C)** Analyse des Proliferationsunterschieds Zytokin-stimulierter MSCs gegenüber unstimulierten Kontrollzellen durch Berechnung der Differenz des Zellindexes "TGF-β1 - Co" unter Einschluss der mit TGF-β1 stimulierten Kulturen MSC 19, 21 und 22. Die Stimulationsergebnisse identischer Zellkulturen wurden für jeden Zeitpunkt  $t[0-96]h$  gemittelt und ein lineares gemischtes Modell (R Package lme4 [1]) mit festem Zeit-Effekt und Zellkultur-spezifischem Random Slope zur Berücksichtigung der Abhängigkeiten innerhalb einer Zellkultur angepasst. Bunte Linien: pro MSC-Kultur gemittelte Differenz des Zellindexes "TGF-β1 - Co" über die Zeit. Schwarze dicke Linie: fester linearer Zeit-Effekt (kulturübergreifend), der zum 10% Niveau noch signifikant ist.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-6 eine statistisch signifikante Proliferationssteigerung der MSCs bewirkten. Für IL-8 konnte in einzelnen Versuchsreihen eine Proliferationsinduktion gezeigt, aber insgesamt kein stabiler positiver Wachstumseffekt detektiert werden. Diese Ergebnisse konnten mit zwei voneinander unabhängigen Methoden nachgewiesen werden. Ebenfalls konnte für TGF- $\beta$ 1 gezeigt werden, dass er entgegen der Wirkung der pro-inflammatorischen Zytokine die Zellproliferation der MSCs hemmt.

Da sich der Effekt von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  auf das Wachstumsverhalten der MSCs als besonders ausgeprägt und unter Zellkulturbedingungen stabil und reproduzierbar erwies, wurde der Schwerpunkt der weiterführenden Analysen und molekularen Folgeexperimente auf diese beiden Zytokine gelegt.

#### **4.2. Einfluss der Zytokine auf die Proteinexpression von MSCs**

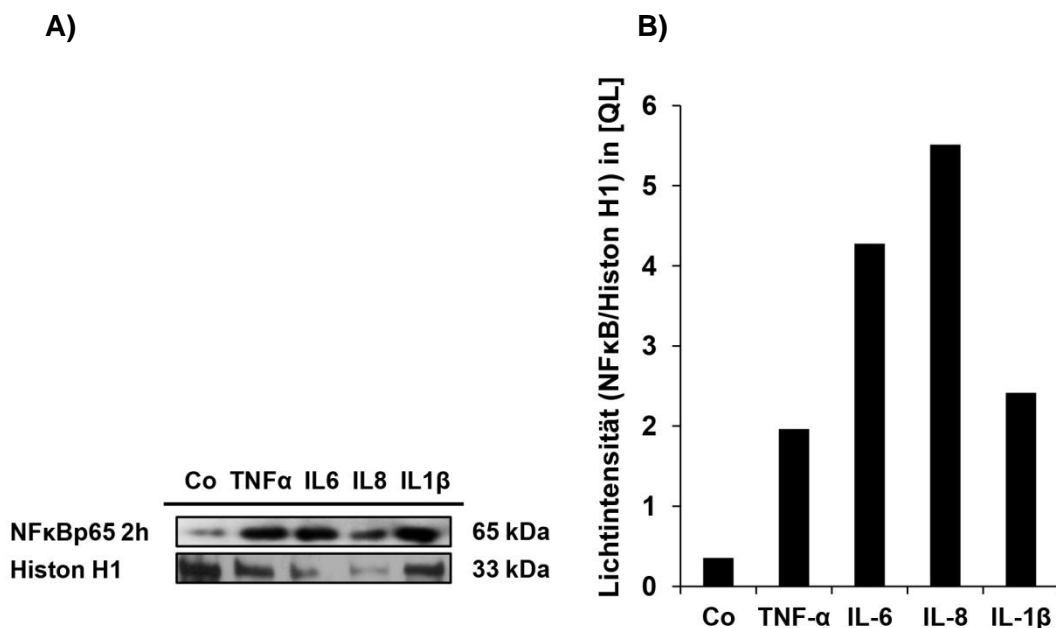
Aufgrund der unter 1.2.4. beschriebenen Assoziation einer starken basalen Expression des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B in MSCs mit einer hohen Spontanproliferation und einem schlechteren pulmonalen Outcome sowie der Assoziation einer hohen Expression des zytoskelettalen Proteins  $\alpha$ -SMA mit einer niedrigen Proliferationsgeschwindigkeit der MSCs und einer besseren pulmonalen Prognose wurde in folgenden Versuchen als nächster Schritt der Fokus darauf gelegt, wie die bisher untersuchten Zytokine die Expression von NF $\kappa$ B und  $\alpha$ -SMA verändern. Sollte sich eine Proteinregulation entsprechend dem Phänotyp der MSCs von Kindern mit schwerem Ausprägungsgrad der BPD zeigen, sollte weiterführend die Rolle des NF $\kappa$ B Signalwegs genauer untersucht werden.

##### **4.2.1. Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B durch IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8**

Die zentrale Rolle des "Nuclear Factor- $\kappa$ B", NF $\kappa$ B, in der zytokinvermittelten Inflammation ist bereits bekannt: Neben der verstärkten Genexpression von Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmolekülen, Akute-Phase-Proteinen und Immunrezeptoren verstärkt NF $\kappa$ B nach Aktivierung des klassischen, kanonischen Signalwegs (s. auch 1.2.3.2.) über seine transkriptionsaktivierende p65-Einheit ebenfalls die Transkription der vier pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8. Umgekehrt aktivieren TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  im Sinne einer positiven Rückkopplung wiederum den klassischen NF $\kappa$ B Signalweg und damit die p65-Einheit (Blackwell and Christman 1997). Als Zeichen seiner Beteiligung an der pulmonalen Entzündungsreaktion der chronischen Lungenerkrankung

Frühgeborener ist NFκB auch im Trachealsekret von Kindern mit sich entwickelnder BPD erhöht (Bourbia, Cruz et al. 2006).

Nach Stimulation von MSCs aus dem Trachealsekret Frühgeborener mit den Zytokinen IL-1β, TNF-α, IL-6 und IL-8 konnte mittels Western Blot Analyse (s. 3.2.7.) die Aktivierung von NFκB durch eine nukleäre Akkumulation der transkriptionsaktiven p65-Einheit (NFκBp65) für IL-1β und TNF-α auch in MSCs reproduziert werden. Ebenfalls führte die Stimulation mit IL-6 und IL-8 zu einer deutlichen nukleären Akkumulation von NFκBp65 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (31 A). Dies entsprach einer starken Zytokin-induzierten Aktivierung mit nukleärer Translokation des normal im Zytoplasma gebunden vorliegenden Transkriptionsfaktors. Als Ladekontrolle der Western Blot Analyse wurde das ebenfalls nukleär lokalisierte DNA-Gerüstprotein Histon H1 eingesetzt (31 A). In der Quantifizierung der im Western Blot detektierten Proteinmengen mit Hilfe der AIDA Image Analyzer Software, bei der die Lichtintensität der Proteinbanden von NFκBp65, als Korrelat des detektierten Proteinsignals, ins Verhältnis zur Lichtintensität von Histon H1 gesetzt wurden (für Details s. 3.2.7.4.), war die auf die Ladekontrolle standardisierte, vermehrte Expression von NFκBp65 nach Stimulation mit IL-1β, TNF-α, IL-6 und IL-8 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle ebenfalls deutlich erkennbar (31 B).



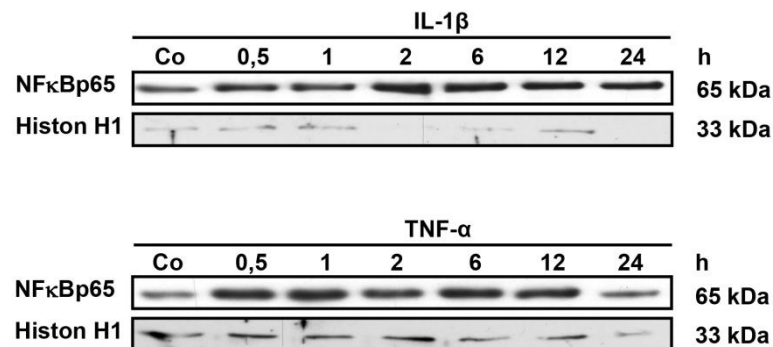
**Abbildung 31:** NFκB Aktivierung in nukleären Extrakten der Kultur MSC 22 nach Stimulation mit 100ng/ml IL-1β, 300ng/ml TNF-α, 100ng/ml IL-6 und 300ng/ml IL-8

**31 A)** Western Blot Analyse der 2h nach Zytokinstimulation gewonnenen Kernlysate. Als Ladekontrolle wurde das nukleäre Protein Histon H1 verwendet.

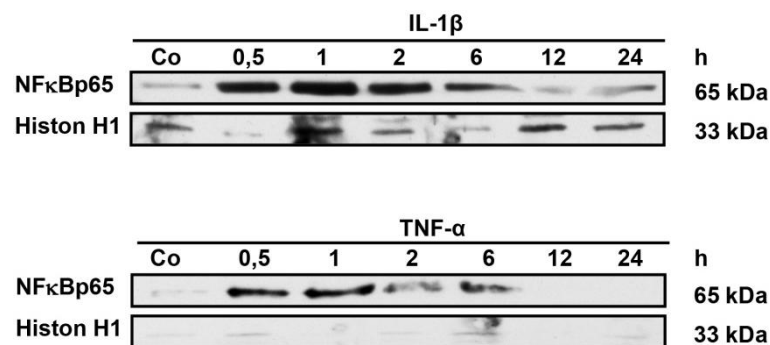
**31 B)** Quantifizierung der im Western Blot detektierten Proteinmengen mit Hilfe der AIDA Image Analyzer Software. Die Lichtintensität der NFκBp65 Banden, als Korrelat der detektierten Proteinmenge, wurde durch die Lichtintensität der zugehörigen Kontrollbande geteilt und damit das NFκB Signal auf die Ladekontrolle standardisiert.

Weiterführend wurde die zeitliche Aktivierung von NF $\kappa$ Bp65 durch die schwerpunktmäßig untersuchten Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  0,5h - 24h nach Stimulation untersucht. Analog zu den bisher durchgeführten Analysen wurde die Kultur MSC 19 (32 A), repräsentativ für ein Kind mit milder BPD, als auch die Kultur MSC 22 (32 B), repräsentativ für ein Kind mit schwerer BPD, eingesetzt. In beiden Kulturen war sowohl nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  als auch mit TNF- $\alpha$  eine vermehrte Anreicherung der transkriptionsaktivierenden p65-Einheit im Zellkern zu beobachten. Die Aktivierung hielt über mehrere Stunden an und war bis 6h nach Stimulation in allen Western Blot Analysen zuverlässig zu detektieren (Abb. 32). In weiteren NF $\kappa$ B - abhängigen Untersuchungen in Punkt 4.3. wurden die nukleären Extrakte standardisiert 2h nach Zytokinstimulation und damit im Bereich der sicheren Aktivierung des Transkriptionsfaktors gewonnen.

#### A) MSC 19



#### B) MSC 22



**Abbildung 32:** NF $\kappa$ B Aktivierung in nukleären Extrakten der Kulturen MSC 19 (A) und MSC 22 (B) 0,5h, 1h, 2h, 6h, 12h und 24h nach Stimulation mit 100ng/ml IL-1 $\beta$  oder 300ng/ml TNF- $\alpha$  im Western Blot. Aufgrund der z. T. schwachen Belichtung der Ladekontrollen, Histon H1, war eine adäquate AIDA Quantifizierung nicht möglich.

Da die Stimulation der MSCs mit den pro-inflammatorischen Zytokinen eine nukleäre Akkumulation von NF $\kappa$ B und damit die Aktivierung des Transkriptionsfaktors bewirkte, ist es möglich, dass IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , aber auch IL-6 und IL-8 ihre Wirkung molekular über

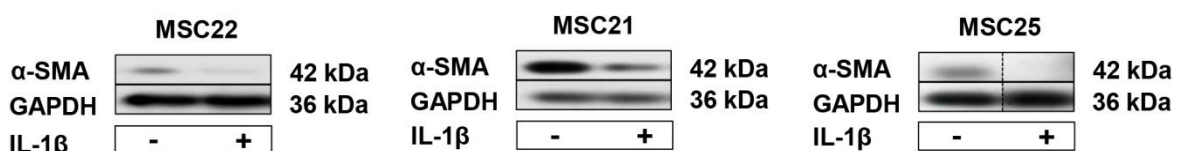
die Aktivierung von NF $\kappa$ B entfalten. Ob daher der unter 4.1.2. detektierte proliferationsfördernde Effekt der Zytokine von NF $\kappa$ B vermittelt wird, wird in Kapitel 4.3. untersucht.

#### 4.2.2. Wirkung von IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8 auf das intrazelluläre Protein $\alpha$ -SMA

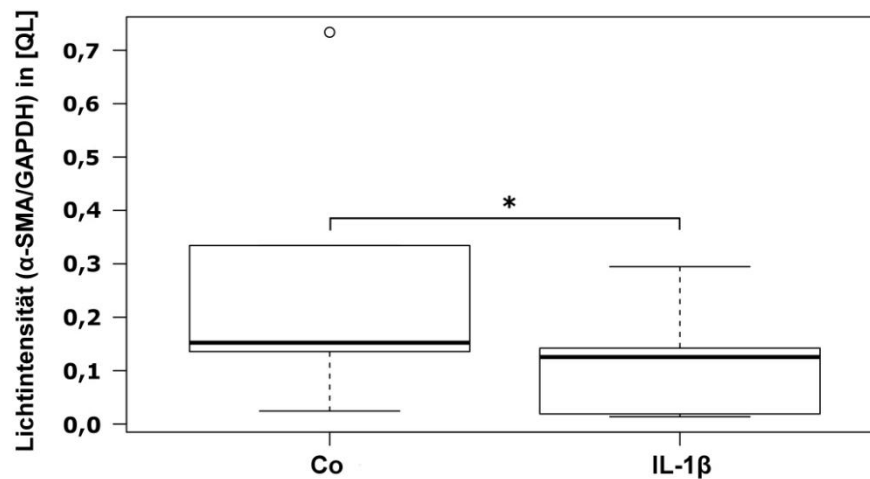
Das zytoskelettale Protein alpha-Smooth-Muscle-Actin ( $\alpha$ -SMA) bildet intrazellulär kleine kontraktile Einheiten. Es gilt als wichtiger Marker für Myofibroblasten, die sich aus mesenchymalen Stromazellen differenzieren, und wird in histologischen Schnitten zur Detektion dieser Zellen verwendet (Bostrom, Willetts et al. 1996, Bry, Whitsett et al. 2007, Choi 2010, Popova, Bozyk et al. 2010). Aufgrund des in der Arbeitsgruppe, in Abhängigkeit des BPD Schweregrads dysreguliert gefundenen Phänotyps unstimulierter MSCs mit veränderter, basaler  $\alpha$ -SMA Expression wurde diese nun 48h nach Stimulation der MSCs mit den pro-inflammatorischen Zytokinen IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8 untersucht.

Die Stimulation der MSCs mit IL-1 $\beta$  bewirkte im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle eine starke Inhibition der  $\alpha$ -SMA Expression, die in drei repräsentativen Western Blot Analysen verschiedener MSC-Isolate dargestellt ist (33 A). Nach Untersuchung der Kultur MSC 22 eines Kindes mit schwerer Ausprägung der BPD sind noch beispielhaft die Kulturen MSC 21 und MSC 25 abgebildet, die ein zu MSC 22 identisches Ergebnis zeigen (33 A). Insgesamt konnte die Inhibition der  $\alpha$ -SMA Expression in n = 14 Stimulationen mit IL-1 $\beta$  reproduziert werden (33 B). Für jede Western Blot Analyse wurde anschließend die zugehörige Quantifizierung des detektierten Proteinsignals sowohl von  $\alpha$ -SMA als auch von der Ladekontrolle GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) mit Hilfe der AIDA Image Analyzer Software durchgeführt und das  $\alpha$ -SMA Signal auf die Ladekontrolle standardisiert (für Details s. 3.2.7. bzw. 3.2.7.4.). Die zusammenfassende Auswertung der AIDA Quantifizierungen aller n = 14 IL-1 $\beta$  Stimulationen ergab eine statistisch signifikante Reduktion der  $\alpha$ -SMA Expression in Zytokin-stimulierten MSCs im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Nach IL-1 $\beta$  Zugabe zeigte sich ausgehend vom Median der Kontrolle im Vergleich zum Median der stimulierten Zellen eine Reduktion der  $\alpha$ -SMA Expression um 18% (33 B).

A)



B)



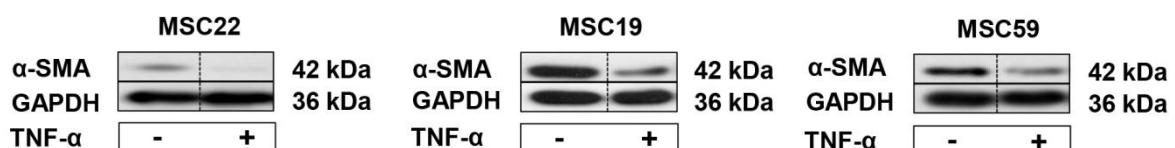
**Abbildung 33:** Inhibition der  $\alpha$ -SMA Expression durch Stimulation mit IL-1 $\beta$

**33 A)** Exemplarische Darstellung der Western Blot Analysen der Kulturen MSC 22, 21 und 25, deren Zelllysate 48h nach Stimulation mit 100ng/ml IL-1 $\beta$  gewonnen worden waren. Als Ladekontrolle wurde GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase), ein in allen Zellen dauerhaft und stark exprimiertes Protein der Glykolyse, verwendet. Im Western Blot der Kultur MSC 25 wurden die Banden für eine sinnvolle, den anderen Graphiken entsprechende Anordnung aus dem identischen Gel ausgeschnitten und in der abgebildeten Reihenfolge, ohne weitere Bearbeitung wieder aneinander gefügt (Markierung durch Trennlinie).

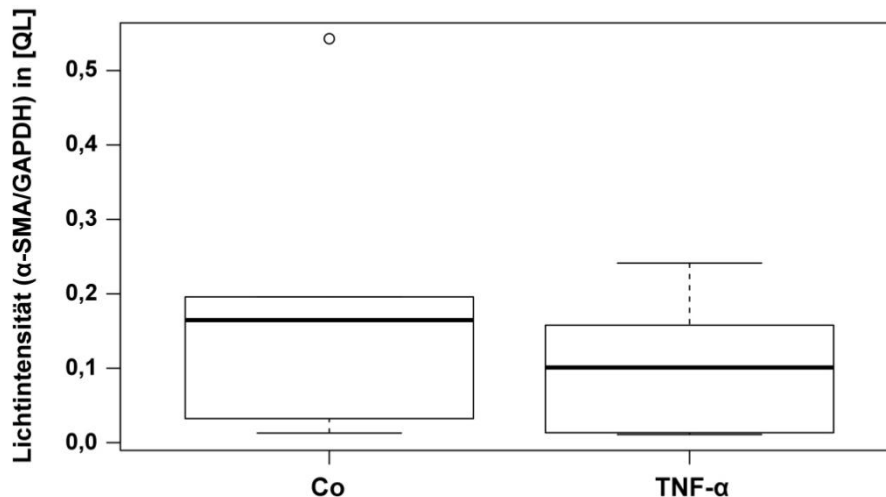
**33 B)** Kulturübergreifende Analyse von n = 14 mit IL-1 $\beta$  stimulierten Versuchen an den Kulturen MSC 19, 21, 22, 25, 55 und 59. Nach Quantifizierung der im Western Blot detektierten Proteinmengen und Standardisierung des  $\alpha$ -SMA Signals auf die Ladekontrolle GAPDH mit Hilfe der AIDA Image Analyzer Software (s. 3.2.7.4.) erfolgte die statistische Analyse mittels Wilcoxon Signed Rank Test zum Niveau 5%. Kennzeichnung signifikanter Unterschiede mit \* ( $p < 0,05$ ).

Analog zu IL-1 $\beta$  war die Konzentration detektierbaren  $\alpha$ -SMAs nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  in drei repräsentativen Western Blot Beispielen der Kulturen MSC 22, 19 und 59 deutlich vermindert (34 A). Auch hier war das Stimulationsergebnis kulturübergreifend einheitlich. In der Übersicht der mit AIDA quantifizierten Proteinmengen von  $\alpha$ -SMA im Verhältnis zu GAPDH von insgesamt n = 13 mit TNF- $\alpha$  stimulierten Versuchen konnte die Inhibition der  $\alpha$ -SMA Expression durch TNF- $\alpha$  reproduziert werden (34 B). Die Lichtintensität, die direkt mit der Bandenstärke im Western Blot und damit mit der nachweisbaren Proteinmenge korreliert, war für die Lysate stimulierter MSCs im Vergleich zu den Lysaten der Kontrolle deutlich, wenn auch nicht statistisch signifikant, vermindert: Ausgehend vom Median der unstimulierten MSCs im Vergleich zum Median der mit TNF- $\alpha$  stimulierten MSCs war die  $\alpha$ -SMA Expression der zytokinstimulierten Zellen um 38 % reduziert.

A)



B)



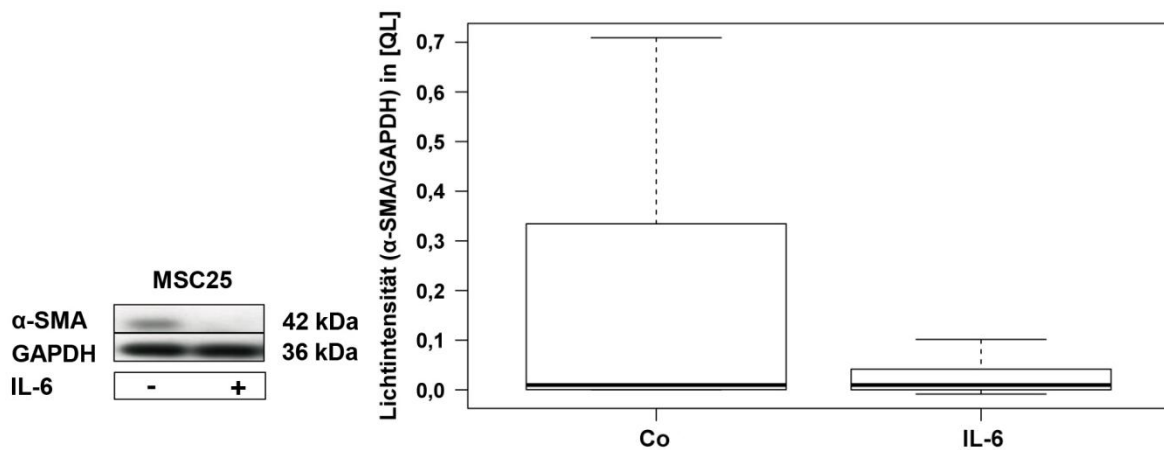
**Abbildung 34:** Inhibition der  $\alpha$ -SMA Expression durch Stimulation mit TNF- $\alpha$

**34 A)** Exemplarische Darstellung der Western Blot Analysen der Kulturen MSC 22, 19 und 59, deren Zelllysate 48h nach Stimulation mit 300ng/ml TNF- $\alpha$  gewonnen worden waren. Als Ladekontrolle wurde GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase), ein in allen Zellen dauerhaft und stark exprimiertes Protein der Glykolyse, verwendet. Für eine sinnvolle, den anderen Abbildungen entsprechende Anordnung wurden die Banden aus dem jeweiligen, identischen Gel ausgeschnitten und in der abgebildeten Reihenfolge, ohne weitere Bearbeitung wieder aneinandergefügt (Markierung durch Trennlinien).

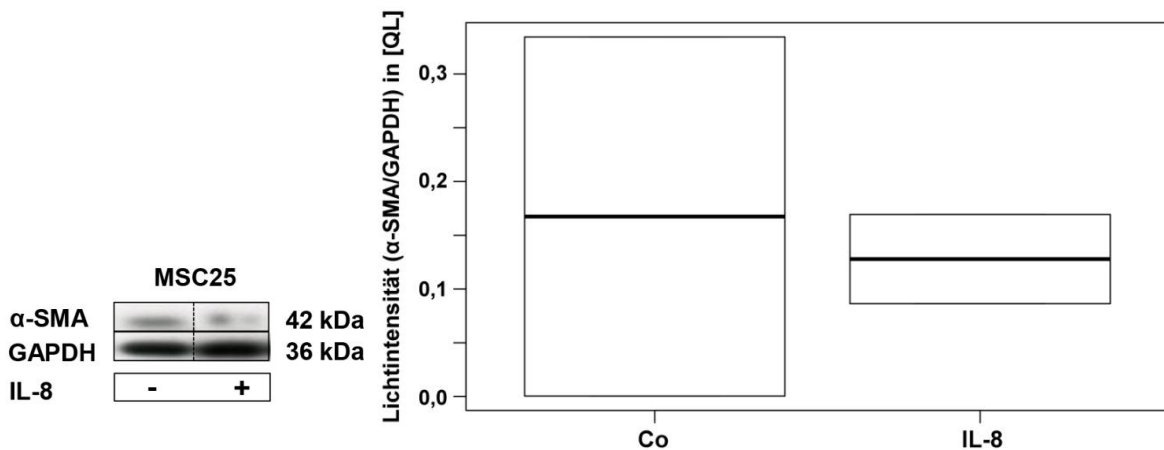
**34 B)** Kulturübergreifende Analyse von  $n = 13$  mit TNF- $\alpha$  stimulierten Versuchen an den Kulturen MSC 19, 21, 22, 55 und 59. Nach Quantifizierung der im Western Blot detektierten Proteinmengen und Standardisierung des  $\alpha$ -SMA Signals auf die Ladekontrolle GAPDH mit Hilfe der AIDA Image Analyzer Software (s. 3.2.7.4.) erfolgte die statistische Analyse mittels Wilcoxon Signed Rank Test. Die Reduktion der  $\alpha$ -SMA Expression nach Zytokinstimulation gegen die Kontrolle war zum Niveau 5% nicht signifikant.

Der inhibitorische Einfluss der pro-inflammatorischen Zytokine auf die  $\alpha$ -SMA Expression von MSCs konnte ebenfalls für IL-6 (35 A) und IL-8 (35 B) bestätigt werden. Nach Stimulation mit diesen beiden Interleukinen kam es sowohl in den Western Blot Darstellungen als auch in den zusammenfassenden Übersichtsdiagrammen aller mit IL-6 bzw. IL-8 stimulierten Versuche zu einer eindeutigen Reduktion der  $\alpha$ -SMA Synthese. Exemplarisch war als repräsentatives Beispiel der Western Blot Analysen die Kultur MSC 25 gewählt worden. Diese entsprach in ihren Proliferationseigenschaften und dem BPD Schweregrad der Kultur MSC 22. Das jeweils zugehörige Boxplot Diagramm zeigt die Übersicht der quantifizierten AIDA Ergebnisse aus  $n = 5$  identisch stimulierten Versuchen für IL-6 (35 A) und aus  $n = 3$  Stimulationen für IL-8 (35 B). In diesen kulturübergreifenden Analysen war sowohl nach Stimulation mit IL-6 als auch nach Stimulation mit IL-8 die Differenz der  $\alpha$ -SMA Expression zwischen stimulierten MSCs und Kontrollzellen deutlich erkennbar, die Inhibition der  $\alpha$ -SMA Expression jedoch nicht statistisch signifikant.

## A) IL-6



## B) IL-8



**Abbildung 35:** Inhibition der  $\alpha$ -SMA Expression durch Stimulation mit IL-6 (35 A) und IL-8 (35 B) 48h nach Stimulation der MSCs mit 100ng/ml IL-6 (35 A) bzw. mit 300ng/ml IL-8 (35 B) wurden die Western Blot Analysen durchgeführt, die detektierten Proteinsignale mit Hilfe der AIDA Image Analyzer Software quantifiziert und die aufgezeichneten  $\alpha$ -SMA Signale auf die zugehörigen Ladekontrollen (GAPDH - Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) standardisiert (s. 3.2.7.).

**35 A und 35 B (jeweils links):** Exemplarische Darstellung der Western Blot Analysen der Kultur MSC 25. Für eine sinnvolle, den anderen Graphiken entsprechende Anordnung wurden in 35 B die Banden aus dem identischen Gel ausgeschnitten und in der abgebildeten Reihenfolge, ohne weitere Bearbeitung wieder aneinander gefügt (Markierung durch Trennlinie).

**35 A und 35 B (jeweils rechts):** Kulturübergreifende Analyse der AIDA Quantifizierungen aller untersuchten MSC-Kulturen (**35 A:** n = 5 Stimulationen mit IL-6 an MSC 19, 22, 25, 30 und 36; **35 B:** n = 3 Stimulationen mit IL-8 an MSC 25 und 30). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Wilcoxon Signed Rank Test. Die Reduktion der  $\alpha$ -SMA Expression nach Zytokinstimulation gegen die Kontrolle war zum Niveau 5% nicht signifikant.

Zusammenfassend führte die Stimulation mit jedem der vier pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 oder IL-8 kulturübergreifend in insgesamt n = 8 untersuchten MSC-Kulturen verschiedener Frühgeborener unabhängig von deren BPD Schweregrad zu einem einheitlichen und stabilen Ergebnisbild mit einer Zytokin-induzierten Inhibition der  $\alpha$ -SMA Expression. Diese war für IL-1 $\beta$  statistisch signifikant, für TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8 als klarer, zuverlässig reproduzierbarer Trend nachweisbar.



Insgesamt veränderten die vier Zytokine folglich durch Induktion der Zellproliferation, Aktivierung von NF $\kappa$ B und Inhibierung der  $\alpha$ -SMA Expression den Phänotyp der MSCs entsprechend der Dysregulation, die mit einem schwereren BPD Grad der Frühgeborenen assoziiert war. Weiterführend sollten nun die der Zytokin-induzierten phänotypischen Dysregulation zugrunde liegenden molekularen Zusammenhänge näher untersucht werden.

### **4.3. Hemmung der Proliferation von MSCs im NF $\kappa$ B-Knock-Down-Modell**

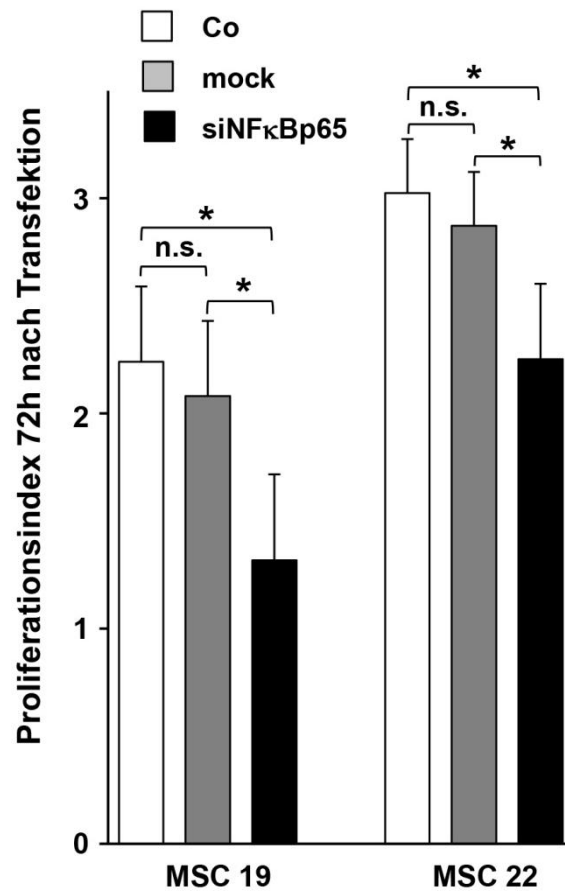
Aufgrund des unter 4.1.2. beschriebenen proliferationssteigernden Effekts der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und teilweise IL-8, ihrer Erhöhung des nukleären Aktivierungsstatus des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B (s. 4.2.1.) und der Inhibition der Expression des zytoskelettalen Proteins  $\alpha$ -SMA (s. 4.2.2.), stellte sich nun die Frage, ob auf molekularer Ebene ein Zusammenhang zwischen diesen drei Effekten der pro-inflammatorischen Zytokine besteht. Ist NF $\kappa$ B der zentrale Mediator auf dem Weg der zytokinvermittelten MSC-Proliferation und reguliert er den Signalweg der  $\alpha$ -SMA Synthese? Um diese Fragen zu beantworten, wurden zwei Versuchsreihen angesetzt. Mittels RNA Interferenz wurde ein NF $\kappa$ B Knockdown durchgeführt und zunächst die daraus resultierenden Effekte auf das Proliferationsverhalten und die  $\alpha$ -SMA Expression unstimulierter MSCs untersucht (s. 4.3.1.). Nach Verifizierung eines Funktionseffekts auf basaler Ebene wurden in einer zweiten Versuchsreihe die Zellen im Anschluss an die Transfektion mit si (small interfering) RNA gegen NF $\kappa$ Bp65 mit den pro-inflammatorischen Zytokinen stimuliert und der Effekt auf das Proliferationsverhalten direkt mit der unstimulierten Kontrolle verglichen. Da IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  bisher in allen durchgeführten Versuchen die stärksten und stabilsten Effekte der pro-inflammatorischen Zytokine auf die MSCs aufwiesen, wurden die Transfektionen mit begleitender Zytokinstimulation mit diesen beiden Zytokinen durchgeführt (s. 4.3.2.).

#### **4.3.1. Proliferationsinhibition unstimulierter MSCs im NF $\kappa$ B-Knock-Down-Modell**

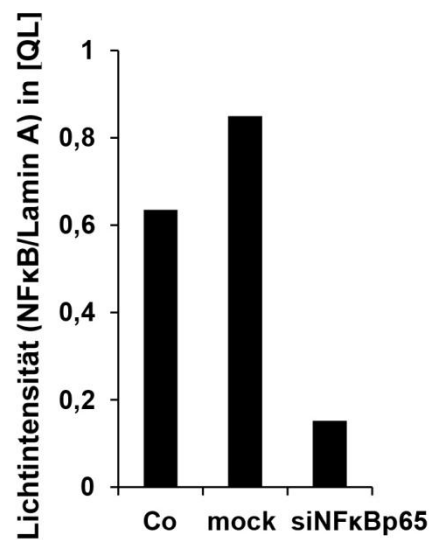
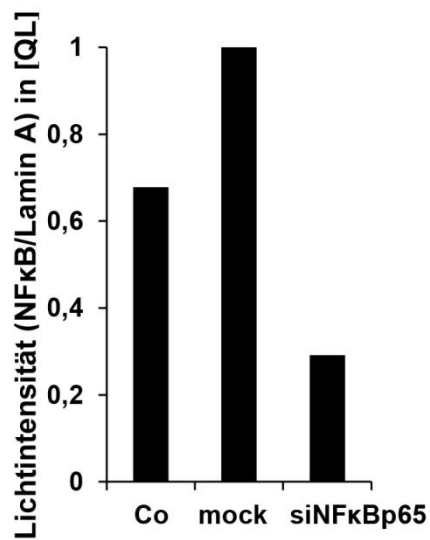
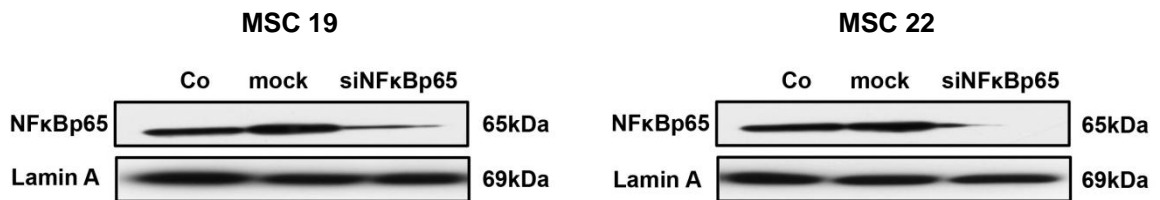
Zur Charakterisierung einer NF $\kappa$ B Abhängigkeit des Proliferationsverhaltens von MSCs aus dem Trachealsekret Frühgeborener wurde zunächst das Wachstum unstimulierter Zellen nach Knockdown des Transkriptionsfaktors mittels RNA Interferenz alle 24h durch automatisierte, repetitive Lichtmikroskopie im Cellscreen aufgezeichnet und parallel die Effizienz des Knockdowns im Western Blot überprüft (s. 3.2.4., 3.2.7. und 3.2.8.). Sowohl an der Kultur MSC 19, repräsentativ für ein Kind mit milder BPD, als auch an der Kultur

MSC 22, repräsentativ für ein Kind mit schwerer BPD, führte die siRNA gegen NFκBp65 zu einem effizienten Knockdown von NFκBp65 auf Proteinebene (36 B, Western Blot und AIDA Quantifizierungen). Der Knockdown des Transkriptionsfaktors war von einer statistisch signifikanten Inhibition der Spontanproliferation der MSCs begleitet (36 A), wobei der Einfluss des Knockdowns auf die Spontanproliferation bezogen auf zwei verschiedene Kontrollansätze untermauert wurde: Zum einen in Relation zum Spontanwachstum komplett unbehandelter MSCs ("Co"), zum anderen im Verhältnis zu MSCs, die mit einer "mock" Sequenz unter identischen Bedingungen transfiziert worden waren ("mock"), um eine Wachstumsminderung rein aufgrund eines zytostatischen Effekts des bei der Transfektion eingesetzten Transfektionsagens oder unspezifischer Nebeneffekte der siRNA unabhängig von der Sequenz auszuschließen. Zwischen beiden Kontrollansätzen "Co" und "mock" zeigte sich hierbei mit einem Wachstumsunterschied von 7% für MSC 19 und von 5% für MSC 22 keine signifikante Reduktion der Spontanproliferation durch Transfektion der MSCs mit der "mock" Sequenz. In Folgeversuchen wurde daher auf diese Differenzierung verzichtet und der "mock" Ansatz als Kontrolle mit identisch behandelten und transfizierten MSCs verwendet. Nach Transfektion der Zellen mit siNFκBp65 zeigte sich dagegen an MSC 19 eine signifikante Wachstumsinhibition mit einer Reduktion des Proliferationsindex um 41% gegenüber der Kontrolle "Co" und um 37% gegenüber der Kontrolle "mock". Für die Kultur MSC 22 betrug der Unterschied der Wachstumsminderung 25% gegenüber "Co" und 22% gegenüber "mock" (36 A). Darüber hinaus wurde nach Knockdown von NFκBp65 das Protein α-SMA untersucht. Wie aufgrund der deskriptiven Vorversuche der Arbeitsgruppe zu erwarten, wurde α-SMA nach RNA-Interferenz gegen NFκBp65 im Vergleich zu den Kontrollen "Co" und "mock" stärker exprimiert (36 C). Eine Reduktion funktionsfähigen NFκBs führte also zu einer Erhöhung des α-SMA Gehalts in MSCs. Somit besteht ein inverser Zusammenhang zwischen Spontanproliferation und α-SMA Expression, die über den NFκB Signalweg reguliert wird.

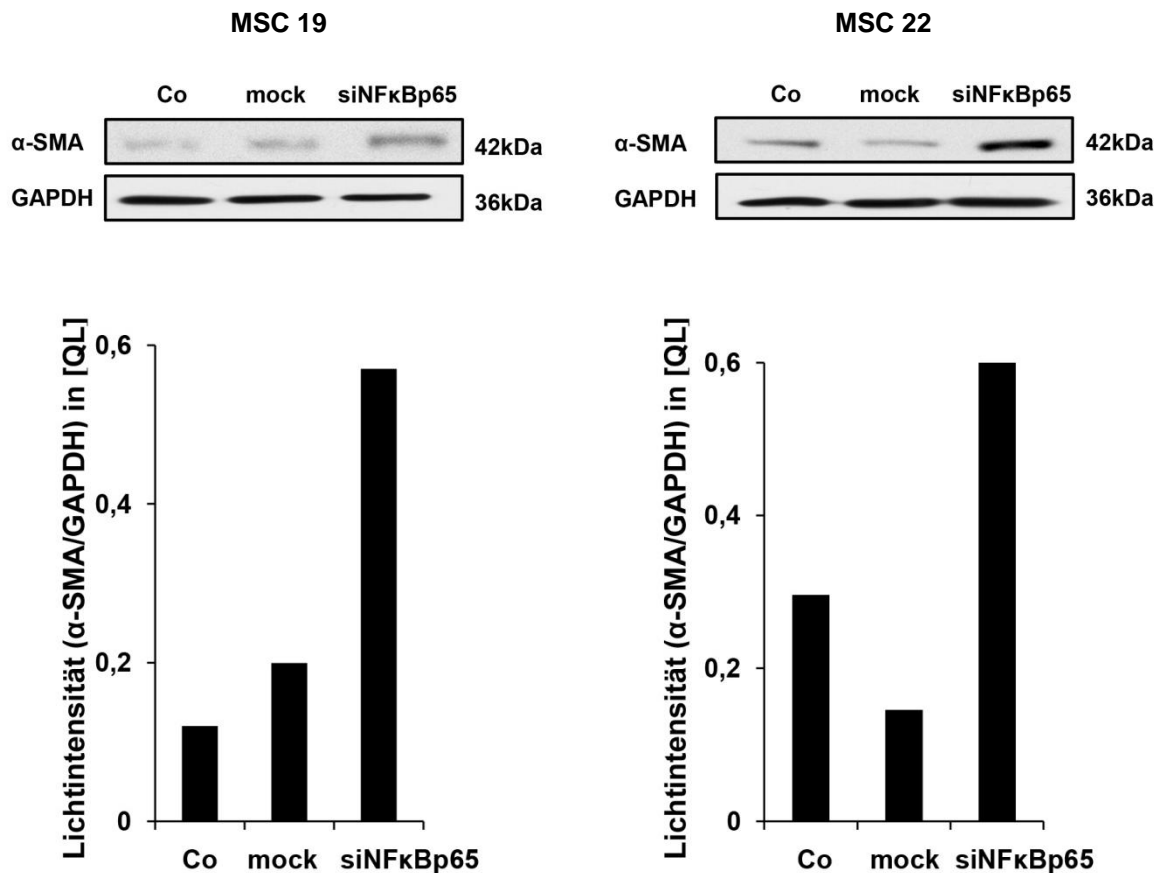
A)



B)



C)



**Abbildung 36:** Inhibition der Zellproliferation und Verstärkung der  $\alpha$ -SMA Expression nach Knock-down von NF $\kappa$ Bp65 in den Kulturen MSC 19 und 22

Ermittlung des Proliferationsverhaltens von MSCs nach Transfektion mit 20nM siRNA gegen die transkriptionsaktivierende Einheit NF $\kappa$ Bp65 bzw. nach Transfektion mit 20nM der Kontrollsequenz "mock" oder ohne Transfektion ("Co") im Cellscreen sowie Ermittlung der nukleären NF $\kappa$ Bp65 Konzentrationen und der  $\alpha$ -SMA Expression nach identischer Transfektion im Western Blot.

**36 A)** Darstellung des durch Cellscreenmessung ermittelten, mittleren Proliferationsindex aus  $n = 3$  Versuchen an der Kultur MSC 19 und aus  $n = 6$  Versuchen an der Kultur MSC 22, 72h nach Transfektion im Rahmen der Endpunktmessung. Die statistische Analyse erfolgte mittels einer einseitigen ANOVA (**A**nalysis **o**f **V**ariance). Es gilt die Kennzeichnung signifikanter Unterschiede zum Niveau 5% mit \* ( $p < 0,05$ ). Die mit \* gekennzeichneten Unterschiede sind auch nach Bonferoni - Adjustierung für multiples Testen signifikant; n.s. = nicht signifikant.

**36 B)** Darstellung der nukleären NF $\kappa$ Bp65 Konzentrationen im Western Blot 24h nach Transfektion sowie der zugehörigen, auf die Ladekontrolle standardisierten AIDA Quantifizierungen. Als Ladekontrolle wurde das nukleäre Filamentprotein Lamin A verwendet.

**36 C)** Darstellung der  $\alpha$ -SMA Expression 48h nach Transfektion im Western Blot sowie der zugehörigen, auf die Ladekontrolle standardisierten AIDA Quantifizierungen. Als Ladekontrolle wurde das Glykolyseenzym GAPDH genutzt.

#### 4.3.2. Proliferationsinhibition Zytokin-stimulierter MSCs im NFκB-Knock-Down-Modell

Nach der unter 4.3.1. nachgewiesenen NFκB Abhängigkeit der Spontanproliferation der MSCs wurde nun überprüft, ob auch der proliferationsfördernde Effekt der pro-inflammatorischen Zytokine über den Transkriptionsfaktor NFκB vermittelt wird. Dazu wurden Zellen der Kultur MSC 19, als Vertreter eines Kindes mit milder BPD, und Zellen der Kultur MSC 22, als Vertreter eines Kindes mit schwerer BPD mit siRNA gegen NFκBp65 und der Kontroll-siRNA "mock" transfiziert. Hierbei wurde jedoch im Gegensatz zu den vorher unter 4.3.1. eingesetzten 20nM die siRNA in einer niedrigeren Konzentration von 2nM (s. auch 3.2.3. und 3.2.8.) eingesetzt. Durch diese niedriger dosierte Transfektion sollte in diesem Versuchsansatz die basale NFκB Expression und die Spontanproliferation möglichst wenig beeinflusst werden. Gleichzeitig musste im Rahmen der Analysen überprüft werden, ob die NFκB Aktivierung durch die pro-inflammatorischen Zytokine durch den Knockdown zuverlässig reduziert und ob unter dieser Bedingung die durch die pro-inflammatorischen Zytokine verstärkte Proliferation verhindert oder partiell reduziert wird.

Im Western Blot zeigte sich nach RNA Interferenz gegen NFκBp65 die Expression des Transkriptionsfaktors auf basaler Ebene weitgehend unbeeinträchtigt, während nach Stimulation mit IL-1β sowohl an MSC 19 (37 A) als auch an MSC 22 (37 B) die Aktivierung von NFκBp65 im Vergleich zur Zytokin-stimulierten "mock"-Kontrolle stark reduziert und der Knockdown damit erfolgreich war. Analog dazu war die Spontanproliferation der MSCs nach Transfektion mit siNFκBp65 im Vergleich zu den mit "mock" transfizierten Kontrollzellen nur geringradig und, im Gegensatz zu den höher dosierten Transfektionen in 4.3.1., nicht statistisch signifikant eingeschränkt (37 A und B). Nach Stimulation der MSCs mit IL-1β zeigten die Kontrollzellen, "mock+IL-1β", analog zu ihrem hohem NFκB Aktivierungsstatus auf molekularer Ebene eine zum Endzeitpunkt 120h 20% (MSC 19, 37 A) bzw. 33% (MSC 22, 37 B) erhöhte Zellproliferation gegenüber der unstimulierten Kontrolle "mock". Der Wachstumsunterschied war für MSC 19 120h nach Zytokinzugabe, für MSC 22 zu den Zeitpunkten 48h, 72h, 96h und 120h gegenüber der unstimulierten Kontrolle "mock" statistisch signifikant. In der vergleichweisen Betrachtung der mit siRNA gegen NFκBp65 transfizierten MSCs war die Zellproliferation 120h nach Stimulation mit IL-1β zwar mit 10% für MSC 19 und 26% für MSC 22 immer noch stärker als die Spontanproliferation der siNFκBp65-Kontrolle, jedoch war der Wachstumsunterschied zu ihrer Kontrolle um vieles geringer, als der der „mock“ transfizierten und stimulierten Zellen zu der jeweiligen „mock“-Kontrolle und die

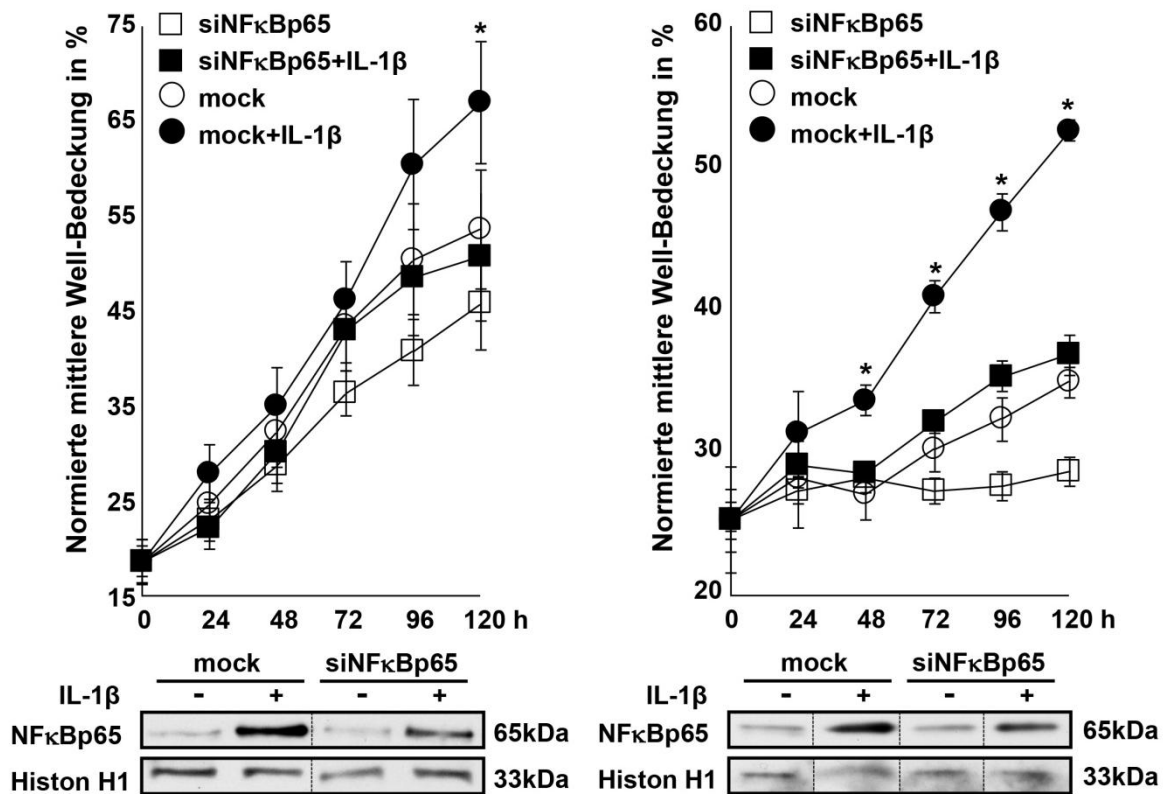
Wachstumsdifferenz war weder bei MSC 19 noch bei MSC 22 statistisch signifikant (37 A und B).

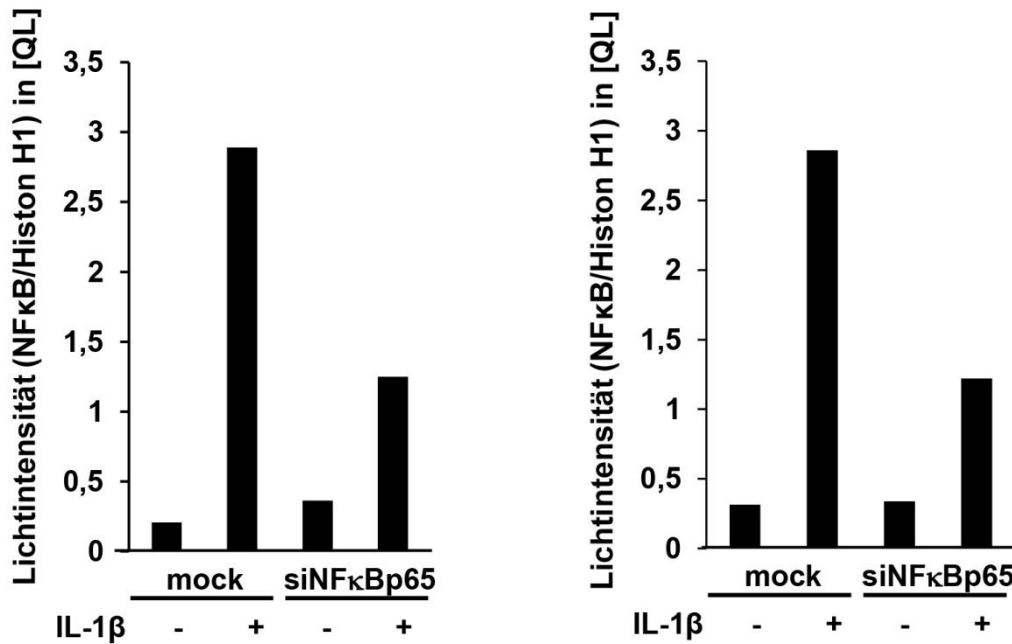
Vergleicht man jedoch die Wachstumskurven "mock+IL-1 $\beta$ " und "siNF $\kappa$ Bp65+IL-1 $\beta$ ", so ist die Zellproliferation der MSCs mit Zytokinstimulation und NF $\kappa$ B Knockdown, "siNF $\kappa$ Bp65+IL-1 $\beta$ ", zum Zeitpunkt 120h mit 23% bei MSC 19 (37 A) und 25% bei MSC 22 (37 B) gegenüber den Zytokin-stimulierten Zellen ohne NF $\kappa$ B Knockdown, "mock+IL-1 $\beta$ ", reduziert. Der Wachstumsunterschied "siNF $\kappa$ Bp65+IL-1 $\beta$ " gegen "mock+IL-1 $\beta$ " war für MSC 19 (37 A) 120h nach Stimulation und für MSC 22 (37 B) zu den Zeitpunkten 48h, 72h, 96h und 120h statistisch signifikant.

Die Reduktion aktivierten NF $\kappa$ Bs durch vorherige Transfektion mit siNF $\kappa$ Bp65 führte folglich zu einer signifikanten Abnahme des proliferationsfördernden Effekts von IL-1 $\beta$ . Die Inhibition der Zytokin-induzierten Mehrproliferation durch einmalige Transfektion der MSCs persistierte somit über den gesamten Zeitraum des experimentellen Settings.

A) MSC 19 – IL-1 $\beta$

B) MSC 22 – IL-1 $\beta$





**Abbildung 37:** Inhibition der IL-1 $\beta$  induzierten Mehrproliferation im NF $\kappa$ B-Knock-Down-Modell an MSC 19 (37 A, n = 4 Experimente) und MSC 22 (37 B, n = 4 Experimente)

Einen Tag nach Transfektion mit 2nM siRNA gegen NF $\kappa$ Bp65 oder 2nM der Kontrollsequenz "mock" wurden die MSCs mit 100ng/ml IL-1 $\beta$  stimuliert und die Zellproliferation im 24h-Rhythmus im Cellscreen aufgezeichnet. Die statistische Analyse erfolgte nach Berechnung der Standardfehler und der Mittelwerte der jeweils n = 4 an MSC 19 bzw. an MSC 22 durchgeführten Experimente für jeden Zeitpunkt t[0-120]h mittels ANOVA (**A**nalysis of **V**ariance). Es gilt die Kennzeichnung signifikanter Unterschiede zum Niveau 5% mit \* ( $p < 0,05$ ). Die mit \* gekennzeichneten Unterschiede sind auch nach Bonferoni - Adjustierung für multiples Testen signifikant.

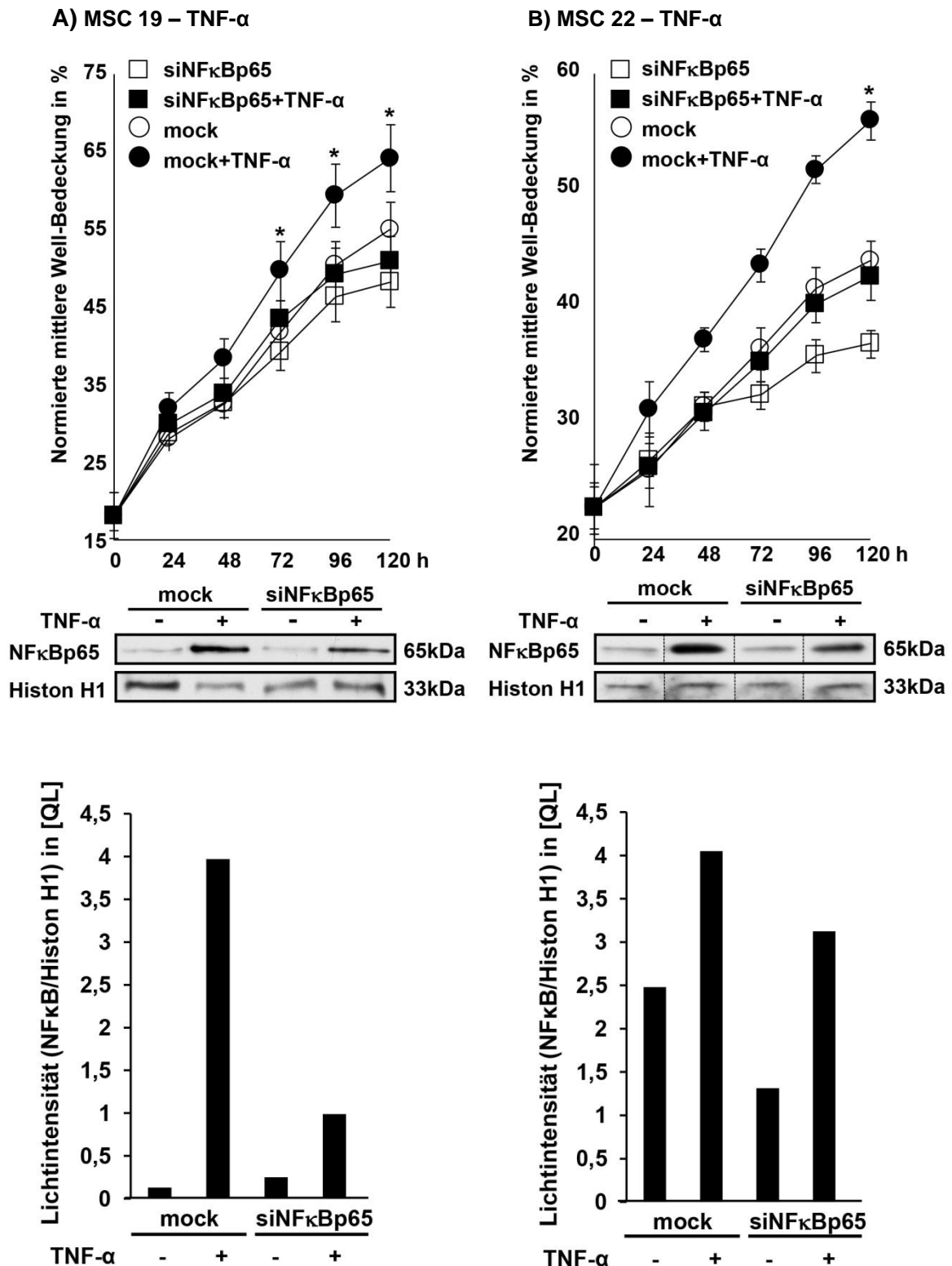
Für die Western Blot Analysen wurden die Kernlysate zur Untersuchung der NF $\kappa$ B Expression 2h nach Zytokinstimulation gewonnen. Die Quantifizierung und Standardisierung der im Western Blot detektierten Proteinmengen auf die Ladekontrolle Histon H1 erfolgte mit Hilfe der AIDA Image Analyzer Software. In den Abbildungen der Western Blot Analysen wurden Banden für eine sinnvolle Anordnung aus dem identischen Gel ausgeschnitten und in der abgebildeten Reihenfolge, ohne weitere Bearbeitung wieder aneinander gefügt (Markierung durch Trennlinien).

Analog zu IL-1 $\beta$  zeigte die Western Blot Analyse nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  in den mit siNF $\kappa$ Bp65 transfizierten MSCs sowohl der Kultur MSC 19 (38 A) als auch der Kultur MSC 22 (38 B) im Vergleich zur Zytokin-stimulierten "mock"-Kontrolle eine deutlich reduzierte NF $\kappa$ Bp65 Aktivierung und damit einen erfolgreichen Knockdown des Transkriptionsfaktors. Entsprechend der niedriger gewählten siRNA Dosis, um die basale NF $\kappa$ Bp65 Expression möglichst wenig zu beeinflussen, war die Spontanproliferation der mit siNF $\kappa$ Bp65 transfizierten MSCs im Vergleich zur unstimulierten "mock"-Kontrolle nur geringfügig reduziert und der Wachstumsunterschied, im Gegensatz zu den höher dosierten Transfektionen in 4.3.1., nicht statistisch signifikant. Die Stimulation der mit der Kontrollsequenz "mock" transfizierten MSCs mit TNF- $\alpha$  induzierte im Vergleich zur unstimulierten "mock"-Kontrolle eine um 15% (MSC 19, 38 A) bzw. um 21% (MSC 22, 38 B) erhöhte Zellproliferation zum Zeitpunkt 120h nach TNF- $\alpha$  Zugabe. Die

Mehrproliferation von "mock+TNF- $\alpha$ " gegen "mock" war für MSC 19 (38 A) zu den Zeitpunkten 72h, 96h und 120h und für MSC 22 (38 B) zum Zeitpunkt 120h nach TNF- $\alpha$  Stimulation statistisch signifikant. Betrachtet man hingegen die mit TNF- $\alpha$  stimulierten, jedoch mit siNF $\kappa$ Bp65 transfizierten MSCs im Vergleich zu ihrer siNF $\kappa$ Bp65-Kontrolle, so war zwar eine geringfügige Mehrproliferation zu erkennen, der Wachstumsunterschied zwischen "siNF $\kappa$ Bp65+TNF- $\alpha$ " und "siNF $\kappa$ Bp65" jedoch mit nur 5% bei MSC 19 und 13% bei MSC 22 zu keinem Zeitpunkt signifikant. Besonders bei der Kultur MSC 19 (38 A), an der der Knockdown nach siNF $\kappa$ Bp65 Interferenz und TNF- $\alpha$  Stimulation im Vergleich zur TNF- $\alpha$  stimulierten "mock"-Kontrolle mit einer Reduktion der NF $\kappa$ B Expression um 75% im Western Blot besonders effizient durchgeführt werden konnte, deckte sich die Wachstumskurve der MSCs "siNF $\kappa$ Bp65+TNF- $\alpha$ " fast mit der Wachstumskurve der siNF $\kappa$ Bp65-Kontrolle. Vergleicht man die Proliferation von "mock+TNF- $\alpha$ " mit der von "siNF $\kappa$ Bp65+TNF- $\alpha$ ", so war das Zellwachstum der mit TNF- $\alpha$  stimulierten MSCs mit NF $\kappa$ B Knockdown, "siNF $\kappa$ Bp65+TNF- $\alpha$ ", im Vergleich zur TNF- $\alpha$  stimulierten Kontrolle ohne Knockdown, "mock+TNF- $\alpha$ ", 120h nach TNF- $\alpha$  Zugabe um 20% (38 A) bzw. um 24% (38 B) reduziert. Der Wachstumsunterschied "mock+TNF- $\alpha$ " gegen "siNF $\kappa$ Bp65+TNF- $\alpha$ " war zu den Zeitpunkten 72h, 96h und 120h nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  für MSC 19 (38 A) und zum Zeitpunkt 120h nach TNF- $\alpha$  Zugabe für MSC 22 (38 B) statistisch signifikant.

Die Reduktion aktivierten NF $\kappa$ Bs durch vorherige Transfektion mit siNF $\kappa$ Bp65 führte folglich analog zu den IL-1 $\beta$  Versuchen zu einer signifikanten Abnahme des proliferationsfördernden Effekts von TNF- $\alpha$ . Die Inhibition der Zytokin-induzierten Mehrproliferation persistierte auch in diesen Stimulationen über den gesamten Zeitraum des experimentellen Settings.





**Abbildung 38:** Inhibition der TNF- $\alpha$  induzierten Mehrproliferation im NF $\kappa$ B-Knock-Down-Modell an MSC 19 (38 A, n = 7 Experimente) und MSC 22 (38 B, n = 7 Experimente)  
 Einen Tag nach Transfektion mit 2nM siRNA gegen NF $\kappa$ Bp65 oder 2nM der Kontrollsequenz "mock" wurden die MSCs mit 300ng/ml TNF- $\alpha$  stimuliert und die Zellproliferation im 24h-Rhythmus im Cellscreen aufgezeichnet. Die statistische Analyse erfolgte nach Berechnung der Standardfehler und der Mittelwerte der jeweils n = 7 an MSC 19 bzw. an MSC 22 durchgeführten Experimente für jeden Zeitpunkt t[0-120]h mittels ANOVA (**A**nalysis of **V**ariance). Es gilt die Kennzeichnung signifikanter Unterschiede zum Niveau 5% mit \* (p<0,05). Die mit \*

gekennzeichneten Unterschiede sind auch nach Bonferoni - Adjustierung für multiples Testen signifikant.

Für die Western Blot Analysen wurden die Kernlysate zur Untersuchung der NF $\kappa$ B Expression 2h nach Zytokinstimulation gewonnen. Die Quantifizierung und Standardisierung der im Western Blot detektierten Proteinmengen auf die Ladekontrolle Histon H1 erfolgte mit Hilfe der AIDA Image Analyzer Software. In den Abbildungen der Western Blot Analysen wurden Banden für eine sinnvolle Anordnung aus dem identischen Gel ausgeschnitten und in der abgebildeten Reihenfolge, ohne weitere Bearbeitung wieder aneinander gefügt (Markierung durch Trennlinien).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , bei ungestörter basaler Expression des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B, zu einer signifikanten Mehrproliferation der MSCs führen, die jedoch mit Knockdown der transkriptionsaktivierenden NF $\kappa$ Bp65-Einheit durch RNA Interferenz und damit Mangel an aktiviertem NF $\kappa$ B inhibiert wird. Die signifikante Proliferationsreduktion der mit siNF $\kappa$ Bp65 transfizierten und Zytokin-stimulierten MSCs im Vergleich zu den mit "mock" transfizierten und Zytokin-stimulierten Kontrollzellen zeigt, dass der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B eine entscheidende Rolle in der Vermittlung der Zytokin-induzierten Effekte auf die Proliferation der MSCs spielt.

#### **4.4. Intrazelluläre Signaltransduktion von TGF- $\beta$ 1 und seine Wirkung auf die Proteinexpression in MSCs**

Nach detaillierten Studien zu den Zytokinen IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8 folgte nun die Untersuchung der Effekte des Transforming Growth Factors- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1, auf die Proteinexpression der MSCs sowie die Charakterisierung der intrazellulären Signaltransduktion nach TGF- $\beta$ 1 Stimulation. Im Gegensatz zu den anderen vier Hauptzytokinen der pulmonalen Inflammationsreaktion, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8, war für TGF- $\beta$ 1 eine anti-proliferative Wirkung detektiert worden (s. 4.1.2.).

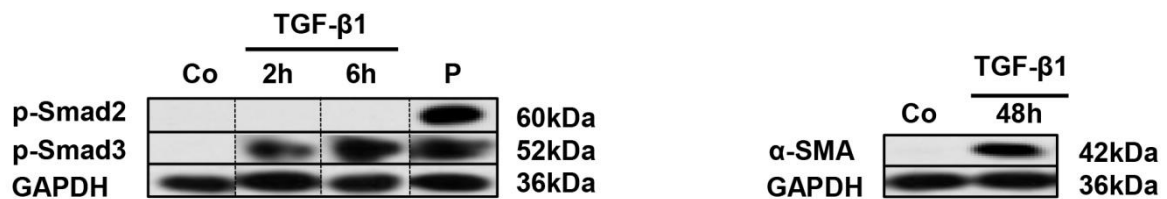
TGF- $\beta$ 1 ist bereits als Induktor der Differenzierung von MSCs zu Myofibroblasten und damit für die Synthesesteigerung des Markerproteins  $\alpha$ -SMA über den Smad-Signalweg bekannt. Bei diesem werden, nach Bindung von TGF- $\beta$ 1 an den Rezeptor, die rezeptorgebundenen Smadproteine 2 und 3 phosphoryliert. P-Smad2 und p-Smad3 dissoziieren vom Rezeptor und wandern, wie unter 1.2.3.3./Abbildung 9 näher beschrieben, als heteromerer Komplex mit Smad4 in den Zellkern zur Regulation der Proteintranskription (Bartram and Speer 2004).

Zum Nachweis der reibungslosen Funktionsfähigkeit des TGF- $\beta$ 1 Signalwegs in MSCs aus dem Trachealsekret Frühgeborener unter laborchemischen Bedingungen wurde zunächst die  $\alpha$ -SMA Expression sowie die Phosphorylierung der Smad-Proteine, Smad2 und Smad3, nach Stimulation der MSCs mit TGF- $\beta$ 1 getestet.

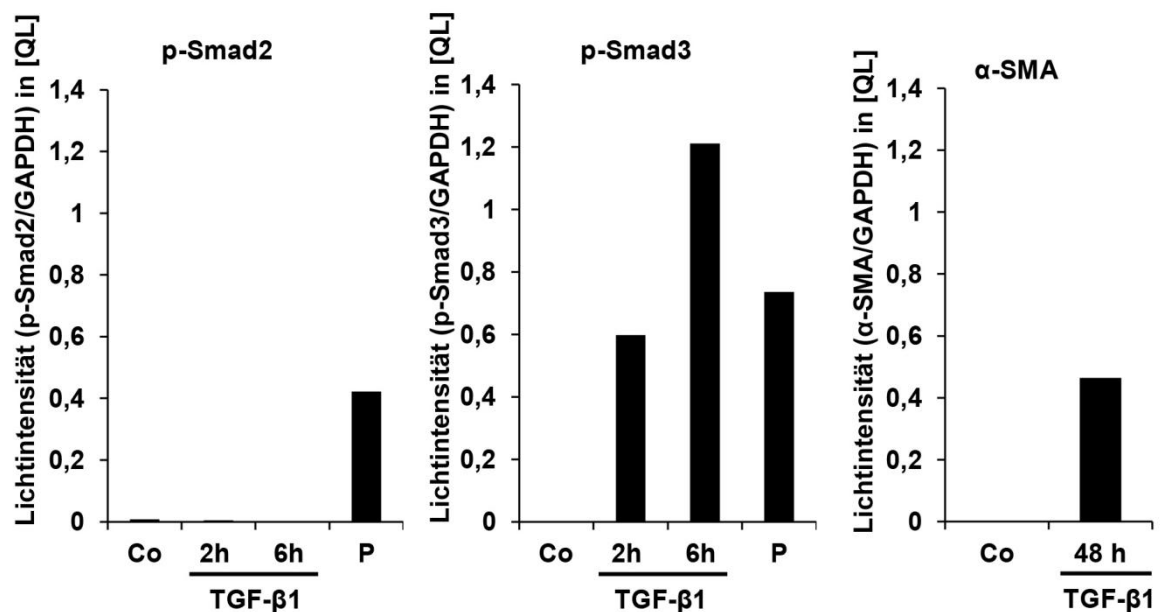
Sowohl in der Kultur MSC 22 (Abb. 39) als auch in der Kultur MSC 21 (Abb. 40) führte die Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 nach 48h zu einer stark erhöhten  $\alpha$ -SMA Expression im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle als Zeichen eines intakten Signalweges.

Ebenfalls war in beiden Kulturen MSC 22 (Abb. 39) und MSC 21 (Abb. 40) 2h und 6h nach Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 ein starkes Signal an phosphoryliertem und damit aktiviertem p-Smad3 detektierbar. Dieses Ergebnis konnte in 11 von insgesamt 11 Stimulationen mit TGF- $\beta$ 1 an verschiedenen Kulturen bestätigt werden. Zu einer Aktivierung und Phosphorylierung von Smad2 kam es allerdings nur in 4 von 11 Stimmulationsversuchen mit TGF- $\beta$ 1. Daher wurde als Beispiel einer Phosphorylierung von Smad2 nach TGF- $\beta$ 1 Stimulation die Kultur MSC 21 (Abb. 40) gewählt, bei der in zwei unabhängigen Versuchen beide Male sowohl Smad3 als auch Smad2 phosphoryliert wurden. Abb. 39 repräsentiert einen der 7 Versuche bei dem es zu einer isolierten Phosphorylierung von Smad3 kam. Die Funktionstüchtigkeit der p-Smad2 und p-Smad3 Antikörper zeigt die Positivkontrolle (P).

A) MSC 22



B)

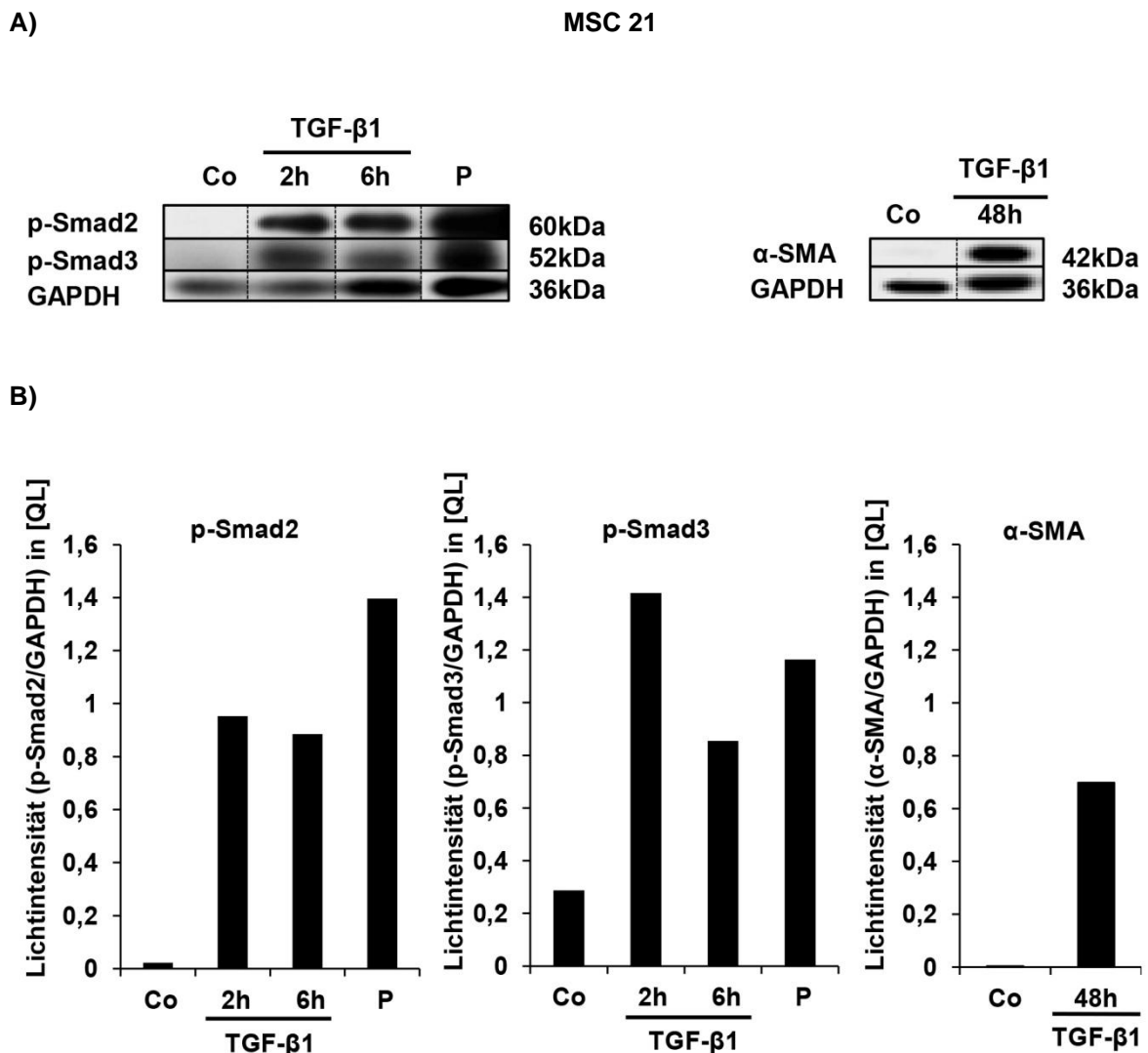


**Abbildung 39:** p-Smad3 Aktivierung und Induktion der  $\alpha$ -SMA Expression nach Stimulation der Kultur MSC 22 mit TGF- $\beta$ 1

Zellpellets zur Überprüfung der Phosphorylierung von Smad2 und Smad3 wurden 2h bzw. 6h, Zellpellets zur Überprüfung der  $\alpha$ -SMA Expression 48h nach Stimulation mit 10ng/ml TGF- $\beta$ 1 gewonnen. Als Positivkontrolle (P) für p-Smad2 und p-Smad3 wurden HeLa-Zellen verwendet, deren positives Signal die Funktionsfähigkeit der p-Smad2 und p-Smad3 Antikörper zeigt.

**39 A)** Western Blot Analyse der Smad-Phosphorylierung (links) und der  $\alpha$ -SMA Expression (rechts) mit ihrer zugehörigen Ladekontrolle GAPDH. Für eine sinnvolle Anordnung der dargestellten Banden wurden diese aus demselben Western Blot Gel ausgeschnitten, in der ursprünglichen Reihenfolge umgestellt und ohne weitere Bearbeitung in obiger Reihenfolge wieder aneinander gefügt (Markierung durch Trennlinien).

**39 B)** Quantifizierung der in den Western Blot Analysen detektierten Proteinsignale mit der AIDA Image Analyzer Software und Standardisierung der Smad- bzw.  $\alpha$ -SMA Signale auf die jeweilige Ladekontrolle.



**Abbildung 40:** p-Smad2 und p-Smad3 Aktivierung und Induktion der  $\alpha$ -SMA Expression nach Stimulation der Kultur MSC 21 mit TGF- $\beta$ 1

Zellpellets zur Überprüfung der Phosphorylierung von Smad2 und Smad3 wurden 2h bzw. 6h, Zellpellets zur Überprüfung der  $\alpha$ -SMA Expression 48h nach Stimulation mit 10ng/ml TGF- $\beta$ 1 gewonnen. Als Positivkontrolle (P) für p-Smad2 und p-Smad3 wurden HeLa-Zellen verwendet, deren positives Signal die Funktionsfähigkeit der p-Smad2 und p-Smad3 Antikörper zeigt.

**40 A)** Western Blot Analyse der Smad-Phosphorylierung (links) und der  $\alpha$ -SMA Expression (rechts) mit ihrer zugehörigen Ladekontrolle GAPDH. Für eine sinnvolle Anordnung der dargestellten Banden wurden diese aus demselben Western Blot Gel ausgeschnitten, in der ursprünglichen

Reihenfolge umgestellt und ohne weitere Bearbeitung in obiger Reihenfolge wieder aneinander gefügt (Markierung durch Trennlinien).

**40 B)** Quantifizierung der in den Western Blot Analysen detektierten Proteinsignale mit der AIDA Image Analyzer Software und Standardisierung der Smad- bzw.  $\alpha$ -SMA Signale auf die jeweilige Ladekontrolle.

Da in allen 11 mit TGF- $\beta$ 1 stimulierten Zellkulturen p-Smad3 aktiviert wurde und nur viermal eine Aktivierung und Phosphorylierung von Smad2 nachweisbar war, besteht die Vermutung, dass die intrazelluläre Signalweiterleitung eines TGF- $\beta$ 1 Stimulus in MSCs aus dem Trachealsekret Frühgeborener vornehmlich über p-Smad3 läuft. Dieses Ergebnis hängt allerdings eventuell auch von den individuellen Eigenschaften der jeweiligen Kultur ab und ist nicht generell auf alle Kulturen übertragbar. Das Ergebnis steht im Einklang mit der Literatur, die das Vorherrschen von p-Smad3 in der Signalübertragung von TGF- $\beta$ 1 Stimuli z.B. in Fibroblasten und Myofibroblasten in einem plasmidgesteuerten Überexpressionsmodell bestätigt, in dem es bei Überexpression von Smad3, nicht aber bei Überexpression von Smad2 zu einer TGF- $\beta$ 1 induzierten  $\alpha$ -SMA Expression kam (Gu, Zhu et al. 2007).

#### **4.5. Interaktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8 mit TGF- $\beta$ 1**

Das pulmonale Inflammationsgeschehen der bronchopulmonalen Dysplasie ist nicht nur durch das Vorhandensein vielzähliger pro-inflammatorischer Zytokine, anti-inflammatorischer Zytokine und Wachstumsfaktoren gekennzeichnet, sondern vor allem auch durch eine komplexe Dysregulation der Expression dieser Faktoren mit einem Ungleichgewicht zugunsten der pro-inflammatorischen Seite (Speer 2009). Die Einzeleffekte der Hauptzytokine der pulmonalen Inflammationsreaktion, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 und TGF- $\beta$ 1, auf den Phänotyp und die Proteinexpression von MSCs aus dem Trachealsekret Frühgeborener wurden bereits in den vorhergehenden Studien charakterisiert (s. 4.1. - 4.4.).

Da im Inflammationsgeschehen der chronischen Lungenerkrankung des Frühgeborenen jedoch alle Faktoren in einem komplexen Netzwerk interagieren, sollte nun der Einfluss der verschiedenen Zytokine simultan auf die MSCs untersucht und somit der Nettoeffekt beurteilt werden. Dazu wurden im Folgenden Doppelstimulationen mit den pro-proliferativen Zytokinen IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-6 und dem anti-proliferativen TGF- $\beta$ 1 vorgenommen und der Effekt der Zytokininteraktion auf das Proliferationsverhalten der MSCs analysiert. Ebenfalls wurde der Effekt der Interaktion von IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 oder IL-8 mit TGF- $\beta$ 1 auf die molekulare Proteinexpression charakterisiert.

#### 4.5.1. Effekt der Interaktion auf das Proliferationsverhalten der MSCs

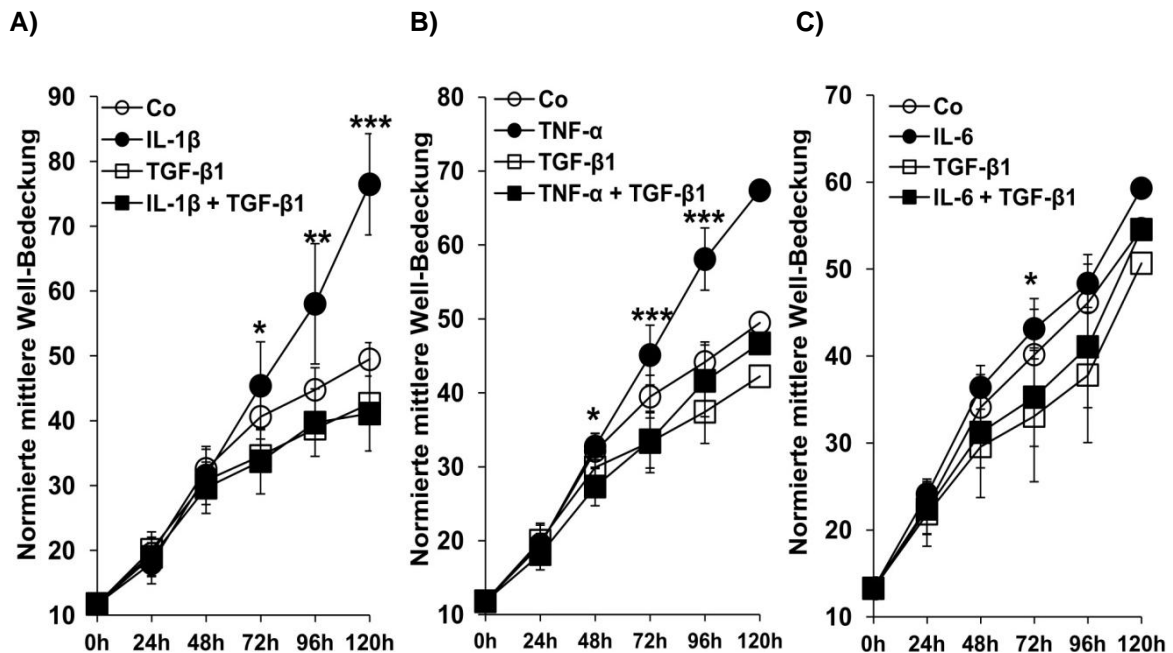
Zur Charakterisierung des Proliferationsverhaltens von MSCs nach Simultanstimulation mit TGF- $\beta$ 1 und IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  oder IL-6 wurde das bereits zuvor verwendete experimentelle Setting der Einzelstimulationen mit Bestimmung des Zellwachstums durch repetitive Cellscreenmessungen im 24-Stunden-Rhythmus in identischer Weise für die Kombinationsstimulationen mit je 2 Zytokinen benützt (s. 3.2.3. und 3.2.4.). Auf die Stimulation mit IL-8 wurde, wegen des unter 4.1.2. nicht eindeutig reproduzierbaren, proliferationsfördernden Effekts, verzichtet.

Die MSC-Stimulation mit IL-1 $\beta$  führte zu den Zeitpunkten 96h und 120h nach Zytokin-Zugabe mit einer um 30% und 54% erhöhten Well-Bedeckung im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle "Co" zu einer statistisch signifikanten Mehrproliferation der stimulierten Zellen (41 A). Im Gegensatz dazu war die MSC-Proliferation nach Stimulation mit TGF- $\beta$ 1, entsprechend den Vorversuchen, deutlich vermindert und nach 120h um 14% gegenüber der Kontrolle reduziert. Gegen die mit IL-1 $\beta$  stimulierten MSCs war die Proliferation der TGF- $\beta$ 1 stimulierten Zellen nach 120h um 44% vermindert und der Wachstumsunterschied zu den Zeitpunkten 72h, 96h und 120h statistisch signifikant. Das Zellwachstum der doppelstimulierten MSCs war zu den Zeitpunkten 72h, 96h und 120h ebenfalls signifikant gegenüber den mit IL-1 $\beta$  stimulierten MSCs reduziert und zeigte mit einer Wachstumsreduktion um 46% nach 120h das Überwiegen der TGF- $\beta$ 1 Wirkung an (41 A).

Analog zu der IL-1 $\beta$ /TGF- $\beta$ 1 Kombinationsstimulation zeigte sich nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  eine gegenüber der Kontrolle zu den Zeitpunkten 48h, 72h und 96h signifikant erhöhte Zellproliferation mit einer zu den Zeitpunkten 96h bzw. 120h nach TNF- $\alpha$  Zugabe 31% bzw. 36% dichteren Well-Bedeckung (41 B). TGF- $\beta$ 1 führte zu einer deutlichen Wachstumsinhibition mit einer um 14% reduzierten Proliferation der stimulierten MSCs gegenüber der Kontrolle bzw. einer um 37% reduzierten Proliferation gegen TNF- $\alpha$  nach 120h. Die Wachstumsinhibition durch TGF- $\beta$ 1 war gegenüber der Kontrolle zum Zeitpunkt 72h, gegenüber den mit TNF- $\alpha$  stimulierten MSCs zu den Zeitpunkten 72h und 96h statistisch signifikant. Durch Überwiegen der Wirkung von TGF- $\beta$ 1 war bei den doppelt stimulierten MSCs (TGF- $\beta$ 1+TNF- $\alpha$ ) eine signifikante Wachstumsinhibition gegenüber den allein mit TNF- $\alpha$  stimulierten Zellen zu den Zeitpunkten 48h, 72h und 96h mit einer um 28% (96h) bzw. 31% (120h) verminderten Zellproliferation zu beobachten. Gegenüber der Kontrolle war das Zellwachstum 96h und 120h nach Zugabe von TGF- $\beta$ 1+TNF- $\alpha$  um jeweils 6% reduziert und der Wachstumsunterschied 72h nach Stimulation statistisch signifikant (41 B).

Die Kombinationsstimulationen mit IL-6 und TGF- $\beta$ 1 (41 C) ergaben denselben Wachstumstrend wie die beiden hochsignifikanten Versuche mit IL-1 $\beta$ +TGF- $\beta$ 1 bzw. TNF- $\alpha$ +TGF- $\beta$ 1. Auch nach Kombinationsstimulation mit IL-6+TGF- $\beta$ 1 war die Zellproliferation deutlich vermindert und schloss sich der Wachstumskurve der MSCs an, die rein mit TGF- $\beta$ 1 stimuliert worden waren. Der Wachstumsunterschied der mit IL-6 stimulierten MSCs gegenüber den mit TGF- $\beta$ 1 stimulierten MSCs war mit 23% 72h nach Stimulation signifikant (41 C).

In allen drei Stimulationsansätzen 41 A, B und C ist deutlich zu erkennen, dass TGF- $\beta$ 1 in seiner bisher verwendeten Standardkonzentration von 10ng/ml den proliferationsfördernden Effekt der pro-inflammatorischen Zytokine vollständig aufhebt und mit seiner proliferationsinhibierenden Wirkung überwiegt.



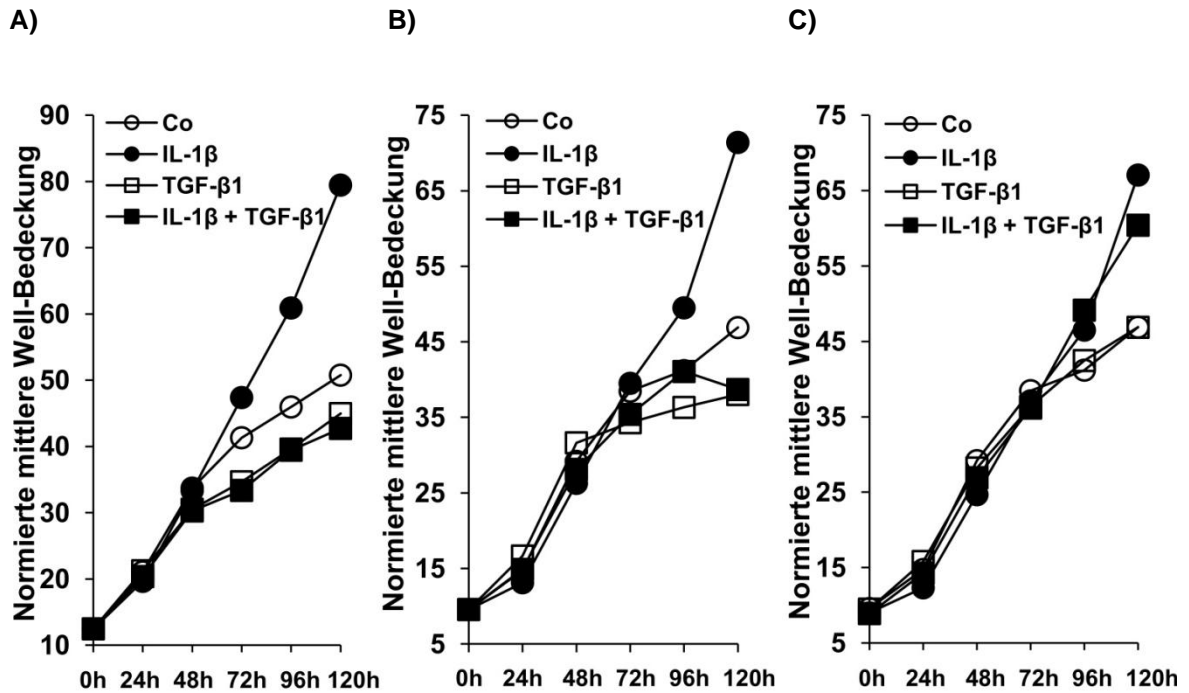
**Abbildung 41:** Inhibition der Zellproliferation nach Kombinationsstimulation der MSCs mit TGF- $\beta$ 1 und einem der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  (41 A, n = 4 Experimente), TNF- $\alpha$  (41 B, n = 5 Experimente) und IL-6 (41 C, n = 3 Experimente) an der Kultur MSC 19

Nach Stimulation der MSCs mit 100ng/ml IL-1 $\beta$ , 300ng/ml TNF- $\alpha$  oder 100ng/ml IL-6 einzeln oder mit 10ng/ml TGF- $\beta$ 1 einzeln oder mit der Kombination Zytokin + TGF- $\beta$ 1 wurde die Zellproliferation im 24h-Rhythmus mittels Cellscreenmessungen aufgezeichnet. Im Anschluss wurde zu jedem Zeitpunkt der Standardfehler sowie der Mittelwert identisch stimulierter Experimente berechnet und die Well-Bedeckung auf die der Kontrolle zum Startzeitpunkt normiert. Da die Proliferationsmessung in 41 B und 41 C nur bei einem Versuchsansatz bis 120h nach Stimulation fortgeführt wurde, entfiel zu diesem Zeitpunkt in diesen Graphiken der Standardfehler. Die statistische Analyse erfolgte bis 96h mit einer einseitigen ANOVA (**A**nalysis of **V**ariance). Es gilt die Kennzeichnung signifikanter Unterschiede zum Niveau 5%, 1% bzw. 0,1% mit \*(p<0,05), \*\*\*(p<0,001) bzw. \*(p<0,05), \*(p<0,05) bzw. \*(p<0,05). Die mit \* gekennzeichneten Unterschiede sind auch nach Bonferoni-Adjustierung für multiples Testen signifikant.

Des Weiteren sollte die in den Kombinationsstimulationen überwiegende proliferationsinhibierende Wirkung von TGF- $\beta$ 1 auf Dosisabhängigkeit von der vorliegenden TGF- $\beta$ 1 Konzentration geprüft werden. Dazu wurden die MSCs mit drei verschiedenen, abnehmenden TGF- $\beta$ 1 Konzentrationen (10ng/ml, 1ng/ml und 0,1ng/ml) stimuliert. Zusätzlich wurden Kombinationsstudien mit IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  durchgeführt, die aufgrund ihres starken proliferationsfördernden Effekts ausgewählt und weiterhin in ihren Standarddosierungen eingesetzt wurden. Das Zellwachstum wurde entsprechend der bisherigen Proliferationsstudien mittels Cellscreenmessungen ermittelt (s. 3.2.3. und 3.2.4.).

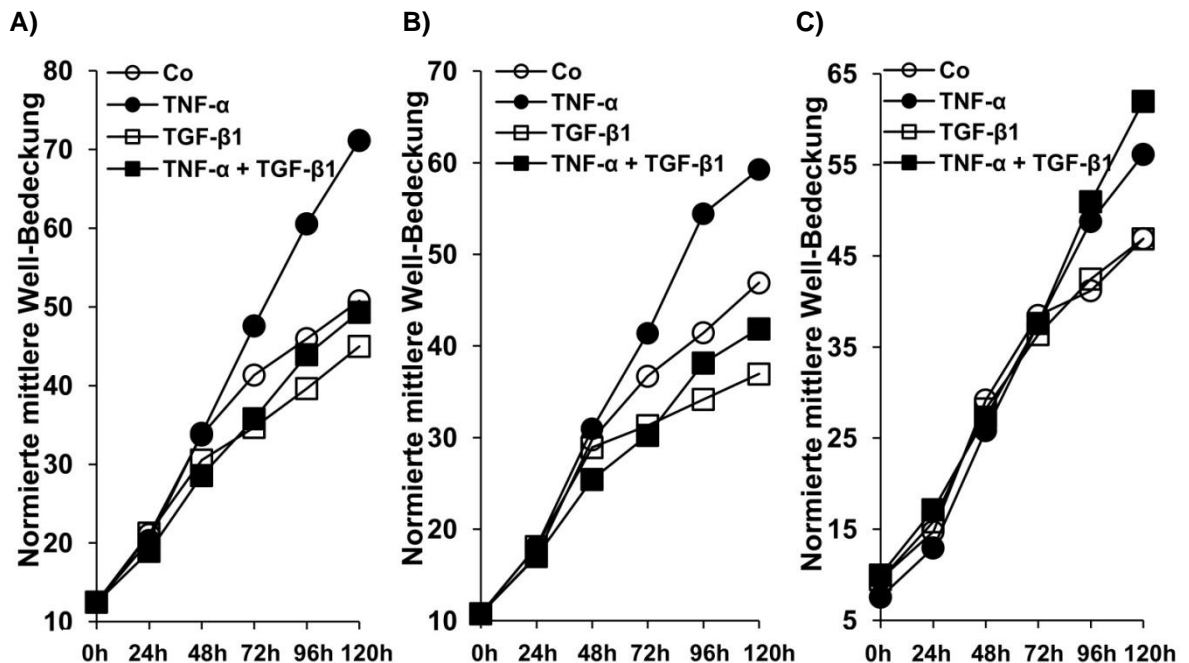
In zwei repräsentativen Versuchsreihen an der Kultur MSC 19 führte die separate Stimulation der MSCs mit IL-1 $\beta$  (Abb. 42) und TNF- $\alpha$  (Abb. 43) wieder zu einer deutlich verstärkten Zellproliferation. TGF- $\beta$ 1 inhibierte nicht nur in der hohen Konzentration von 10ng/ml (Abb. 42 A und 43 A) die Spontanproliferation der MSCs im Vergleich zur Kontrolle, sondern auch in der niedrigeren Konzentration von 1ng/ml (Abb. 42 B und 43 B). Erst bei einer Stimulationsdosis von 0,1ng/ml TGF- $\beta$ 1 (Abb. 42 C und 43 C) war dieser Effekt nicht mehr nachweisbar und die Zellen wuchsen analog zur Kontrolle. Beobachtet man den Interaktionseffekt nach Doppelstimulation mit TGF- $\beta$ 1 und IL-1 $\beta$  (Abb. 42) bzw. mit TNF- $\alpha$  (Abb. 43), ist eindeutig erkennbar, dass die proliferationsinhibierende Wirkung von TGF- $\beta$ 1 nicht nur nach Einsatz der hohen Dosis von 10ng/ml überwog, sondern auch nach Verwendung der niedrigeren Dosis von 1ng/ml (Abb. 42 A+B und 43 A+B). Erst als TGF- $\beta$ 1 so gering dosiert war (mit 0,1ng/ml in Abb. 42 C und 43 C), dass er nicht mehr die Spontanproliferation der MSCs zu unterdrücken vermochte, überwog der proliferationsfördernde Effekt von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ . Im Vergleich zur Kontrolle und im Vergleich zu den lediglich mit TGF- $\beta$ 1 stimulierten MSCs war eine deutlich verstärkte Proliferation der doppelstimulierten MSCs sichtbar, die der Proliferation der allein mit IL-1 $\beta$  bzw. TNF- $\alpha$  stimulierten MSCs entsprach. Wurde TGF- $\beta$ 1 folglich in einem wirksamen Bereich eingesetzt, in dem er die Spontanproliferation unstimulierter MSCs inhibierte, so überwog auch sein Effekt in einer Doppelstimulation mit IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  und hob deren wachstumsfördernde Wirkung auf.





**Abbildung 42:** Dosisabhängigkeit der MSC-Proliferation nach Einzel- und Kombinationsstimulation mit TGF-β1 in den Konzentrationen 10ng/ml (42 A), 1ng/ml (42 B) und 0,1ng/ml (42 C) und 100ng/ml IL-1β an der Kultur MSC 19.

Bestimmung der Zellproliferation mittels automatisierter, repetitiver, lichtmikroskopischer Messung im Cellscreen und Normierung der Messwerte auf die Well-Bedeckung der Kontrolle zum Startzeitpunkt  $t[0]$ .



**Abbildung 43:** Dosisabhängigkeit der MSC-Proliferation nach Einzel- und Kombinationsstimulation mit TGF-β1 in den Konzentrationen 10ng/ml (43 A), 1ng/ml (43 B) und 0,1ng/ml (43 C) und 300ng/ml TNF-α an der Kultur MSC 19.

Bestimmung der Zellproliferation mittels automatisierter, repetitiver, lichtmikroskopischer Messung im Cellscreen und Normierung der Messwerte auf die Well-Bedeckung der Kontrolle zum Startzeitpunkt  $t[0]$ .

#### 4.5.2. Effekt der Interaktion auf die Expression von $\alpha$ -SMA

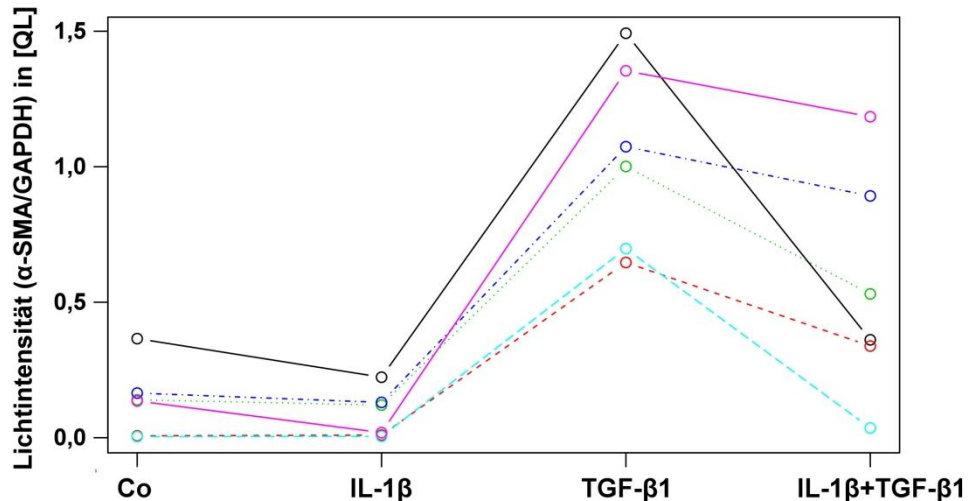
Eine Verminderung der basalen Expression des Myofibroblastenmarkers  $\alpha$ -SMA wurde bereits nach Stimulation der MSCs mit IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8 für jedes dieser vier Zytokine unter 4.2.2. nachgewiesen. TGF- $\beta$ 1 antagonisierte diese Wirkung der pro-inflammatorischen Zytokine und förderte über den Smad-Signalweg die  $\alpha$ -SMA Expression (s. 4.4.). Zur Charakterisierung des Effekts einer Kombinationsstimulation aus TGF- $\beta$ 1 und IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 oder IL-8 auf die  $\alpha$ -SMA Expression der MSCs wurde diese nach identischem Versuchsaufbau zu den vorangehenden Simultanstimulationen im Western Blot untersucht.

Die simultane Stimulation der MSCs mit der Kombination TGF- $\beta$ 1 und IL-1 $\beta$  führte in den Western Blot Analysen der exemplarisch dargestellten Kultur MSC 19, repräsentativ für ein Kind mit milder BPD, als auch in der Kultur MSC 22, repräsentativ für ein Kind mit schwerer BPD, zu einer Inhibition der rein durch TGF- $\beta$ 1 induzierten  $\alpha$ -SMA Expression (44 A). Dieses Ergebnis konnte in den parallel zu den Western Blot Analysen durchgeführten AIDA Quantifizierungen von insgesamt n = 11 identischen Stimulationen an MSC-Isolaten 6 verschiedener Frühgeborener reproduziert werden (44 B). Die Einzelstimulation mit TGF- $\beta$ 1 induzierte einen im Vergleich zur Kontrolle statistisch hochsignifikanten Anstieg der  $\alpha$ -SMA Expression (44 B). IL-1 $\beta$  führte, wie unter 4.2.2. vorbeschrieben, zu einer Verminderung der basalen  $\alpha$ -SMA Expression (44 B), die in den Western Blot Darstellungen (44 A) in dieser Belichtungszeit mit Schwerpunkt auf die Kombinationsstimulation nicht zu sehen war. Die Kombinationsstimulation mit IL-1 $\beta$  und TGF- $\beta$ 1 bewirkte nach Mittelwertbildung eine im Vergleich zur TGF- $\beta$ 1 Einzelstimulation um 47% reduzierte Expression von  $\alpha$ -SMA. Das pro-inflammatorische Zytokin inhibierte folglich die TGF- $\beta$ 1 induzierte  $\alpha$ -SMA Expression und führte zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Expression dieses Proteins (44 B). Dieser Effekt konnte unabhängig vom BPD Schweregrad kulturübergreifend an allen untersuchten MSC-Isolaten nachgewiesen werden.

A)



B)



**Abbildung 44:** Inhibition der TGF-β1 induzierten α-SMA Expression nach Kombinationsstimulation mit IL-1β und TGF-β1

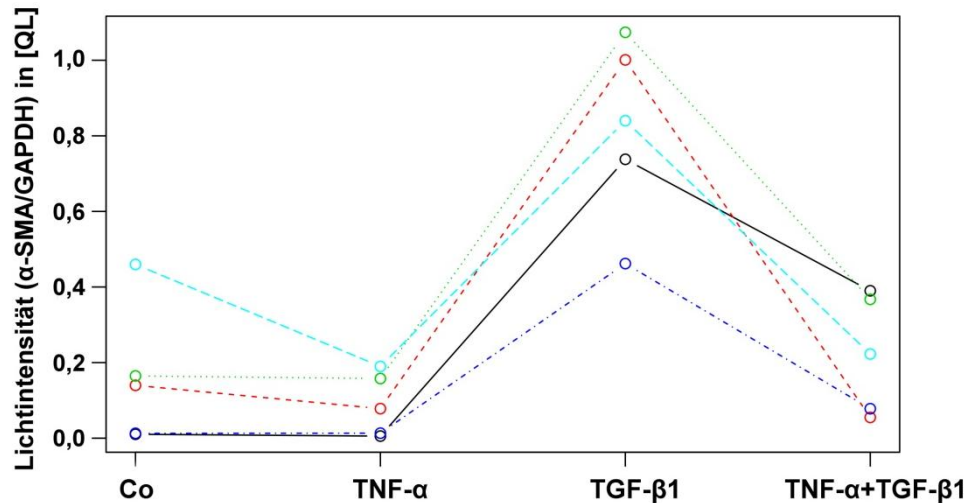
Durchführung der Western Blot Analysen 48h nach Stimulation mit 100ng/ml IL-1β, 10ng/ml TGF-β1 und der Kombination 100ng/ml IL-1β + 10ng/ml TGF-β1 mit exemplarischer Darstellung der Kulturen MSC 19 und MSC 22 (**44 A**). Anschließende Quantifizierung der detektierten Proteinsignale von insgesamt n = 11 identisch durchgeführten Western Blot Analysen mittels AIDA Image Analyzer Software, Standardisierung der α-SMA Signale auf die Ladekontrolle GAPDH und Berechnung der Mittelwerte von Einzelversuchen an identischen MSC-Kulturen. Anschließende kulturübergreifende Zusammenfassung der AIDA Quantifizierungen an den Kulturen MSC 19, 21, 22, 25, 55 und 59 durch erneute Mittelwertbildung und statistische Auswertung signifikanter Unterschiede in der α-SMA Expression mittels eines linearen, gemischten Modells. Abhängigkeiten innerhalb einer Zellkultur wurden durch einen entsprechenden Random Effekt (Schätzung mit R Package lme 4 [1]) berücksichtigt. Signifikanzniveau:  $p < 0,05$ . TGF-β1 Haupteffekt:  $p < 0,001$ ; Interaktion IL-1β/TGF-β1:  $p = 0,019$  (**44 B**).

Die Kombinationsstimulation mit TGF-β1 und TNF-α führte in den repräsentativ für insgesamt n = 10 Stimulationen dargestellten Western Blot Analysen der Kulturen MSC 19 und MSC 59 zu einer deutlichen Verminderung der TGF-β1 induzierten α-SMA Expression (45 A). Die AIDA Quantifizierung aller in diesem experimentellen Setting durchgeführten Stimulationen zeigt nach Einzelstimulation mit TNF-α seine unter 4.2.2. vorgeschriebene Wirkung mit einer Reduktion der basalen α-SMA Expression (45 B). Die nach alleiniger TGF-β1 Stimulation stark erhöhte Expression von α-SMA war gegenüber der Kontrolle mit einem  $p < 0,001$  statistisch hochsignifikant vermehrt. Die simultan zu TGF-β1 durchgeführte Stimulation mit TNF-α führte zu einer hochsignifikanten Interaktion der beiden Zytokine ( $p < 0,001$ ) mit einer Reduktion der α-SMA Expression im Vergleich zur TGF-β1 Einzelstimulation um 73% nach Mittelwertbildung (45 B). Die Interaktion von TNF-α mit dem TGF-β1 Signalweg inhibierte folglich kulturübergreifend dessen induzierte α-SMA Expression.

A)



B)



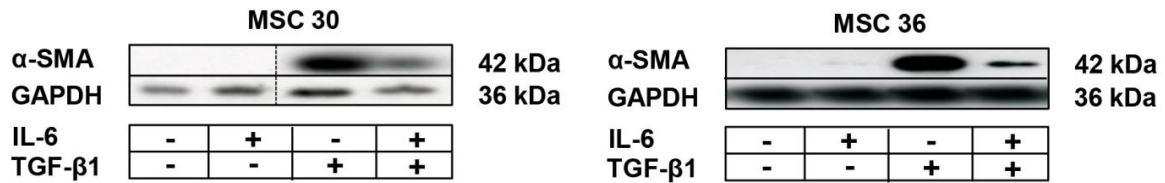
**Abbildung 45:** Inhibition der TGF- $\beta$ 1 induzierten  $\alpha$ -SMA Expression nach Kombinationsstimulation mit TNF- $\alpha$  und TGF- $\beta$ 1

Durchführung der Western Blot Analysen 48h nach Stimulation mit 300ng/ml TNF- $\alpha$ , 10ng/ml TGF- $\beta$ 1 und der Kombination 300ng/ml TNF- $\alpha$  + 10ng/ml TGF- $\beta$ 1 mit exemplarischer Darstellung der Kulturen MSC 19 und MSC 59. Für eine sinnvolle, den anderen Graphiken entsprechende Anordnung wurden Banden aus dem identischen Gel ausgeschnitten und in der abgebildeten Reihenfolge, ohne weitere Bearbeitung wieder aneinander gefügt (Markierung durch Trennlinien) **(45 A)**. Anschließende Quantifizierung der detektierten Proteinsignale von insgesamt n = 10 identisch durchgeführten Western Blot Analysen mittels AIDA Image Analyzer Software, Standardisierung der  $\alpha$ -SMA Signale auf die Ladekontrolle GAPDH und Berechnung der Mittelwerte von Einzelversuchen an identischen MSC-Kulturen. Anschließende kulturübergreifende Zusammenfassung der AIDA Quantifizierungen an den Kulturen MSC 19, 21, 22, 55 und 59 durch erneute Mittelwertbildung und statistische Auswertung signifikanter Unterschiede in der  $\alpha$ -SMA Expression mittels eines linearen, gemischten Modells. Abhängigkeiten innerhalb einer Zellkultur wurden durch einen entsprechenden Random Effekt (Schätzung mit R Package lme 4 [1]) berücksichtigt. Signifikanzniveau: p<0,05. TGF- $\beta$ 1 Haupteffekt: p<0,001; Interaktion TNF- $\alpha$ /TGF- $\beta$ 1: p<0,001 **(45 B)**.

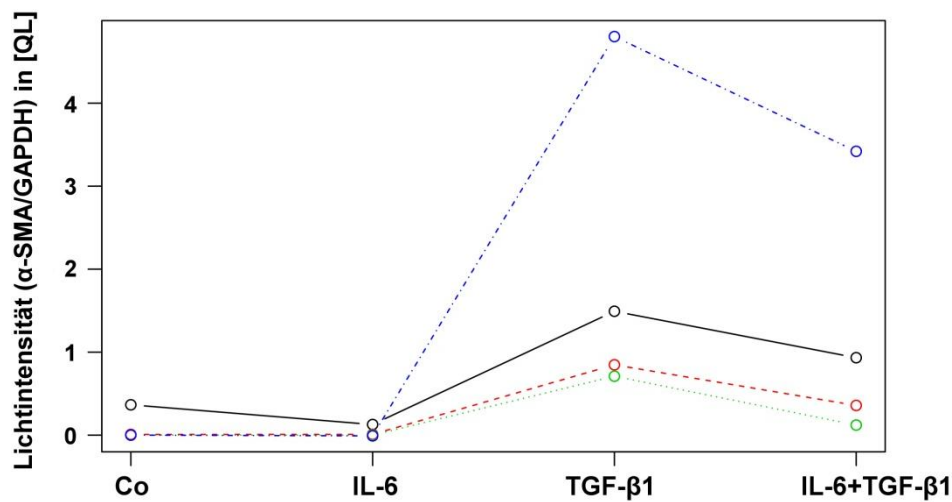
Analog zu den vorangegangenen Simultanstimulationen induzierte ebenfalls die Kombinationsstimulation der MSCs mit IL-6 und TGF- $\beta$ 1 eine deutliche Reduktion der TGF- $\beta$ 1 induzierten  $\alpha$ -SMA Expression in den exemplarisch dargestellten Kulturen MSC 30 und MSC 36 im Western Blot (46 A). In der AIDA Quantifizierung von insgesamt n = 5 identisch stimulierten Versuchsansätzen, die MSCs von Frühgeborenen mit allen drei BPD Schweregraden einschlossen (s. 4.1., Tab. 8), konnte kulturübergreifend und unabhängig vom BPD Schweregrad der jeweiligen Kinder die Reduktion sowohl der basalen  $\alpha$ -SMA Expression nach IL-6 Einzelstimulation als auch die Inhibition der TGF- $\beta$ 1

induzierten  $\alpha$ -SMA Expression reproduziert werden (46 B). Die Proteinexpression der MSCs nach Kombinationsstimulation war gegenüber der statistisch signifikant erhöhten  $\alpha$ -SMA Expression der TGF- $\beta$ 1 Einzelstimulation mit 38% deutlich reduziert. Die Interaktion war jedoch nicht statistisch signifikant.

A)



B)



**Abbildung 46:** Inhibition der TGF- $\beta$ 1 induzierten  $\alpha$ -SMA Expression nach Kombinationsstimulation mit IL-6 und TGF- $\beta$ 1

Durchführung der Western Blot Analysen 48h nach Stimulation mit 100ng/ml IL-6, 10ng/ml TGF- $\beta$ 1 und der Kombination 100ng/ml IL-6 + 10ng/ml TGF- $\beta$ 1 mit exemplarischer Darstellung der Kulturen MSC 30 und MSC 36. Für eine sinnvolle, den anderen Graphiken entsprechende Anordnung wurden bei MSC 30 Banden aus dem identischen Gel ausgeschnitten und in der abgebildeten Reihenfolge, ohne weitere Bearbeitung wieder aneinander gefügt (Markierung durch Trennlinie) (46 A). Anschließende Quantifizierung der detektierten Proteinsignale von insgesamt n = 5 identisch durchgeführten Western Blot Analysen mittels AIDA Image Analyzer Software, Standardisierung der  $\alpha$ -SMA Signale auf die Ladekontrolle GAPDH und Berechnung der Mittelwerte von Einzelversuchen an identischen MSC-Kulturen. Anschließende kulturübergreifende Zusammenfassung der AIDA Quantifizierungen an den Kulturen MSC 22, 25, 30 und 36 durch erneute Mittelwertbildung und statistische Auswertung signifikanter Unterschiede in der  $\alpha$ -SMA Expression mittels eines linearen, gemischten Modells. Abhängigkeiten innerhalb einer Zellkultur wurden durch einen entsprechenden Random Effekt (Schätzung mit R Package lme 4 [1]) berücksichtigt. Signifikanzniveau:  $p < 0,05$ . TGF- $\beta$ 1 Haupteffekt:  $p = 0,01$ ; Interaktion IL-6/TGF- $\beta$ 1: nicht signifikant (46 B).

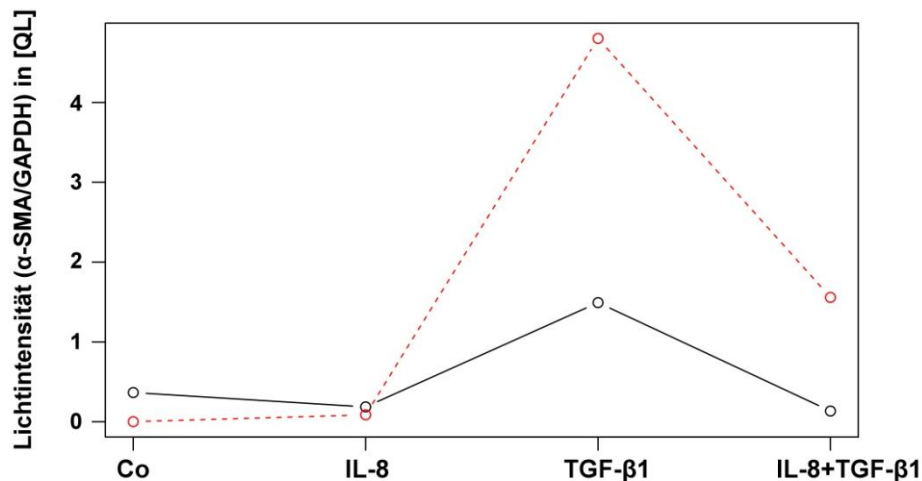
Entsprechend den Kombinationsstimulationen mit IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-6 führte die Doppelstimulation von IL-8 mit TGF- $\beta$ 1 in den Western Blot Analysen der Kulturen MSC 30 und MSC 25 zu einer Reduktion der durch TGF- $\beta$ 1 induzierten  $\alpha$ -SMA Expression (47

A). Die Summe der zu den beiden Western Blots zugehörigen AIDA Quantifizierungen (47 B) zeigte, neben einer Inhibierung der  $\alpha$ -SMA Expression nach IL-8 Einzelstimulation im Vergleich zur Kontrolle, eine Reduktion der durch TGF- $\beta$ 1 signifikant erhöhten  $\alpha$ -SMA Expression nach Simultanstimulation mit IL-8 und TGF- $\beta$ 1 um 73%. Aufgrund der niedrigen Stichprobenzahl und der vergleichsweise unterschiedlich starken Lichtintensität der im Western Blot detektierten Banden der beiden Versuchsansätze waren die Unterschiede in der  $\alpha$ -SMA Expression jedoch nicht gegeneinander statistisch signifikant.

A)



B)



**Abbildung 47:** Inhibition der TGF- $\beta$ 1 induzierten  $\alpha$ -SMA Expression nach Kombinationsstimulation mit IL-8 und TGF- $\beta$ 1

Durchführung der Western Blot Analysen 48h nach Stimulation mit 300ng/ml IL-8, 10ng/ml TGF- $\beta$ 1 und der Kombination 300ng/ml IL-8 + 10ng/ml TGF- $\beta$ 1 mit exemplarischer Darstellung der Kulturen MSC 30 und MSC 25. Für eine sinnvolle, den anderen Graphiken entsprechende Anordnung wurden Banden aus dem identischen Gel ausgeschnitten und in der abgebildeten Reihenfolge, ohne weitere Bearbeitung wieder aneinander gefügt (Markierung durch Trennlinien) (**47 A**). Anschließende Quantifizierung der detektierten Proteinsignale von insgesamt  $n = 2$  identisch durchgeführten Western Blot Analysen mittels AIDA Image Analyzer Software, Standardisierung der  $\alpha$ -SMA Signale auf die Ladekontrolle GAPDH und kulturübergreifende Zusammenfassung von MSC 25 und MSC 30 durch Mittelwertbildung. Die statistische Auswertung signifikanter Unterschiede in der  $\alpha$ -SMA Expression erfolgte mittels eines linearen, gemischten Modells. Abhängigkeiten innerhalb einer Zellkultur wurden durch einen entsprechenden Random Effekt (Schätzung mit R Package lme 4 [1]) berücksichtigt. Signifikanzniveau:  $p < 0,05$ . TGF- $\beta$ 1 Haupteffekt:  $p = 0,013$ ; Interaktion IL-8/TGF- $\beta$ 1: nicht signifikant (**47 B**).

Insgesamt führten die Kombinationsstimulationen der pro-inflammatorischen Zytokine mit TGF- $\beta$ 1 nach Einsatz jedes der vier Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8 zu einer

Inhibition der TGF- $\beta$ 1 induzierten  $\alpha$ -SMA Expression. Dies setzt eine Interaktion der Zytokine mit dem durch TGF- $\beta$ 1 aktivierten Smad-Signalweg auf molekularer Ebene voraus.

#### **4.5.3. Charakterisierung des Smad-Signalwegs nach Doppelstimulation der MSCs**

Aufgrund der unter 4.5.2. gezeigten inhibitorischen Wirkung auf die TGF- $\beta$ 1 induzierte  $\alpha$ -SMA Expression mussten IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8 an einer bestimmten Stelle mit dem Smad-Signalweg interferieren und dort die Weiterleitung des TGF- $\beta$ 1 Stimulus unterbinden. Mit Kenntnis des Smad-Signalwegs (s. 1.2.3.3. Abb. 9) ist dies u.a. intrazellulär auf Ebene der Rezeptorproteine Smad2 und Smad3 möglich, die für die Signalweiterleitung phosphoryliert werden müssen und sich daraufhin vom Rezeptor ablösen. Im Zytoplasma bilden p-Smad2 und p-Smad3 einen heteromeren Komplex mit Smad4, der in den Zellkern wandert und dort alleine oder in Kombination mit DNA-Bindeproteinen an bestimmte Promotorsequenzen des Zielproteins bindet und dessen Transkription reguliert (Bartram and Speer 2004).

Ziel folgender Studien war, zu untersuchen, ob die Rezeptorproteine Smad2 und Smad3 auch noch nach Simultanstimulation der MSCs mit TGF- $\beta$ 1 und einem der pro-inflammatorischen Zytokine zur Signalweiterleitung phosphoryliert und damit aktiviert werden und ob damit der erste Schritt des TGF- $\beta$ 1 Signalweges nach Doppelstimulation noch funktionsfähig ist. Dazu wurden MSCs aus dem Trachealsekret Frühgeborener in einem zu den bisherigen Simultanstimulationen identischen experimentellen Setting stimuliert und die Smad-Phosphorylierung sowie die  $\alpha$ -SMA Expression mittels Western Blot untersucht. Die Versuchsreihe wurde mit den in dieser Arbeit schwerpunktmäßig untersuchten Zytokinen IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  sowie zusätzlich mit IL-6 durchgeführt. Auf die Stimulation mit IL-8 wurde verzichtet.

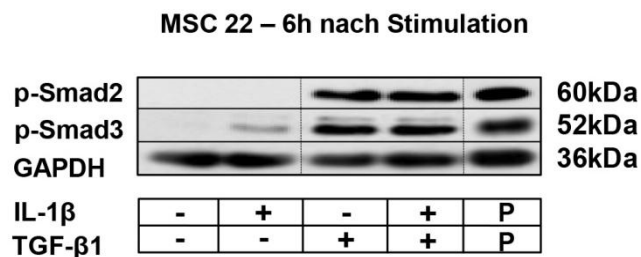
Die Stimulation der Kultur MSC 22 mit TGF- $\beta$ 1 führte nach Phosphorylierung von Smad2 und Smad3 (48 A) zu einer erhöhten  $\alpha$ -SMA Expression (48 B), die im Vergleich zur Kontrolle mit einem  $p < 0,001$  signifikant erhöht war. Die Doppelstimulation der MSCs mit IL-1 $\beta$  und TGF- $\beta$ 1 führte zu einer signifikanten Interaktion der beiden Zytokine, die in einer Reduktion der  $\alpha$ -SMA Expression im Vergleich zur TGF- $\beta$ 1 Einzelstimulation um 44% resultierte (48 B). Es hatte folglich eine Inhibition der TGF- $\beta$ 1 induzierten  $\alpha$ -SMA Expression durch IL-1 $\beta$  und damit eine Interaktion mit dem Smad-Signalweg stattgefunden.

Trotz offensichtlicher Interferenz von IL-1 $\beta$  in den TGF- $\beta$ 1 Signalweg zeigte sich im Western Blot nach Doppelstimulation der MSCs ein deutliches p-Smad2 und p-Smad3

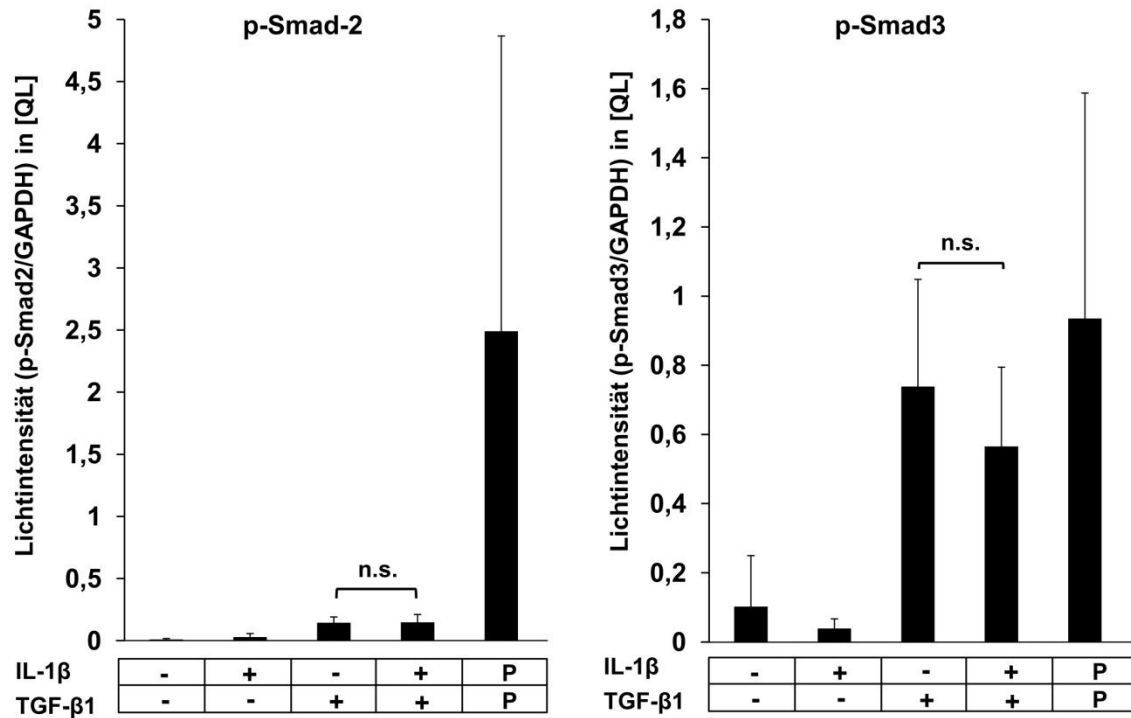
Signal, das genauso stark ausgeprägt war, wie das der allein mit TGF- $\beta$ 1 stimulierten MSCs (48 A). Dieses Ergebnis bestätigte ebenfalls die aus  $n = 4$  identischen Stimulationen errechnete Übersicht der AIDA Quantifizierungen: Der Unterschied der p-Smad2- und p-Smad3-Signale nach TGF- $\beta$ 1 Einzelstimulation gegenüber der TGF- $\beta$ 1/IL-1 $\beta$  Kombinationsstimulation war statistisch nicht signifikant (48 A). Der erste Schritt des TGF- $\beta$ 1 Signalwegs war folglich auch nach Zugabe von IL-1 $\beta$  intakt. Smad2 und Smad3 wurden weiterhin vom Rezeptor, einer Serin/Threonin-Kinase, phosphoryliert und dieser Prozess nicht durch die Zytokinpräsenz blockiert.

Im Western Blot (48 A) ist ebenfalls sichtbar, dass zur intrazellulären Signalweiterleitung auch Smad2 aktiviert wurde. In 4.4. wurde bereits die Beobachtung thematisiert, dass die Signalweiterleitung in den untersuchten MSC-Kulturen in 7 von 11 Versuchen rein durch p-Smad3 vermittelt wurde. Auch in den  $n = 4$  mit IL-1 $\beta$  und TGF- $\beta$ 1 stimulierten Versuchen überwog die vornehmliche Signalweiterleitung über p-Smad3. Der in 48 A abgebildete Western Blot wurde daher zur Demonstration genutzt, um zu zeigen, dass im Falle einer Smad2 Aktivierung auch diese Phosphorylierung nicht durch die pro-inflammatorischen Zytokine gehemmt wurde. Ein Beispiel eines Western Blots nur mit p-Smad3 Aktivierung zeigt Abbildung 50 (s. Seite 109-110).

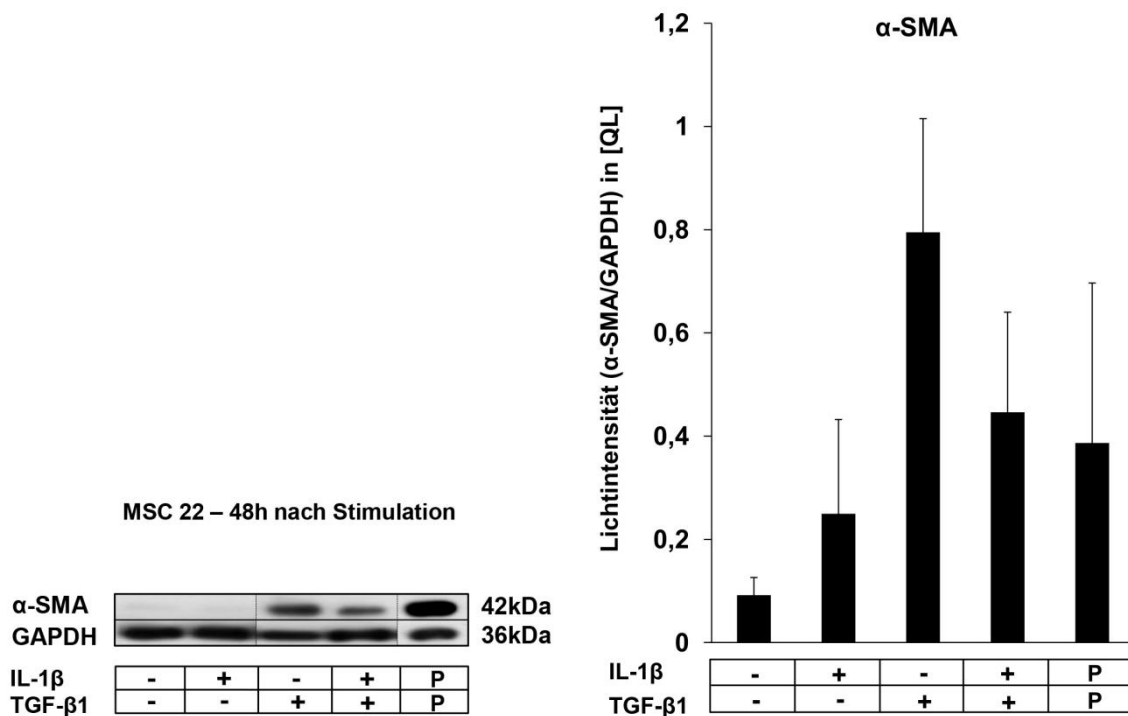
**A) IL-1 $\beta$ : p-Smad2 und p-Smad3**







**B) IL-1β: α-SMA**



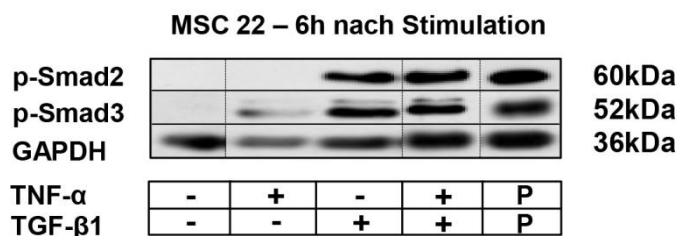
**Abbildung 48:** Kein Effekt der IL-1β/TGF-β1 Doppelstimulation auf die Smad-Phosphorylierung (48 A); Inhibition der TGF-β1 induzierten α-SMA Expression nach IL-1β/TGF-β1 Doppelstimulation (48 B)

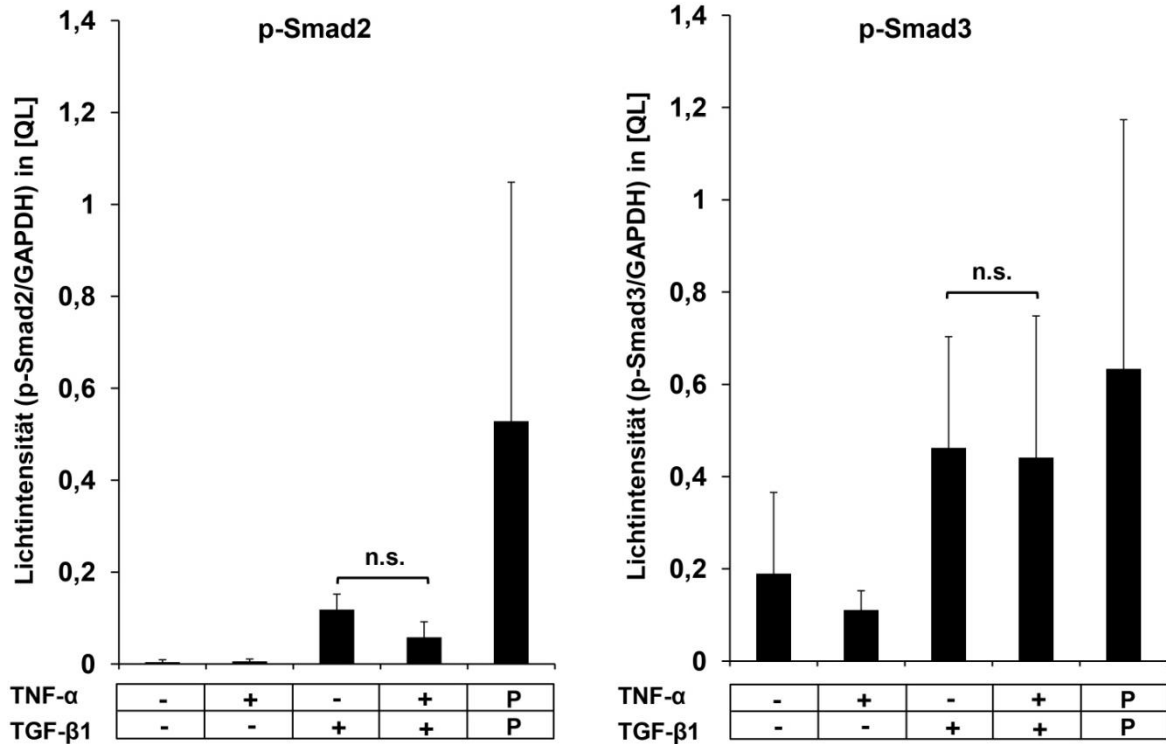
Durchführung der Western Blot Analysen 6h (Smad2, Smad3/48 A) und 48h (α-SMA/48 B) nach Stimulation mit 100ng/ml IL-1β, 10ng/ml TGF-β1 und der Kombination 100ng/ml IL-1β + 10ng/ml TGF-β1 mit exemplarischer Darstellung der Kultur MSC 22. Für eine sinnvolle Anordnung der

Western Blot Banden in den Abbildungen wurden diese innerhalb identischer Gele ausgeschnitten und in der abgebildeten Reihenfolge, ohne weitere Bearbeitung wieder aneinander gefügt (Markierung durch Trennlinien in 48 A + B). Als Positivkontrolle (P) für die Smad-Phosphorylierung wurden HeLa-Zellen (48 A), als Positivkontrolle für die  $\alpha$ -SMA Expression wurden zuvor mit TGF- $\beta$ 1 stimulierte und auf ihren  $\alpha$ -SMA Gehalt getestete Zellen der Kultur MSC 22 verwendet (48 B). Die anschließende Quantifizierung der detektierten Proteinsignale jeder Western Blot Analyse sowie die Standardisierung der Smad- bzw.  $\alpha$ -SMA Signale auf die Ladekontrolle GAPDH erfolgte mittels AIDA Image Analyzer Software. Die AIDA Quantifizierungen der n = 4 unter identischen Experimentalbedingungen durchgeführten Stimulationen der Kulturen MSC 19, 22 (2 Versuche) und 55 wurden nach Berechnung der Mittelwerte für MSC 22 zusammengefasst, die Standardfehler berechnet und die statistische Auswertung signifikanter Unterschiede mittels eines gemischten linearen Modells zum Niveau 5% durchgeführt. **48 A:** Haupteffekt des TGF- $\beta$ 1 bzgl. p-Smad2: p<0,001; Haupteffekt des TGF- $\beta$ 1 bzgl. p-Smad3: p = 0,005; andere Effekte sind nicht signifikant (n.s.). **48 B:** Haupteffekt des TGF- $\beta$ 1: p<0,001; Interaktion IL-1 $\beta$ /TGF- $\beta$ 1: p = 0,003.

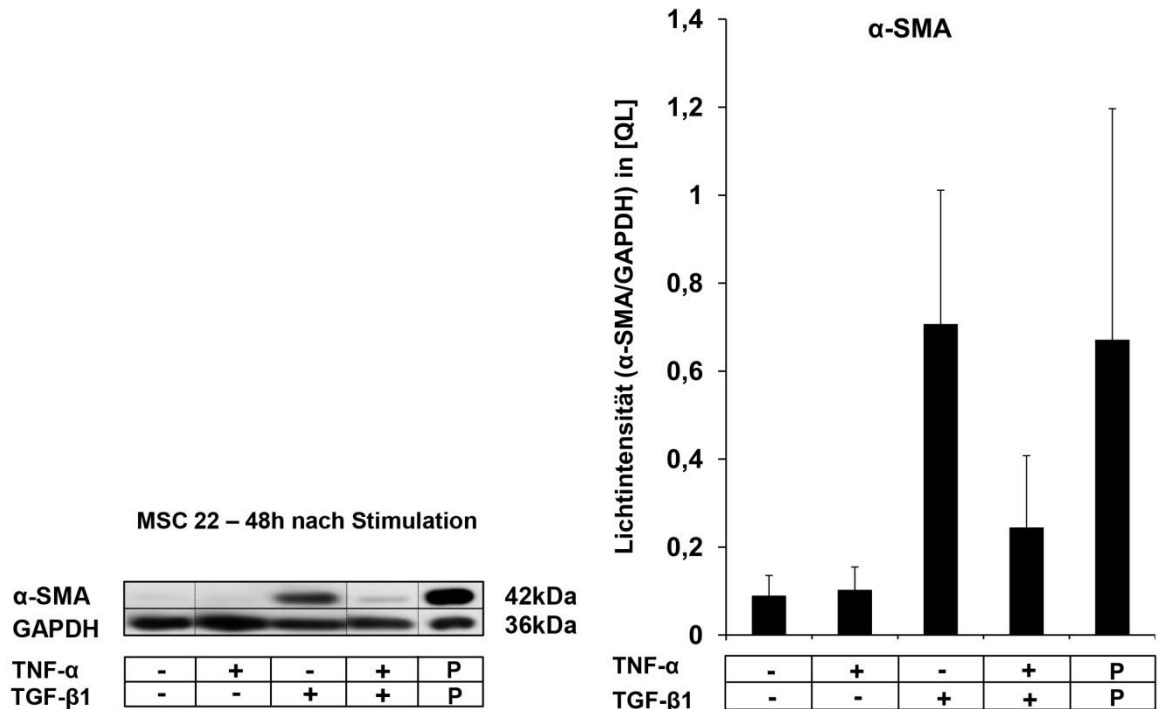
Auch nach Kombinationsstimulation mit TGF- $\beta$ 1 und TNF- $\alpha$  zeigte sich die Phosphorylierung von Smad2 und Smad3 unverändert und entsprach der Smad-Phosphorylierung nach TGF- $\beta$ 1 Einzelstimulation (49 A). Die zugehörigen AIDA Quantifizierungen aus n = 3 mit TNF- $\alpha$  und TGF- $\beta$ 1 stimulierten MSC-Kulturen wiesen keinen statistisch signifikanten Unterschied der Smad2/3-Phosphorylierung nach isolierter TGF- $\beta$ 1 Zugabe gegenüber der TGF- $\beta$ 1+TNF- $\alpha$  Stimulation auf und bestätigen damit das Ergebnis. Trotzdem war nach Doppelstimulation der MSCs die  $\alpha$ -SMA Expression im Vergleich zur TGF- $\beta$ 1 Einzelstimulation sowohl im Western Blot von MSC 22 als auch in der AIDA Übersicht aller mit dieser Zytokinkombination durchgeführten Versuche mit einer Expressionsreduktion von 65% vermindert (49 B). TNF- $\alpha$  griff folglich wie IL-1 $\beta$  inhibierend, jedoch unabhängig von Smad2/3 und auf einer der Smad-Phosphorylierung nachfolgenden molekularen Ebene in den TGF- $\beta$ 1 Signalweg ein.

**A) TNF- $\alpha$ : p-Smad2 und p-Smad3**





B) TNF-α: α-SMA



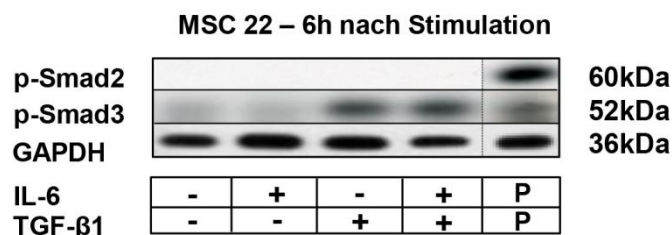
**Abbildung 49:** Kein Effekt der TNF-α/TGF-β1 Doppelstimulation auf die Smad-Phosphorylierung (49 A); Inhibition der TGF-β1 induzierten α-SMA Expression nach TNF-α/TGF-β1 Doppelstimulation (49 B)

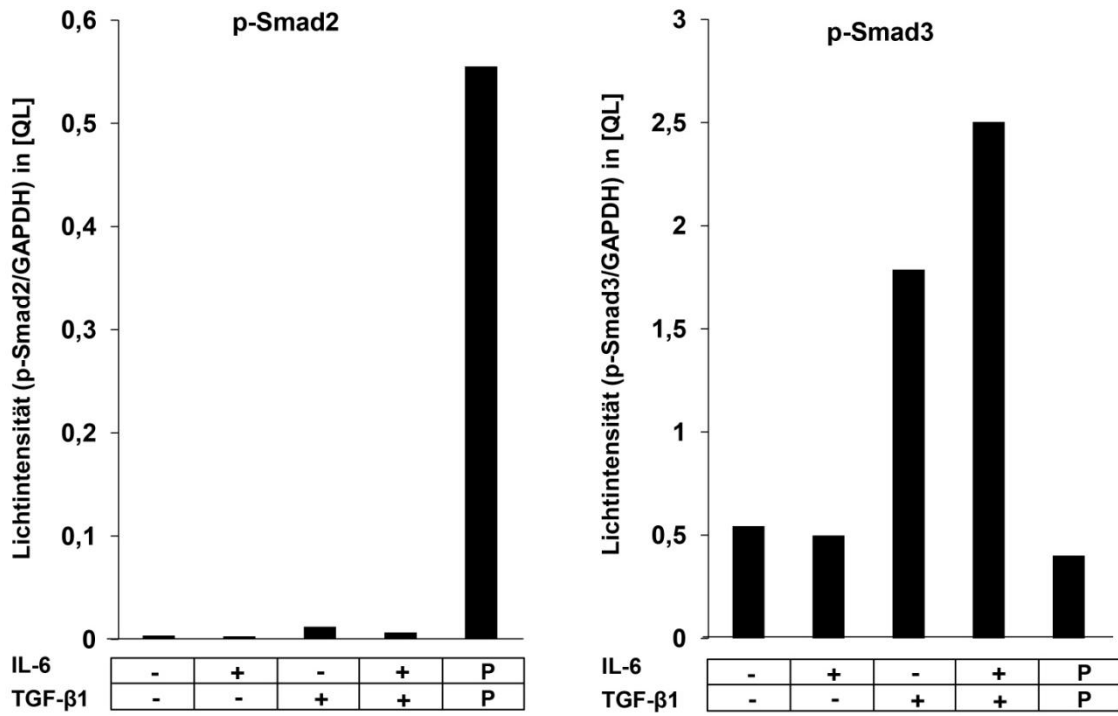
Durchführung der Western Blot Analysen 6h (Smad2, Smad3/49 A) und 48h (α-SMA/49 B) nach Stimulation mit 300ng/ml TNF-α, 10ng/ml TGF-β1 und der Kombination 300ng/ml TNF-α + 10ng/ml

TGF- $\beta$ 1 mit exemplarischer Darstellung der Kultur MSC 22. Für eine sinnvolle Anordnung der Western Blot Banden in den Abbildungen wurden diese innerhalb identischer Gele ausgeschnitten und in der abgebildeten Reihenfolge, ohne weitere Bearbeitung wieder aneinander gefügt (Markierung durch Trennlinien in 49 A + B). Als Positivkontrolle (P) für die Smad-Phosphorylierung wurden HeLa-Zellen (49 A), als Positivkontrolle für die  $\alpha$ -SMA Expression wurden zuvor mit TGF- $\beta$ 1 stimulierte und auf ihren  $\alpha$ -SMA Gehalt getestete Zellen der Kultur MSC 22 verwendet (49 B). Die anschließende Quantifizierung der detektierten Proteinsignale jeder Western Blot Analyse sowie die Standardisierung der Smad- bzw.  $\alpha$ -SMA Signale auf die Ladekontrolle GAPDH erfolgte mittels AIDA Image Analyzer Software. Die AIDA Quantifizierungen der n = 3 unter identischen Experimentalbedingungen durchgeführten Stimulationen der Kulturen MSC 19, 21 und 22 wurden durch Mittelwertbildung zusammengefasst, der Standardfehler berechnet und die statistische Auswertung signifikanter Unterschiede mittels eines gemischten linearen Modells zum Niveau 5% durchgeführt. **49 A:** Haupteffekt des TGF- $\beta$ 1 bzgl. p-Smad2:  $p < 0,001$ ; andere Effekte sind nicht signifikant (n.s.). **49 B:** Haupteffekt des TGF- $\beta$ 1:  $p < 0,001$ ; Interaktion TNF- $\alpha$ /TGF- $\beta$ 1:  $p = 0,057$  (borderline signifikant).

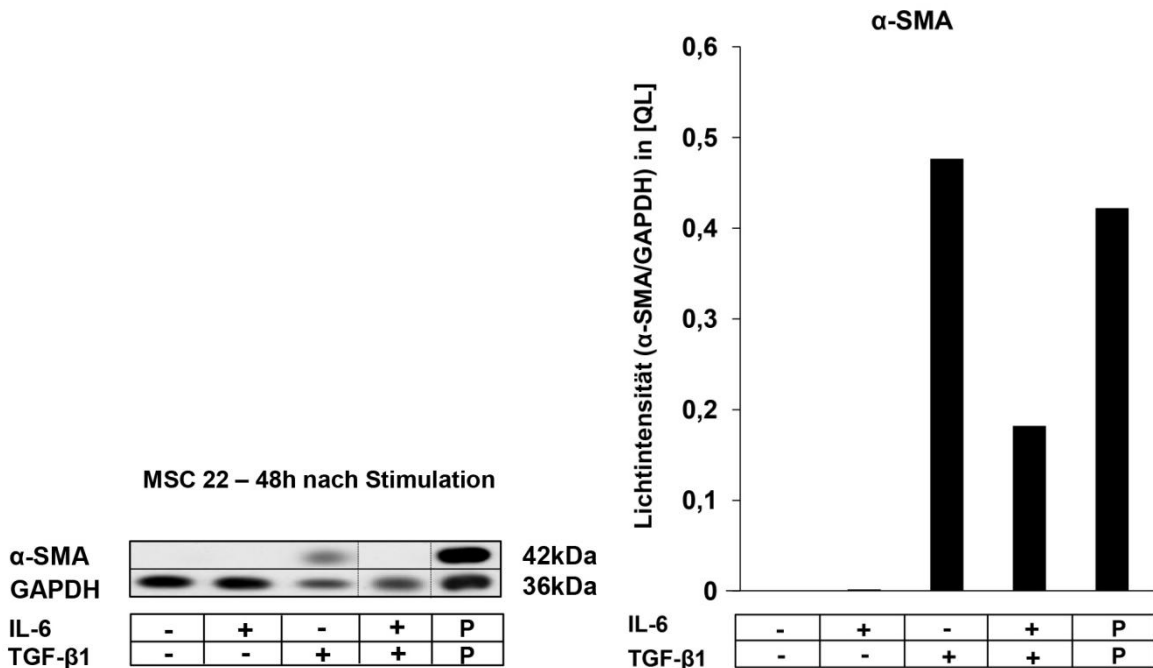
Analog zu den Doppelstimulationen IL-1 $\beta$ /TGF- $\beta$ 1 (Abb. 48) und TNF- $\alpha$ /TGF- $\beta$ 1 (Abb. 49) zeigte sich nach Simultanstimulation mit IL-6 und TGF- $\beta$ 1 das identische Ergebnis zu den vorangegangenen Untersuchungen (Abb. 50): Trotz Inhibition der TGF- $\beta$ 1 induzierten  $\alpha$ -SMA Expression durch die Kombinationsstimulation IL-6/TGF- $\beta$ 1 (50 B) blieb die Phosphorylierung von Smad3 unbeeinflusst (50 A). Smad2 wurde, repräsentativ für eine der 7 Stimulationen, bei denen das TGF- $\beta$ 1 Signal ausschließlich über p-Smad3 weitergeleitet wurde, auch nach TGF- $\beta$ 1 Einzelstimulation und deutlicher Induktion der  $\alpha$ -SMA Expression nicht phosphoryliert.

#### A) IL-6: p-Smad2 und p-Smad3





**B) IL-6: α-SMA**



**Abbildung 50:** Kein Effekt der IL-6/TGF-β1 Doppelstimulation auf die Smad-Phosphorylierung (50 A); Inhibition der TGF-β1 induzierten α-SMA Expression nach IL-6/TGF-β1 Doppelstimulation (50 B)

Durchführung der Western Blot Analysen 6h (Smad2, Smad3/50 A) und 48h (α-SMA/50 B) nach Stimulation mit 100ng/ml IL-6, 10ng/ml TGF-β1 und der Kombination 100ng/ml IL-6 + 10ng/ml TGF-β1 an der Kultur MSC 22. Für eine sinnvolle Anordnung der Western Blot Banden in den Abbildungen wurden diese innerhalb identischer Gele ausgeschnitten und in der abgebildeten Reihenfolge, ohne weitere Bearbeitung wieder aneinander gefügt (Markierung durch Trennlinien in 50 A + B). Als Positivkontrolle (P) für die Smad-Phosphorylierung wurden HeLa-Zellen (50 A), als

Positivkontrolle für die  $\alpha$ -SMA Expression wurden zuvor mit TGF- $\beta$ 1 stimulierte und auf ihren  $\alpha$ -SMA Gehalt getestete Zellen der Kultur MSC 22 verwendet (50 B). Die anschließende Quantifizierung der im Western Blot detektierten Proteinsignale sowie die Standardisierung der Smad- bzw.  $\alpha$ -SMA Signale auf die Ladekontrolle GAPDH erfolgte mittels AIDA Image Analyzer Software.

Insgesamt zeigen diese Versuchsreihen, dass die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-6 die TGF- $\beta$ 1 induzierte  $\alpha$ -SMA Expression inhibierten und folglich mit dem TGF- $\beta$ 1-Signalweg interagierten. Nach Kombinationsstimulation mit TGF- $\beta$ 1 und jedem der drei untersuchten Zytokine bestand jedoch die Phosphorylierung von Smad2 und Smad3 im Vergleich zur TGF- $\beta$ 1 Einzelstimulation unverändert fort, während die  $\alpha$ -SMA Expression im Vergleich zur TGF- $\beta$ 1 Einzelstimulation signifikant vermindert war. Die Interaktion der pro-inflammatorischen Zytokine mit dem TGF- $\beta$ 1-Signalweg ließ folglich den ersten Schritt des Signalwegs unbeeinträchtigt. Die Inhibition der  $\alpha$ -SMA Expression musste daher auf einer nachfolgenden Ebene stattgefunden haben.

## 5. Diskussion

Die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8 stellen zentrale Mediatoren der pulmonalen Inflammationsreaktion in der Pathogenese der BPD dar und sind typische Aktivatoren des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B (Niedermaier and Hilgendorff 2015). In der vorliegenden Arbeit wurden daher im Zellkulturmodell die Effekte dieser Zytokine auf die phänotypischen und molekularen Eigenschaften mesenchymaler Stromazellen (MSCs) aus dem Trachealsekret Frühgeborener untersucht. Besonderer Fokus wurde auf die in einer Vorarbeit der Arbeitsgruppe identifizierten spezifischen Veränderungen des Phänotyps von MSC-Isolaten von Kindern mit schwerer BPD gelegt: Ein hoher NF $\kappa$ B Aktivierungsstatus, eine geringe Expression des zytoskelettalen Proteins  $\alpha$ -SMA und eine schnelle Zellproliferation der MSCs waren mit einer schlechteren pulmonalen Prognose assoziiert (Reicherzer et al. 2016). Die Ergebnisse zeigen, dass die vier pro-inflammatorischen Zytokine neben der reproduzierbaren, starken Aktivierung von NF $\kappa$ B den intrazellulären  $\alpha$ -SMA Gehalt signifikant reduzierten und IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-6 ebenfalls das Zellwachstum der MSCs signifikant gegenüber den Kontrollzellen beschleunigten. Sie induzierten damit eben den Phänotyp, der mit einem schlechteren pulmonalen Outcome assoziiert war. Weiterführende Untersuchungen auf molekularer Ebene zeigten, dass dem Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B die zentrale Rolle in der Dysregulation des Phänotyps zukommt: Nach Knockdown des Transkriptionsfaktors war sowohl die Spontanproliferation als auch die Zytokin-induzierte Mehrproliferation signifikant gegenüber den Zellen ohne NF $\kappa$ B Knockdown reduziert. Des Weiteren konnte eine inverse Regulation der  $\alpha$ -SMA Expression in Zellen mit NF $\kappa$ B Knockdown gezeigt werden. Nach Knockdown des Transkriptionsfaktors kam es zu einer Hochregulation der  $\alpha$ -SMA Expression. Diese Ergebnisse weisen dem Nuclear Factor- $\kappa$ B eine zentrale Rolle als Mediator der Zytokineffekte auf molekularer Ebene zu.

Ein weiteres zentrales Zytokin in der BPD Pathogenese ist der Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), der einerseits eine wichtige Rolle in der physiologischen Lungenentwicklung, der Begrenzung der Inflammationsreaktion und in Reparaturmechanismen spielt, andererseits bei übermäßiger Aktivierung jedoch einen wichtigen profibrotischen Faktor mit negativem Einfluss auf die Lungenentwicklung darstellt (Speer 2003, Shahzad, Radajewski et al. 2016). Im Gegensatz zur Wirkung von IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8 konnte für TGF- $\beta$ 1 ein inhibierender Effekt auf die MSC-Proliferation nachgewiesen werden. Dieser Effekt zeigte sich auch in Kombinationsstimulationen mit den pro-inflammatorischen Zytokinen, solange die Wirkung von TGF- $\beta$ 1 überwog. Besonders hervorzuheben ist somit, dass der

proliferationsinhibierende Effekt Dosis-abhängig war und der Nettoeffekt davon abhing, ob die Wirkung der pro-inflammatorischen Zytokine oder die Wirkung des TGF- $\beta$ 1 überwog. Der Balance der beiden aktivierten Signalwege, der TGF- $\beta$ 1- und der NF $\kappa$ B-Signaltransduktion, scheint folglich für eine physiologische Entwicklung und ein regelrechtes Zellwachstum eine besondere Bedeutung zuzukommen. Dies konnte bereits in einer gerade publizierten Arbeit der Arbeitsgruppe in einem anderen Kontext gezeigt werden. TNF- $\alpha$ , als klassischem Aktivator des NF $\kappa$ B Signalweges, kam eine bedeutende Rolle in der Begrenzung einer übermäßigen, pathologischen TGF- $\beta$ 1 Signalwegsaktivierung zu und verhinderte damit, als eigentlich pro-inflammatorisches Zytokin, ein Überschießen der Entzündungsreaktion durch Eindämmen der TGF- $\beta$ 1 Aktivität (Ehrhardt, Pritzke et al. 2016). Auch in der vorgelegten Arbeit konnte eine Interaktion der Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8 mit dem TGF- $\beta$ 1 Signalweg nach simultaner Zytokinstimulation der MSCs auf molekularer Ebene gezeigt werden. Die durch TGF- $\beta$ 1 induzierte  $\alpha$ -SMA Expression wurde durch die gleichzeitige Stimulation mit IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 oder IL-8 inhibiert. Gleichzeitig war die Phosphorylierung der Rezeptor-Smads, Smad2 und Smad3, der erste Schritt des TGF- $\beta$ 1 Signalwegs, nach Einzel- und Kombinationsstimulation noch intakt. Die Interaktion der Zytokine mit dem TGF- $\beta$ 1 Signalweg muss daher auf einer nachfolgenden Ebene stattgefunden haben und lenkt, mit Kenntnis obiger molekularer Befunde, das Augenmerk wieder auf NF $\kappa$ B, der an der Transkription einer Vielzahl an Genen beteiligt ist (Alvira 2014). Tatsächlich zeigten neueste Daten der Arbeitsgruppe eine Korrelation der NF $\kappa$ B Aktivität mit der Expression des TGF- $\beta$ 1 Inhibitors Smad7 (Ehrhardt, Pritzke et al. 2016). Diese Daten stellen eine wichtige potentielle Schnittstelle der Verbindung beider Signalwege dar, die durch die Arbeitsgruppe erst nach Abschluss des experimentellen Teils der vorgelegten Arbeit identifiziert und daher hier nicht untersucht wurde.

Insgesamt verdeutlichen die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit, dass sowohl das Überwiegen des NF $\kappa$ B-Signalwegs durch übermäßige Stimulation durch IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8 als auch eine übermäßige TGF- $\beta$ 1 Aktivität eine Dysregulation des MSC-Phänotyps bewirken und damit der Balance beider Signalwege für eine physiologische Lungenentwicklung eine besondere Bedeutung zukommt.

### **5.1. Die zentrale Rolle des Nuclear Factor- $\kappa$ B bei Inflammationsprozessen**

Der Nuclear Factor- $\kappa$ B ist bereits als ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor bekannt, der als zentraler Mediator an verschiedensten biologischen Prozessen, wie der Zellproliferation und -apoptose, der Zelldifferenzierung, der angeborenen und erworbenen Immunantwort, aber vor allem an der Regulation inflammatorischer Prozesse beteiligt ist



(Alvira 2014). Zahlreiche Erkrankungen mit entzündlicher Komponente, wie septische Reaktionen, Autoimmunerkrankungen (rheumatoide Arthritis, Psoriasis, chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Typ-I-Diabetes u.v.m.), aber auch onkologische Erkrankungen wie bestimmte Lymphomarten, Leber- und Lungentumoren sind mit einer überschießenden, dysregulierten NFκB Aktivität assoziiert (Hoesel and Schmid 2013, Herrington, Carmody et al. 2015). Letztere liegt ebenfalls bei Erkrankungen mit pulmonaler Entzündungsreaktion vor und betrifft sowohl Erkrankungen des Erwachsenen, wie z.B. das adulte ARDS, Asthma bronchiale und COPD, als auch pädiatrische Lungenerkrankungen mit entzündlicher Komponente, wie schwere Virusinfektionen des Respirationstrakts, zystische Fibrose, deren zugrunde liegende Mutation eine konstitutive Aktivierung von NFκB bewirkt, und die chronische Lungenerkrankung BPD des Frühgeborenen (Alvira 2014, Schuliga 2015, Ehrhardt and Zimmer 2016).

Auf molekularer Ebene steht NFκB im Zentrum eines komplexen Netzwerks verschiedenster Signalwege, über die der Transkriptionsfaktor vielfältige, z.T. auch gegensätzliche Wirkungen entfalten kann. In der Pathogenese der BPD führt sowohl die überschießende Aktivierung des NFκB als auch eine gezielte Inhibition des Transkriptionsfaktors zu einer gestörten Alveolarisierung und Vaskularisierung der sich entwickelnden Lunge (Blackwell, Hipps et al. 2011, Iosef, Alastalo et al. 2012). Für eine Verschiebung des Gleichgewichts Richtung übermäßiger NFκB Aktivität sind unter anderem die pro-inflammatorischen Zytokine der pulmonalen Inflammationsreaktion der BPD verantwortlich. IL-1β und TNF-α sind zusammen mit LPS bakterieller Zellwände als klassische Aktivatoren des kanonischen, IκB Kinase Komplex abhängigen NFκB Signalwegs bekannt (Hoesel and Schmid 2013) (s. auch 1.2.3.2., Abb. 8). Die Aktivierung und nukleäre Akkumulation der transkriptionsaktivierenden p65 Einheit des NFκB durch IL-1β und TNF-α konnte im Ergebnisteil unter 4.2.1. als Voraussetzung weiterer Studien reproduziert und auch für IL-6 und IL-8 bestätigt werden. Umgekehrt werden IL-1β, TNF-α, IL-6 und IL-8 nach Aktivierung des kanonischen Signalwegs über die p65-Einheit des Nuclear Factor-κB, ebenso wie Adhäsionsmoleküle, Akute-Phase-Proteine und Wachstumsfaktoren, transkribiert, fördern somit ihre eigene Bildung und verstärken ein pro-entzündliches Umfeld (Blackwell and Christman 1997, Zhang and Sun 2015). In diesem Umfeld der pulmonalen Entzündungsreaktion spielt neben den zentralen inflammatorischen Faktoren besonders die Zellentität der MSCs eine Rolle. Sie sind in der physiologischen Lungenentwicklung maßgebend an der regelrechten Entwicklung des Lungengerüsts, u.a. durch Bildung der extrazellulären Matrix, Koordination der beteiligten Zellarten oder als Vorläuferzellen verschiedener mesenchymaler Zellentitäten, wie Myofibroblasten oder Lipofibroblasten, beteiligt (Mobius and Rudiger 2016).

Interessanterweise fiel in Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe ein veränderter Phänotyp in MSCs aus dem Trachealsekret Frühgeborener auf, die an einer schweren Form der BPD erkrankt waren: Die NFκB Aktivität dieser Zellen war erhöht und die Zellproliferation beschleunigt (Reicherzer et al. 2016). Um zu untersuchen, ob IL-1β, TNF-α, IL-6 und IL-8 als zentrale Zytokine der pulmonalen Inflammationsreaktion diese Dysregulation des Phänotyps auslösen können, wurden MSCs aus dem Trachealsekret verschiedener Frühgeborener im Zellkulturmodell mit diesen vier Zytokinen stimuliert. Die Proliferationsergebnisse wurden für jedes Zytokin mit zwei unterschiedlichen und voneinander unabhängigen Methoden der Proliferationsmessung, der Bestimmung der Flächenbedeckung durch repetitive, automatisierte Lichtmikroskopie und der elektronischen Impedanzmessung (s. 3.2.4. und 3.2.5.), verifiziert. IL-1β und TNF-α induzierten kulturübergreifend an allen getesteten MSC-Isolaten, unabhängig vom BPD Schweregrad der erkrankten Kinder, eine statistisch signifikante Mehrproliferation (s. 4.1.2.). Dieselben Ergebnisse konnten auch für IL-6 bestätigt werden. Für IL-8 wurden heterogene Ergebnisse erzielt. Ein Trend zu vermehrtem Zellwachstum konnte in einigen, jedoch nicht in allen Experimenten nachvollzogen werden. Dabei gilt zu beachten, dass zwei unterschiedliche Präparationen an rekombinantem IL-8 mit unterschiedlicher Aminosäuresequenz verwendet wurden. Eine Abhängigkeit der Zytokinwirkung von der Form des rekombinant hergestellten IL-8 wurde zunächst in Betracht gezogen, konnte jedoch nicht bestätigt werden. Weiterführende Experimente wurden diesbezüglich nicht durchgeführt, da für IL-1β und TNF-α eine reproduzierbar starke und zuverlässig signifikante proliferationsinduzierende Wirkung nachgewiesen werden konnte, die sogar noch etwas den Effekt von IL-6 übertraf und damit als geeignete Grundlage für weiterführende molekulare Untersuchungen angesehen wurde. In diesen molekularen Untersuchungen sollte der Nachweis der Kausalität einer NFκB Abhängigkeit der Zytokin-induzierten Mehrproliferation für IL-1β und TNF-α über RNA Interferenz gegen NFκBp65 geführt werden. NFκB war aus verschiedenen Gründen als zentraler Mediator der Zytokineffekte interessant: Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass NFκB nicht nur zentral an Inflammationsprozessen beteiligt ist und im Trachealsekret von Frühgeborenen erhöht ist, die später eine schwere Form der BPD entwickeln, sondern, dass er auch eine wichtige Rolle in der Zellproliferation spielt (Bourbia, Cruz et al. 2006, Rahman and Fazal 2011, Hayden and Ghosh 2012). Über vermehrte Expression von Zyklin D1 greift NFκB direkt in den Zellzyklus ein und bewirkt die Progression von der G1-Phase zur S-Phase. Zusätzlich führt NFκB zu einer Hochregulation anti-apoptotischer Gene wie Bcl-2 (Hoesel and Schmid 2013, Alvira 2014, Zhang and Sun 2015). Damit stehen auch die Ergebnisse dieser Arbeit im Einklang mit der Literatur und dem detektierten pro-proliferativen Effekt der Zytokine, die zeigen, dass weder IL-1β, TNF-α, IL-6 noch IL-8 Einfluss auf die

Apoptose der MSCs nahmen. Die Stimulation mit keinem der vier Zytokine führte zu einer signifikanten Änderung der Apoptoserate. Darüber hinaus konnte in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe unter Nicht-Stimulationsbedingungen eine positive Korrelation nicht nur zwischen dem Proliferationsindex der MSCs und dem Schweregrad der BPD, sondern auch zwischen dem Proliferationsindex und dem NFκB Aktivierungsstatus der Zellen ermittelt werden (Reicherzer et al. 2016). Nach Knockdown des Transkriptionsfaktors durch RNA Interferenz zeigte sich in der vorgelegten Arbeit zunächst an unstimulierten MSC-Kulturen sowohl von Kindern mit einer milden als auch mit einer schweren Form der BPD eine statistisch signifikant verminderte Spontanproliferation. Das spontane Zellwachstum der MSCs war folglich, in Übereinstimmung mit der Literatur und den Vorbeobachtungen einer schnellen Zellproliferation bei MSCs mit hohem NFκB Aktivierungsstatus, auf molekularer Ebene direkt von der Funktionstüchtigkeit des Transkriptionsfaktors abhängig. Nach Transfektion der MSCs mit einer niedrigeren siNFκBp65 Konzentration, sodass die Spontanproliferation nicht verändert wurde, konnte in einem einzigartigen experimentellen Setting die Zytokin-induzierte Mehrproliferation auf NFκB Abhängigkeit überprüft werden. Es zeigte sich eine signifikant reduzierte Mehrproliferation der mit siNFκBp65 transfizierten und nachfolgend Zytokin-stimulierten MSCs, die sich dem Wachstum der Kontrolle annäherte (s. 4.3.1. und 4.3.2.). In dieser Arbeit konnte folglich gezeigt werden, dass die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1β und TNF-α, die aufgrund ihrer starken proliferationsfördernden Wirkung zu den molekularen Untersuchungen herangezogen worden waren, das Zellwachstum NFκB vermittelt beschleunigen.

Ein weiterer bedeutender Biomarker im Rahmen der zellulären Proteinexpression ist das zytoskelettale Strukturprotein α-Smooth Muscle Actin, das auch als phänotypischer Marker für den Differenzierungsgrad von MSCs und Fibroblasten dient (Wang, Zohar et al. 2006). Die Relevanz α-SMA positiver Zellen unterstreichen Arbeiten, die einen kompletten Arrest der Alveolarisierung bei akutem Mangel an Myofibroblasten im PDGF-Knockout-Modell oder bei fehlender Differenzierung von MSCs zu Myofibroblasten zeigen (Bostrom, Willetts et al. 1996, Popova, Bentley et al. 2014). Die separate Stimulation von MSCs aus dem Trachealsekret Frühgeborener mit IL-1β, TNF-α, IL-6 und IL-8 ergab bei jedem der vier Zytokine eine Herunterregulation der basalen α-SMA Expression (s. 4.2.2.). In Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnte eine inverse Korrelation der basalen Expression von α-SMA mit dem Schweregrad der BPD festgestellt werden. Demzufolge haben Frühgeborene mit hoher basaler α-SMA Expression der MSCs ein geringeres Risiko an einem schweren Grad der BPD zu erkranken als Frühgeborene mit niedriger basaler α-SMA Expression (Reicherzer et al. 2016). Mit Kenntnis der Literatur,

die  $\alpha$ -SMA-positiven Zellen eine wichtige Rolle sowohl in der Lungenentwicklung als auch bei pulmonalen Reparaturprozessen zuschreibt, ist eine negative Veränderung dieses Biomarkers durch die Zytokine, als wichtige Mediatoren in der BPD Entstehung, daher gut mit bisherigen Veröffentlichungen vereinbar (Leslie, Mitchell et al. 1990, Bostrom, Willetts et al. 1996, Pechkovsky, Hackett et al. 2010, Zhou, Wu et al. 2011).

Im Zytokinnetzwerk der pulmonalen Inflammationsreaktion ist auch der Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 beteiligt. Dieser wird im Rahmen von Reparaturmechanismen vermehrt exprimiert und begrenzt durch Synthesereduktion der pro-inflammatorischen Zytokine den Entzündungsprozess (Bose, Dammann et al. 2008, Speer 2009). Die Induktion der  $\alpha$ -SMA Expression durch die Aktivierung des Smad-Signalwegs durch TGF- $\beta$ 1 ist bereits bekannt und konnte unter 4.4. reproduziert werden (Hu, Wu et al. 2003). Hierbei fiel die vornehmliche Signalweiterleitung durch p-Smad3 auf. Diese Besonderheit bestätigen Veröffentlichungen, in denen zwar die Überexpression von Smad3, jedoch nicht von Smad2 zur Expression von  $\alpha$ -SMA führte und nur für Smad3 und den Co-Faktor Smad4 Bindestellen für die DNA beschrieben wurden (Hu, Wu et al. 2003, Zhou, Wu et al. 2011). Neben einer vermehrten  $\alpha$ -SMA Expression führte die Stimulation der MSCs mit TGF- $\beta$ 1 zu einer signifikant verminderten Zellproliferation gegenüber der unstimulierten Kontrolle (s. 4.1.2.). TGF- $\beta$ 1 induzierte folglich einen den anderen untersuchten Zytokinen entgegengesetzten Phänotyp mit hohem intrazellulären Gehalt an  $\alpha$ -SMA und niedrigem Proliferationsindex entsprechend dem Phänotyp, der in basalen Voruntersuchungen an unstimulierten MSCs mit einer besseren pulmonalen Prognose assoziiert war. Die Inhibition der Zellproliferation bis hin zum Wachstumsarrest durch TGF- $\beta$ 1 ist jedoch trotzdem als schädlich für eine sich entwickelnde und wachsende Lunge zu werten. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese führte die überschießende Expression von TGF- $\beta$ 1 im Tiermodell zu einem schweren, der BPD ähnelnden Krankheitsbild mit gestörter Lungenstruktur, inhibierter Alveolarisierung, interstitieller Fibrose und massiver Ablagerung von extrazellulären Matrix Proteinen wie Fibronectin und Kollagen (Sime, Xing et al. 1997, Gauldie, Galt et al. 2003). Die Unterbrechung des TGF- $\beta$ 1 induzierten Signalwegs in Smad3 Knockout Mäusen führte ebenfalls aufgrund der bedeutenden Rolle des Transforming Growth Factors- $\beta$ 1 in der physiologischen Lungenentwicklung zu einer inhibierten Alveolarisierung und Entstehung eines zentrilobulären Emphysems (Chen, Sun et al. 2005). Eine ausgewogene TGF- $\beta$ 1 Signalgebung ist folglich für eine normale Lungenentwicklung ebenso essentiell wie eine ausgewogene NF $\kappa$ B Signalgebung, deren übermäßige oder mangelnde Aktivierung, wie zuvor beschrieben, ebenfalls verheerende Folgen auf die Lungenentwicklung hat (Morty, Königshoff et al. 2009, Blackwell, Hipps et al. 2011, Iosef, Alastalo et al. 2012). Neueste Daten der Arbeitsgruppe zeigen, dass nicht nur der Balance jedes Signalwegs für sich, sondern, durch eine Interaktion des TGF- $\beta$ 1

Signalwegs und des NF $\kappa$ B Signalwegs, v.a. auch der Balance beider Signalwege untereinander eine große Rolle zukommt (Ehrhardt, Pritzke et al. 2016). Dies konnte in detaillierten in vitro Experimenten mit Simultanstimulation durch TGF- $\beta$ 1 und jeweils IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 oder IL-8 bestätigt werden (s. 4.5.):

Die kombinierte Stimulation der MSCs mit den proliferationsinduzierenden, NF $\kappa$ B aktivierenden Zytokinen und parallel dazu mit TGF- $\beta$ 1 in unterschiedlichen Konzentrationen führte zu einer Dosis-abhängigen Inhibition der induzierten Mehrproliferation durch IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ . TGF- $\beta$ 1 in hoher Konzentration hob die proliferationsbeschleunigende Wirkung des jeweiligen Zytokins vollständig auf und senkte das Zellwachstum sogar unter das der Kontrolle. In niedriger Dosierung überwog der wachstumsfördernde Effekt von IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$ . Der Nettoeffekt hing folglich Dosis-abhängig davon ab, ob die Wirkung der pro-inflammatorischen Zytokine oder des TGF- $\beta$ 1 überwog (s. 4.5.1.).

Bezüglich der Regulation der intrazellulären Proteinexpression führte die Kombinationsstimulation von IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 oder IL-8 mit TGF- $\beta$ 1 zu einer signifikanten Inhibition der TGF- $\beta$ 1 induzierten  $\alpha$ -SMA Expression (s. 4.5.2.). Nach Knockdown des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B zeigte sich eine inverse Regulation von  $\alpha$ -SMA mit Hochregulation dieses zytoskelettalen Proteins (s. 4.3.1.). Da aufgrund der zytokinbedingten Inhibition der TGF- $\beta$ 1 induzierten  $\alpha$ -SMA Expression eine Interaktion zwischen IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 und dem von TGF- $\beta$ 1 aktivierten Smad-Signalweg stattgefunden haben muss und v.a. die zuvor beschriebene Phosphorylierung der Rezeptorsmads Smad2 und Smad3 unverändert nachgewiesen werden konnte (s. 4.5.3.), liegt die Annahme einer Interaktion über NF $\kappa$ B nahe. Der Nachweis der Interaktion konnte jedoch nicht mehr im Rahmen der Promotion geklärt werden. Erst kürzlich, nach Abschluss des experimentellen Teils dieser Arbeit, veröffentlichte die Arbeitsgruppe Daten, die in einem anderen Kontext das inhibitorische Smad7 als zentrale Schnittstelle der beiden Signalwege aufzeigen. Eine verminderte Aktivität des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B war mit einer verminderten Smad7 Expression kombiniert (Ehrhardt, Pritzke et al. 2016). Es wäre folglich interessant zu klären, ob auch im hiesigen Kontext Smad7 eine entscheidende regulierende Wirkung bei der Interaktion der beiden Signalwege zukommt.

Zentrales Ergebnis der vorgelegten Arbeit ist, dass die Hauptzytokine der pulmonalen Inflammationsreaktion, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 und TGF- $\beta$ 1, unter in vitro Bedingungen eine schwere Dysregulation des Phänotyps von MSCs aus dem Trachealsekret Frühgeborener auslösen. Dies steht im Einklang mit der Literatur, die eine gestörte MSC Funktion als Grundlage für eine pathologische Lungenentwicklung und -reifung postuliert (Mobius and Rudiger 2016). IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8 induzierten in einem pro-

inflammatorischen in vitro Setting, das die pathologische Situation der BPD Entstehung nachempfand, einen schnellproliferativen Phänotyp mit hohem Aktivierungsgrad an NF $\kappa$ B und geringer  $\alpha$ -SMA Expression entsprechend dem charakteristischen Profil, das in Voruntersuchungen mit einer schlechteren Prognose der BPD assoziiert war. Die durch übermäßige TGF- $\beta$ 1 Stimulation ausgelöste Inhibition der Zellproliferation ist im Rahmen der Lungenentwicklung mit Notwendigkeit zur weiteren Alveolarisierung durch Zellwachstum ebenfalls negativ zu sehen. Nach Simultanstimulation von TGF- $\beta$ 1 mit den pro-inflammatorischen Zytokinen hing die Art der Dysregulation des Phänotyps davon ab, ob die Wirkung der Zytokine oder des TGF- $\beta$ 1 überwog. Insgesamt zeigen die Daten, dass eine ausgewogene Signalgebung des NF $\kappa$ B Signalwegs, der als zentraler Mediator in der Vermittlung der Zytokin-Effekte anhand der Untersuchung von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  identifiziert werden konnte, und des TGF- $\beta$ 1 Signalwegs notwendig ist. Zusätzlich kommt auch der Balance der Interaktion beider Signalwege eine große Bedeutung zu: Sowohl das Überwiegen des Zytokin-induzierten NF $\kappa$ B Signalwegs als auch das Überwiegen des TGF- $\beta$ 1 Signalwegs führte in den Interaktionsstudien zu einer schweren Dysregulation des MSC-Phänotyps.

## 5.2. Vor- und Nachteile des Zellkulturmodells

In dieser Arbeit wurde die Wirkung der zentralen Zytokine der BPD Pathogenese IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 und TGF- $\beta$ 1 auf MSCs im Zellkulturmodell in früher Passage untersucht. Hierzu wurden die MSCs direkt aus dem Trachealsekret Frühgeborener isoliert und kultiviert (für Details s. 3.2.2.1.): Bei der ersten Aufnahme des Trachealsekrets in Kulturmedium waren noch weitere Bestandteile des Trachealsekrets wie Makrophagen, Epithelzellen und Entzündungsfaktoren enthalten. Vorteil war, dass die MSCs so auch in Zellkultur in ihrem pathophysiologischen Milieu heranwachsen. Im Verlauf konnten jedoch die MSCs, die als adhärenente Zellen am Boden haften blieben und im Lichtmikroskop durch ihre charakteristische Spindelform leicht zu erkennen waren, zuverlässig durch einmalige Passagierung aufgereinigt werden. Die anderen Bestandteile des Trachealsekrets und die weiteren darin enthaltenen Zellen, die außer den MSCs nicht adhärenent waren, wurden durch Mediumwechsel auf den Kulturplatten mit dem Überstand entfernt. Somit konnten die Versuche letztendlich an MSC-Kulturen mit hohem Reinheitsgrad durchgeführt werden. Dieser wurde in durchflusszytometrischen Studien der Arbeitsgruppe auf über 97% festgelegt.

Das verwendete System bot folglich die einzigartige Möglichkeit, an reinen MSC-Kulturen verschiedener Frühgeborener singuläre Effekte von Zytokin-Einzelstimulationen isoliert auf die MSCs zu untersuchen. So konnte die Wirkung jedes Zytokins einzeln oder auch

gezielt in Kombination mit TGF- $\beta$ 1 analysiert werden und die phänotypischen und molekularen Veränderungen der MSCs nach Stimulation eindeutig auf das jeweilige Zytokin zurückgeführt werden. Aufgrund dessen eignete sich dieses Modell besonders gut zur gezielten Charakterisierung einzelner Zytokine und zur Bestimmung selektiver Kombinationseffekte von zwei oder ggf. mehreren Zytokinen.

Nachteil dieses Modells war die notwendige Passagierung der MSCs über einen längeren Zeitraum. In Voruntersuchungen konnte zwischen Passage 3 bis 7 ein stabiler Phänotyp nachgewiesen werden (s. 3.2.2.2.). Erst in höheren Passagen verlangsamte sich die Spontanproliferation, weshalb diese Zellkulturen von Experimenten ausgeschlossen wurden. Des Weiteren weist jedes Zellkulturmodell Einschränkungen gegenüber in vivo Versuchen am Tiermodell auf. Die Komplexität der Wirkung der vielfältigen Einflussfaktoren auf die BPD-Entstehung kann in diesem System nicht nachgebildet werden. Ebenfalls ist der Beobachtungszeitraum auf wenige Tage limitiert.

Zur isolierten Voruntersuchung der genauen Zytokinwirkungen und zum Schaffen einer soliden Grundlage für ein weiterführendes Tiermodell mit eindeutiger Vorbeschreibung klarer und mit Sicherheit auf die pro-inflammatorischen Zytokine zurückzuführender Effekte ist jedoch das Zellkulturmodell besonders gut geeignet.

### **5.3. Ausblick und weiterführende Experimente**

Durch Imitation der in vivo Situation durch Exposition von MSCs aus dem Trachealsekret Frühgeborener mit pro-inflammatorischen Stimuli im Zellkulturmodell konnten neue Erkenntnisse über die Veränderung der zellulären Charaktereigenschaften durch IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 und TGF- $\beta$ 1 gewonnen werden. Als molekularer Mediator der Zytokineffekte wurde, anhand der Untersuchungen von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B identifiziert, der den Phänotyp der MSCs induzierte, der in Voruntersuchungen mit einem schwereren BPD Grad assoziiert war (s. 1.2.4.). Dies macht den Transkriptionsfaktor als Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen interessant.

In einem auf dieser Arbeit, analog zum Zellkulturmodell, aufbauenden Tiermodell könnte beispielsweise durch Hyperoxie-Exposition von Mäusen eine den Frühgeborenen vergleichbare, pro-inflammatorische, pulmonale Entzündungsreaktion hervorgerufen werden. Es wäre interessant, ob dadurch in vivo der identische, schnellproliferative Phänotyp isolierter MSCs mit hohem NF $\kappa$ B Aktivierungsstatus und niedriger  $\alpha$ -SMA Expression, entsprechend dem Phänotyp nach Zytokinstimulation in vitro, reproduziert werden kann. In einem nachfolgenden Schritt könnte dann beispielsweise durch tracheale Applikation von siNF $\kappa$ Bp65 oder die intraperitoneale Gabe eines "small compounds" mit NF $\kappa$ B hemmender Wirkung der Phänotyp auf Reversibilität überprüft und der molekulare

Zusammenhang auch in vivo bestätigt werden. Weiterführend könnte durch eine therapeutische Inhibierung von NFκB tierexperimentell getestet werden, ob hier Möglichkeiten bestehen, den BPD Schweregrad zu mildern und ob bestimmte Patientengruppen z.B. mit hoher Sauerstoffexposition von einer derartigen Therapie profitieren könnten.

Für diesen Ansatz spricht die Erkenntnis, dass nach übermäßiger NFκB Aktivierung in Mäusen die Lungenentwicklung entsprechend dem histologischen Bild der BPD gestört ist und NFκB eine starke Inflammations-induzierende Wirkung hat (Blackwell, Hipps et al. 2011). Gegen die vollständige Blockade von NFκB sprechen eine dadurch induzierte schwere Schädigung der Lungenentwicklung mit gestörter Alveolarisierung und Vaskularisierung, die damit eine wesentliche Beteiligung von NFκB an der physiologischen Lungenentwicklung aufzeigt (Iosef, Alastalo et al. 2012), sowie Mausmodelle, in denen der Knockout der p65-Einheit sogar letale Folgen hat und das Fehlen der p50-Einheit zu einem schweren Immundefekt mit Infektanfälligkeit führt (Barnes and Karin 1997). Neueste Daten postulieren für NFκB sogar anti-inflammatorische und lungenprotektive Eigenschaften und schreiben ihm nicht nur eine große Rolle in der Induktion, sondern auch in der Beendigung der Inflammationsreaktion zu (Alvira, Abate et al. 2007, Alvira 2014). Von einer umfassenden Blockade eines so komplexen Transkriptionsfaktors, der nicht nur an der unerwünschten, überschießenden Inflammationsreaktion der BPD beteiligt, sondern auch für die normale Zellfunktion, Homöostase und vieles mehr verantwortlich ist, ist damit wohl abzusehen (Herrington, Carmody et al. 2015). Umso wichtiger ist aufgrund der komplexen Signalgebung daher, in Nachfolgearbeiten herauszuarbeiten, welche distal gelegenen Proteine und Signalwege durch die NFκB Aktivierung im Rahmen der BPD Entstehung und der damit assoziierten Zytokin-Einwirkung verändert werden. So könnte in Zukunft durch gezielte Blockade von Faktoren in der u.a. durch die pro-inflammatorischen Zytokine induzierten Signalkaskade des Nuclear Factor-κB die Blockade dieses übergeordneten Transkriptionsfaktors durch Blockade untergeordneter Faktoren vermieden und damit das Risiko möglicher schwerer Nebenwirkungen reduziert werden (Barnes and Karin 1997, Hoesel and Schmid 2013). Insgesamt wäre die Entwicklung einer entzündungsreduzierenden, spezifisch angreifenden Therapiealternative zu den systemisch wirksamen, nebenwirkungsreichen Glukokortikoiden wünschenswert, die ihre Wirkung z.T. ebenfalls über Inhibition der nukleären Translokation von NFκB bzw. über direkte Inhibition von aktivem NFκBp65 entfalten (Herrington, Carmody et al. 2015). Somit führt der Einsatz der Glukokortikoide ebenfalls zu einer Hemmung des Lungenwachstums (Bird, McDougall et al. 2015). Des Weiteren gilt zu bedenken, dass neben der pulmonalen Inflammationsreaktion in der BPD Entstehung weitere Einflussfaktoren, wie genetische Polymorphismen, das Geburtsalter



und -gewicht, prä- und postnatale Infektionen, ein persistierender Ductus arteriosus etc. eine Rolle spielen (Jobe and Bancalari 2001, Speer 2003). Daher würde die erfolgreiche Therapie der Inflammationsreaktion wahrscheinlich, ähnlich der bereits etablierten Surfactant-Therapie, den Schweregrad der BPD senken, jedoch nicht die Entstehung der Erkrankung vollständig verhindern (Speer 2003).

Insgesamt zeigen die vorgelegten Daten erneut, wie komplex die Interaktion der beteiligten Signalwege und Faktoren in der Lunge bzw. in den pulmonalen Zellen des Frühgeborenen sowohl im Rahmen der physiologischen Lungenentwicklung als auch im Rahmen der pathophysiologischen Krankheitsentstehung ist. Insbesondere wird die Komplexität der Interaktion der besonders relevanten Signalwege des Nuclear Factors- $\kappa$ B und des Transforming-Growth-Factors- $\beta$ 1 deutlich. Dabei kommt beiden Signalwegen nicht nur eine kritische Rolle in der Lungenentwicklung, sondern auch in der Pathogenese der BPD zu (Bartram and Speer 2004, Alvira 2014). Ein noch besseres Verständnis sowohl der notwendigen als auch der überschießenden Aktivierungen in den verschiedenen Stadien der Lungenentwicklung sowie der physiologischen und pathophysiologischen Situation ist Voraussetzung dafür, dass neue Therapien erfolgreich in die klinische Therapie implementiert werden können. Die dargestellte Komplexität ist vermutlich dafür verantwortlich, dass die zuletzt im klinischen Setting in Multicenterstudien überprüften Therapieansätze, wie inhalatives Stickstoffmonoxid, im Gegensatz zu den Änderungen der Beatmungsstrategie und der Einführung der Surfactantapplikation, die über eine verminderte postnatale Schädigung der Lunge durch hohe Sauerstoffkonzentrationen und rhythmische Dehnung und Schädigung der Lunge durch Beatmung wirken, derzeit zu keiner Reduktion der BPD Inzidenz geführt haben (Greenough and Ahmed 2013). Neuer Hoffnungsträger ist die MSC-Therapie, die mit intravenöser oder intratrachealer Applikation allogener MSCs gesunder Individuen und damit intakter Zellfunktion nicht nur in tierexperimentellen Studien positive Effekte auf die Alveolar- und Gefäßentwicklung sowie auf die pulmonale Inflammationsreaktion gezeigt hat: Sie erzielte ebenfalls in der bisher einzigen klinischen Phase 1 Studie an 9 Frühgeborenen positive Resultate (Chang, Ahn et al. 2014, O'Reilly and Thebaud 2015, Mueller, Wolfs et al. 2016). Aufgrund ausgeprägter parakriner Aktivität der MSCs scheint auch die alleinige Applikation des Zellkulturüberstandes vielversprechend zu sein, der essentielle von den MSCs sezernierte Faktoren, wie anti-inflammatorische Mediatoren, Wachstumsfaktoren und sogar kleine membranumhüllte Vesikel, sogenannte Exosomen, enthält, die über ihre Inhaltsstoffe, wie mikroRNA, die Transkription verschiedener Gene beeinflussen können (Mobius and Rudiger 2016). Studien mit reiner Applikation des Kulturmediums erzielten vergleichbare Ergebnisse zur Applikation ganzer Zellen (Aslam, Baveja et al. 2009). Ein genaues Verständnis der physiologischen MSC-Funktion, aber

auch der im Rahmen der BPD stattgefundenen Dysregulation ist folglich für die Weiterentwicklung dieser vielversprechenden Therapieansätze notwendig.

## 6. Zusammenfassung

Die bronchopulmonale Dysplasie (BPD) des Frühgeborenen ist eine multifaktoriell bedingte chronische Lungenerkrankung, die durch eine Störung der Alveolarisierung und Vaskularisierung mit Beeinträchtigung der normalen Lungenentwicklung gekennzeichnet ist. Im Zentrum der Pathogenese steht eine schwere pulmonale Inflamationsreaktion mit einem für die Krankheit charakteristischen Ungleichgewicht pro- und anti-inflammatorischer Mediatoren zugunsten der pro-entzündlichen Seite. Therapeutisch sind die Möglichkeiten eingeschränkt und der Einsatz entzündungshemmender Steroide ist aufgrund ihrer gravierenden Nebenwirkungen v.a. auf die psychomotorische Entwicklung nur bei Versagen aller anderen Therapieoptionen zu rechtfertigen. Daher ist ein grundlegendes Verständnis der Inflamationsreaktion und der Wirkungsweise der zentral beteiligten Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 und TGF- $\beta$ 1 notwendige Voraussetzung zur Entwicklung spezifischer und möglichst selektiv angreifender, nebenwirkungsarmer Therapien.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Präsenz von mesenchymalen Stromazellen (MSCs) pulmonalen Ursprungs im Trachealsekret Frühgeborener einen negativen Prädiktor für die Entwicklung einer BPD darstellt. In Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnten diese Ergebnisse erweitert werden, da diese Zellen bei allen Frühgeborenen aus dem Trachealsekret isoliert werden konnten, die MSC-Isolate unter Zellkulturbedingungen jedoch eine erhöhte Wachstumsgeschwindigkeit aufwiesen, die positiv mit der Beatmungsdauer und dem späteren BPD-Schweregrad korrelierte. Der gestörte Phänotyp der MSCs bei Kindern mit schwerer BPD ging mit den charakteristischen intrazellulären Veränderungen einer verstärkten Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nuclear Factor- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) und einer verminderten Expression des zytoskelettalen Proteins  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA) einher.

In dieser Arbeit wurde daher die Wirkung der zentralen Zytokine der Lungenschädigung im pulmonalen Inflamationsprozess IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 und TGF- $\beta$ 1 auf die phänotypischen und molekularen Eigenschaften von MSCs untersucht, die aus dem Trachealsekret intubierter Frühgeborener isoliert worden waren. Bestimmungen der Wachstumsgeschwindigkeit der MSCs mittels automatisierter, repetitiver Mikroskopie und Impedanzmessung nach Stimulation der Zellen mit den pro-inflammatorischen Zytokinen IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-6 ergaben eine statistisch signifikante Proliferationsinduktion im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen. Für IL-8 wurde in einigen Versuchsreihen ebenfalls eine Mehrproliferation der stimulierten MSCs, jedoch insgesamt kein stabiler Effekt detektiert. TGF- $\beta$ 1, das v.a. in der Limitierung der Inflamationsreaktion eine Rolle

spielt und Reparaturmechanismen initiiert, führte dagegen zu einer signifikanten Hemmung des MSC Wachstums. Somit übten die verschiedenen Zytokine alle einen Einfluss auf die Spontanproliferation der MSCs aus, während weder IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 noch TGF- $\beta$ 1 Einfluss auf die Apoptose, den programmierten Zelltod, nahmen. Bezüglich der Proteinexpression führte die Stimulation mit IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8 zu einer Induktion des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B und zu einer Inhibition der basalen  $\alpha$ -SMA Expression. Dagegen bewirkte die Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 bei allen untersuchten MSC-Isolaten eine Aktivierung des TGF- $\beta$ 1 Signalwegs mit Phosphorylierung von Smad3 und nachfolgend verstärkter  $\alpha$ -SMA Expression.

Zur Bestätigung eines molekularen Zusammenhangs zwischen der NF $\kappa$ B Expression und dem Proliferationsverhalten der MSCs wurde dieses nach Knockdown des Transkriptionsfaktors mittels siRNA Interferenz untersucht. Es zeigte sich eine NF $\kappa$ B Abhängigkeit sowohl der Spontanproliferation der MSCs als auch der Zytokin-induzierten Mehrproliferation. Ebenfalls stieg nach Knockdown von NF $\kappa$ B die  $\alpha$ -SMA Expression an.

Wurden die pro-inflammatorischen Zytokine in simultaner Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 untersucht, so ergab sich ein Dosis-wirkungsabhängiger Effekt mit Proliferationsinhibition der MSCs bei Überwiegen der TGF- $\beta$ 1 Konzentration und einer Mehrproliferation bei Überwiegen der Wirkung von IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$ .

Auf molekularer Ebene bewirkten IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8 jeweils nach Kombinationsstimulation mit TGF- $\beta$ 1 eine Inhibition der TGF- $\beta$ 1 induzierten  $\alpha$ -SMA Expression. Weiterführende Untersuchungen des TGF- $\beta$ 1 Signalwegs nach simultaner Stimulation der MSCs mit TGF- $\beta$ 1 und jeweils einem der Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  oder IL-6 zeigten trotz inhibierter  $\alpha$ -SMA Expression und der damit offensichtlichen Interferenz dieser Zytokine mit dem TGF- $\beta$ 1 Signalweg eine weiterhin unbeeinträchtigte Smad-Phosphorylierung. Dementsprechend war der erste Schritt des Signalwegs noch intakt. Die Interaktion der pro-inflammatorischen Zytokine mit TGF- $\beta$ 1 fand folglich auf einer nachfolgenden Ebene der Signaltransduktion statt.

Zusammenfassend führten die Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-6 zu einem schnell proliferativen Phänotyp. Ebenfalls resultierte die Stimulation mit IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8 in einem hohen NF $\kappa$ B Aktivierungsstatus und einer niedrigen  $\alpha$ -SMA Expression, entsprechend dem Phänotyp der MSCs, der in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe aus dem Trachealsekret Frühgeborener mit schwerer BPD isoliert werden konnte und früher Marker einer schlechteren, pulmonalen Prognose war. Vermutlich ist jedoch auch die Wachstumsinhibition der MSCs durch TGF- $\beta$ 1 negativ für die Lungenentwicklung zu werten, da pulmonale residente MSCs zentrale Regulatoren der Lungenentwicklung darstellen.

Aufgrund der komplexen Wirkung der Zytokine in ihrem Netzwerk, in dem sowohl ein Mangel einzelner Faktoren, als auch ihr Überschuss schwerwiegende Folgen auf die Lungenentwicklung haben und v.a. eine Balance der Faktoren untereinander für eine physiologische Entwicklung ausschlaggebend ist, sind weitere Untersuchungen notwendig, um die bisher erzielten Erkenntnisse umfassend und im Kontext der vielfältigen Aktivierungen und Inhibierungen von Signalwegen zu verstehen und daraus therapeutische Ansätze zu entwickeln.

## 7. Literaturverzeichnis

Alvira, C. M. (2014). "Nuclear factor-kappa-B signaling in lung development and disease: one pathway, numerous functions." Birth Defects Res A Clin Mol Teratol **100**(3): 202-216.

Alvira, C. M., A. Abate, G. Yang, P. A. Dennerly and M. Rabinovitch (2007). "Nuclear factor-kappaB activation in neonatal mouse lung protects against lipopolysaccharide-induced inflammation." Am J Respir Crit Care Med **175**(8): 805-815.

Ambalavanan, N., W. A. Carlo, C. T. D'Angio, S. A. McDonald, A. Das, D. Schendel, P. Thorsen, R. D. Higgins, H. Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child and Human Development Neonatal Research (2009). "Cytokines associated with bronchopulmonary dysplasia or death in extremely low birth weight infants." Pediatrics **123**(4): 1132-1141.

Aslam, M., R. Baveja, O. D. Liang, A. Fernandez-Gonzalez, C. Lee, S. A. Mitsialis and S. Kourembanas (2009). "Bone marrow stromal cells attenuate lung injury in a murine model of neonatal chronic lung disease." Am J Respir Crit Care Med **180**(11): 1122-1130.

Baier, R. J., J. Loggins and T. E. Kruger (2003). "Interleukin-4 and 13 concentrations in infants at risk to develop Bronchopulmonary Dysplasia." BMC Pediatr **3**: 8.

Barnes, P. J. and M. Karin (1997). "Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases." N Engl J Med **336**(15): 1066-1071.

Bartram, U. and C. P. Speer (2004). "The role of transforming growth factor beta in lung development and disease." Chest **125**(2): 754-765.

Berger, T. M., Bachmann, II, M. Adams and G. Schubiger (2004). "Impact of improved survival of very low-birth-weight infants on incidence and severity of bronchopulmonary dysplasia." Biol Neonate **86**(2): 124-130.

Bhatt, A. J., G. S. Pryhuber, H. Huyck, R. H. Watkins, L. A. Metlay and W. M. Maniscalco (2001). "Disrupted pulmonary vasculature and decreased vascular endothelial growth factor, Flt-1, and TIE-2 in human infants dying with bronchopulmonary dysplasia." Am J Respir Crit Care Med **164**(10 Pt 1): 1971-1980.

Biniwale, M. A. and R. A. Ehrenkranz (2006). "The role of nutrition in the prevention and management of bronchopulmonary dysplasia." Semin Perinatol **30**(4): 200-208.

Bird, A. D., A. R. McDougall, B. Seow, S. B. Hooper and T. J. Cole (2015). "Glucocorticoid regulation of lung development: lessons learned from conditional GR knockout mice." Mol Endocrinol **29**(2): 158-171.

Bjorklund, L. J., J. Ingimarsson, T. Curstedt, J. John, B. Robertson, O. Werner and C. T. Vilstrup (1997). "Manual ventilation with a few large breaths at birth compromises the therapeutic effect of subsequent surfactant replacement in immature lambs." Pediatr Res **42**(3): 348-355.

Blackwell, T. S. and J. W. Christman (1997). "The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation." Am J Respir Cell Mol Biol **17**(1): 3-9.

- Blackwell, T. S., A. N. Hipps, Y. Yamamoto, W. Han, W. J. Barham, M. C. Ostrowski, F. E. Yull and L. S. Prince (2011). "NF-kappaB signaling in fetal lung macrophages disrupts airway morphogenesis." J Immunol **187**(5): 2740-2747.
- Blahnik, M. J., R. Ramanathan, C. R. Riley and P. Minoo (2001). "Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha and IL-10 production by lung macrophages from preterm and term neonates." Pediatr Res **50**(6): 726-731.
- Bland, R. D., L. M. Mokres, R. Ertsey, B. E. Jacobson, S. Jiang, M. Rabinovitch, L. Xu, E. S. Shinwell, F. Zhang and M. A. Beasley (2007). "Mechanical ventilation with 40% oxygen reduces pulmonary expression of genes that regulate lung development and impairs alveolar septation in newborn mice." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **293**(5): L1099-1110.
- Bonikos, D. S., K. G. Bensch, S. K. Ludwin and W. H. Northway, Jr. (1975). "Oxygen toxicity in the newborn. The effect of prolonged 100 per cent O<sub>2</sub> exposure on the lungs of newborn mice." Lab Invest **32**(5): 619-635.
- Bose, C. L., C. E. Dammann and M. M. Laughon (2008). "Bronchopulmonary dysplasia and inflammatory biomarkers in the premature neonate." Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed **93**(6): F455-461.
- Bostrom, H., K. Willetts, M. Pekny, P. Leveen, P. Lindahl, H. Hedstrand, M. Pekna, M. Hellstrom, S. Gebre-Medhin, M. Schalling, M. Nilsson, S. Kurland, J. Tornell, J. K. Heath and C. Betsholtz (1996). "PDGF-A signaling is a critical event in lung alveolar myofibroblast development and alveogenesis." Cell **85**(6): 863-873.
- Bourbia, A., M. A. Cruz and H. J. Rozycki (2006). "NF-kappaB in tracheal lavage fluid from intubated premature infants: association with inflammation, oxygen, and outcome." Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed **91**(1): F36-39.
- Bourbon, J., O. Boucherat, B. Chailley-Heu and C. Delacourt (2005). "Control mechanisms of lung alveolar development and their disorders in bronchopulmonary dysplasia." Pediatr Res **57**(5 Pt 2): 38R-46R.
- Bozyk, P. D., A. P. Popova, J. K. Bentley, A. M. Goldsmith, M. J. Linn, D. J. Weiss and M. B. Hershenson (2011). "Mesenchymal stromal cells from neonatal tracheal aspirates demonstrate a pattern of lung-specific gene expression." Stem Cells Dev **20**(11): 1995-2007.
- Bruce, M. C., C. E. Honaker and R. J. Cross (1999). "Lung fibroblasts undergo apoptosis following alveolarization." Am J Respir Cell Mol Biol **20**(2): 228-236.
- Bry, K., J. A. Whitsett and U. Lappalainen (2007). "IL-1beta disrupts postnatal lung morphogenesis in the mouse." Am J Respir Cell Mol Biol **36**(1): 32-42.
- Burri, P. H. (1984). "Fetal and postnatal development of the lung." Annu Rev Physiol **46**: 617-628.
- Burri, P. H. (2006). "Structural aspects of postnatal lung development - alveolar formation and growth." Biol Neonate **89**(4): 313-322.
- Burri, P. H. and M. Moschopoulos (1992). "Structural analysis of fetal rat lung development." Anat Rec **234**(3): 399-418.

- Carraro, S., M. Filippone, L. Da Dalt, V. Ferraro, M. Maretti, S. Bressan, D. El Mazloum and E. Baraldi (2013). "Bronchopulmonary dysplasia: the earliest and perhaps the longest lasting obstructive lung disease in humans." Early Hum Dev **89 Suppl 3**: S3-5.
- Chang, Y. S., S. Y. Ahn, H. S. Yoo, S. I. Sung, S. J. Choi, W. I. Oh and W. S. Park (2014). "Mesenchymal stem cells for bronchopulmonary dysplasia: phase 1 dose-escalation clinical trial." J Pediatr **164**(5): 966-972 e966.
- Chen, H., J. Sun, S. Buckley, C. Chen, D. Warburton, X. F. Wang and W. Shi (2005). "Abnormal mouse lung alveolarization caused by Smad3 deficiency is a developmental antecedent of centrilobular emphysema." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **288**(4): L683-691.
- Choi, C. W. (2010). "Lung interstitial cells during alveolarization." Korean J Pediatr **53**(12): 979-984.
- Coalson, J. J. (2003). "Pathology of new bronchopulmonary dysplasia." Semin Neonatol **8**(1): 73-81.
- Coalson, J. J., V. T. Winter, T. Siler-Khodr and B. A. Yoder (1999). "Neonatal chronic lung disease in extremely immature baboons." Am J Respir Crit Care Med **160**(4): 1333-1346.
- Dauger, S., L. Ferkdadji, G. Saumon, G. Vardon, M. Peuchmaur, C. Gaultier and J. Gallego (2003). "Neonatal exposure to 65% oxygen durably impairs lung architecture and breathing pattern in adult mice." Chest **123**(2): 530-538.
- Desai, T. J. and W. V. Cardoso (2002). "Growth factors in lung development and disease: friends or foe?" Respir Res **3**: 2.
- DiCosmo, B. F., G. P. Geba, D. Picarella, J. A. Elias, J. A. Rankin, B. R. Stripp, J. A. Whitsett and R. A. Flavell (1994). "Airway epithelial cell expression of interleukin-6 in transgenic mice. Uncoupling of airway inflammation and bronchial hyperreactivity." J Clin Invest **94**(5): 2028-2035.
- Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop and E. Horwitz (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." Cytotherapy **8**(4): 315-317.
- Doyle, L. W. and P. J. Anderson (2009). "Long-term outcomes of bronchopulmonary dysplasia." Semin Fetal Neonatal Med **14**(6): 391-395.
- Ehrenkranz, R. A., M. C. Walsh, B. R. Vohr, A. H. Jobe, L. L. Wright, A. A. Fanaroff, L. A. Wrage, K. Poole, H. National Institutes of Child and N. Human Development Neonatal Research (2005). "Validation of the National Institutes of Health consensus definition of bronchopulmonary dysplasia." Pediatrics **116**(6): 1353-1360.
- Ehrhardt, H., T. Pritzke, P. Oak, M. Kossert, L. Biebach, K. Forster, M. Koschlig, C. M. Alvira and A. Hilgendorff (2016). "ABSENCE OF TNF-alpha ENHANCES INFLAMMATORY RESPONSE IN THE NEWBORN LUNG UNDERGOING MECHANICAL VENTILATION." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol: ajplung 00367 02015.
- Ehrhardt, H. and K. P. Zimmer (2016). "The need for coordination of research activities in pediatric lung diseases." Mol Cell Pediatr **3**(1): 26.



- Fawke, J., S. Lum, J. Kirkby, E. Hennessy, N. Marlow, V. Rowell, S. Thomas and J. Stocks (2010). "Lung function and respiratory symptoms at 11 years in children born extremely preterm: the EPICure study." Am J Respir Crit Care Med **182**(2): 237-245.
- Galambos, C., Y. S. Ng, A. Ali, A. Noguchi, S. Lovejoy, P. A. D'Amore and D. E. DeMello (2002). "Defective pulmonary development in the absence of heparin-binding vascular endothelial growth factor isoforms." Am J Respir Cell Mol Biol **27**(2): 194-203.
- Gauldie, J., T. Galt, P. Bonniaud, C. Robbins, M. Kelly and D. Warburton (2003). "Transfer of the active form of transforming growth factor-beta 1 gene to newborn rat lung induces changes consistent with bronchopulmonary dysplasia." Am J Pathol **163**(6): 2575-2584.
- Gien, J. and J. P. Kinsella (2011). "Pathogenesis and treatment of bronchopulmonary dysplasia." Curr Opin Pediatr **23**(3): 305-313.
- Greenough, A. (2012). "Long term respiratory outcomes of very premature birth (<32 weeks)." Semin Fetal Neonatal Med **17**(2): 73-76.
- Greenough, A. and N. Ahmed (2013). "Perinatal prevention of bronchopulmonary dysplasia." J Perinat Med **41**(1): 119-126.
- Groneck, P. and C. P. Speer (1995). "Inflammatory mediators and bronchopulmonary dysplasia." Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed **73**(1): F1-3.
- Gu, L., Y. J. Zhu, X. Yang, Z. J. Guo, W. B. Xu and X. L. Tian (2007). "Effect of TGF-beta/Smad signaling pathway on lung myofibroblast differentiation." Acta Pharmacol Sin **28**(3): 382-391.
- Hall, S. L. (1991). "Coagulase-negative staphylococcal infections in neonates." Pediatr Infect Dis J **10**(1): 57-67.
- Halliday, H. L., R. A. Ehrenkranz and L. W. Doyle (2003). "Early postnatal (<96 hours) corticosteroids for preventing chronic lung disease in preterm infants." Cochrane Database Syst Rev(1): CD001146.
- Halliday, H. L., R. A. Ehrenkranz and L. W. Doyle (2003). "Moderately early (7-14 days) postnatal corticosteroids for preventing chronic lung disease in preterm infants." Cochrane Database Syst Rev(1): CD001144.
- Halliday, H. L., R. A. Ehrenkranz and L. W. Doyle (2010). "Early (< 8 days) postnatal corticosteroids for preventing chronic lung disease in preterm infants." Cochrane Database Syst Rev(1): CD001146.
- Hashimoto, N., H. Jin, T. Liu, S. W. Chensue and S. H. Phan (2004). "Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis." J Clin Invest **113**(2): 243-252.
- Hayden, M. S. and S. Ghosh (2012). "NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions." Genes Dev **26**(3): 203-234.
- Heinrich, P. C., I. Behrmann, S. Haan, H. M. Hermanns, G. Muller-Newen and F. Schaper (2003). "Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation." Biochem J **374**(Pt 1): 1-20.
- Heinrich, P. C., J. V. Castell and T. Andus (1990). "Interleukin-6 and the acute phase response." Biochem J **265**(3): 621-636.

- Henderson-Smart, D. J., J. L. Hutchinson, D. A. Donoghue, N. J. Evans, J. M. Simpson, I. Wright, Australian and N. New Zealand Neonatal (2006). "Prenatal predictors of chronic lung disease in very preterm infants." Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed **91**(1): F40-45.
- Henrick, K. T., A. G. Keeton, S. Nanua, T. G. Kijek, A. M. Goldsmith, U. S. Sajjan, J. K. Bentley, V. N. Lama, B. B. Moore, R. E. Schumacher, V. J. Thannickal and M. B. Hershenson (2007). "Lung cells from neonates show a mesenchymal stem cell phenotype." Am J Respir Crit Care Med **175**(11): 1158-1164.
- Herrington, F. D., R. J. Carmody and C. S. Goodyear (2015). "Modulation of NF-kappaB Signaling as a Therapeutic Target in Autoimmunity." J Biomol Screen.
- Hilgendorff, A., K. Heidinger, A. Bohnert, A. Kleinstreiber, I. R. König, A. Ziegler, U. Lindner, G. Frey, C. Merz, B. Lettgen, T. Chakraborty, L. Gortner and G. Bein (2009). "Association of polymorphisms in the human surfactant protein-D (SFTPD) gene and postnatal pulmonary adaptation in the preterm infant." Acta Paediatr **98**(1): 112-117.
- Hilgendorff, A., I. Reiss, H. Ehrhardt, O. Eickelberg and C. M. Alvira (2014). "Chronic lung disease in the preterm infant. Lessons learned from animal models." Am J Respir Cell Mol Biol **50**(2): 233-245.
- Hoesel, B. and J. A. Schmid (2013). "The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer." Mol Cancer **12**: 86.
- Hoyle, G. W., J. Li, J. B. Finkelstein, T. Eisenberg, J. Y. Liu, J. A. Lasky, G. Athas, G. F. Morris and A. R. Brody (1999). "Emphysematous lesions, inflammation, and fibrosis in the lungs of transgenic mice overexpressing platelet-derived growth factor." Am J Pathol **154**(6): 1763-1775.
- Hu, B., Z. Wu and S. H. Phan (2003). "Smad3 mediates transforming growth factor-beta-induced alpha-smooth muscle actin expression." Am J Respir Cell Mol Biol **29**(3 Pt 1): 397-404.
- Husain, A. N., N. H. Siddiqui and J. T. Stocker (1998). "Pathology of arrested acinar development in postsurfactant bronchopulmonary dysplasia." Hum Pathol **29**(7): 710-717.
- Iosef, C., T. P. Alastalo, Y. Hou, C. Chen, E. S. Adams, S. C. Lyu, D. N. Cornfield and C. M. Alvira (2012). "Inhibiting NF-kappaB in the developing lung disrupts angiogenesis and alveolarization." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **302**(10): L1023-1036.
- Jakkula, M., T. D. Le Cras, S. Gebb, K. P. Hirth, R. M. Tuder, N. F. Voelkel and S. H. Abman (2000). "Inhibition of angiogenesis decreases alveolarization in the developing rat lung." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **279**(3): L600-607.
- Jobe, A. H. (2011). "The new bronchopulmonary dysplasia." Curr Opin Pediatr **23**(2): 167-172.
- Jobe, A. H. and E. Bancalari (2001). "Bronchopulmonary dysplasia." Am J Respir Crit Care Med **163**(7): 1723-1729.
- Jobe, A. J. (1999). "The new BPD: an arrest of lung development." Pediatr Res **46**(6): 641-643.
- Jones, C. A., R. G. Cayabyab, K. Y. Kwong, C. Stotts, B. Wong, H. Hamdan, P. Minoo and R. A. deLemos (1996). "Undetectable interleukin (IL)-10 and persistent IL-8 expression early in hyaline membrane disease: a possible developmental basis for the

predisposition to chronic lung inflammation in preterm newborns." *Pediatr Res* **39**(6): 966-975.

Jonsson, B., K. Tullus, A. Brauner, Y. Lu and G. Noack (1997). "Early increase of TNF alpha and IL-6 in tracheobronchial aspirate fluid indicator of subsequent chronic lung disease in preterm infants." *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **77**(3): F198-201.

Jorch, G., Hübler, A. (2010). *Neonatologie, Die Medizin des Früh- und Reifgeborenen*. 71636 Ludwigsburg. Georg Thieme Verlag, Kapitel 10, S. 175-180, ISBN: 978-3-13-146071-4.

Kinsella, J. P., A. Greenough and S. H. Abman (2006). "Bronchopulmonary dysplasia." *Lancet* **367**(9520): 1421-1431.

Kolb, M., P. J. Margetts, D. C. Anthony, F. Pitossi and J. Gaudie (2001). "Transient expression of IL-1beta induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis." *J Clin Invest* **107**(12): 1529-1536.

Kotecha, S. (1996). "Cytokines in chronic lung disease of prematurity." *Eur J Pediatr* **155 Suppl 2**: S14-17.

Kotecha, S., A. Wangoo, M. Silverman and R. J. Shaw (1996). "Increase in the concentration of transforming growth factor beta-1 in bronchoalveolar lavage fluid before development of chronic lung disease of prematurity." *J Pediatr* **128**(4): 464-469.

Kroon, A. A., J. Wang, B. P. Kavanagh, Z. Huang, M. Kuliszewski, J. B. van Goudoever and M. Post (2011). "Prolonged mechanical ventilation induces cell cycle arrest in newborn rat lung." *PLoS One* **6**(2): e16910.

Kunig, A. M., V. Balasubramaniam, N. E. Markham, D. Morgan, G. Montgomery, T. R. Grover and S. H. Abman (2005). "Recombinant human VEGF treatment enhances alveolarization after hyperoxic lung injury in neonatal rats." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **289**(4): L529-535.

Kwong, K. Y., C. A. Jones, R. Cayabyab, C. Lecart, N. Khuu, I. Rhandhawa, J. M. Hanley, R. Ramanathan, R. A. deLemos and P. Minoo (1998). "The effects of IL-10 on proinflammatory cytokine expression (IL-1beta and IL-8) in hyaline membrane disease (HMD)." *Clin Immunol Immunopathol* **88**(1): 105-113.

Lama, V. N. and S. H. Phan (2006). "The extrapulmonary origin of fibroblasts: stem/progenitor cells and beyond." *Proc Am Thorac Soc* **3**(4): 373-376.

Landry, J. S., G. M. Tremblay, P. Z. Li, C. Wong, A. Benedetti and T. Taivassalo (2015). "Lung Function and Bronchial Hyperresponsiveness in Adults Born Prematurely: A Cohort Study." *Ann Am Thorac Soc*.

Lasky, J. A. and A. R. Brody (2000). "Interstitial fibrosis and growth factors." *Environ Health Perspect* **108 Suppl 4**: 751-762.

Lassus, P., A. Ristimäki, O. Ylikorkala, L. Viinikka and S. Andersson (1999). "Vascular endothelial growth factor in human preterm lung." *Am J Respir Crit Care Med* **159**(5 Pt 1): 1429-1433.

Le Cras, T. D., N. E. Markham, R. M. Tuder, N. F. Voelkel and S. H. Abman (2002). "Treatment of newborn rats with a VEGF receptor inhibitor causes pulmonary

hypertension and abnormal lung structure." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **283**(3): L555-562.

Lecart, C., R. Cayabyab, S. Buckley, J. Morrison, K. Y. Kwong, D. Warburton, R. Ramanathan, C. A. Jones and P. Minoo (2000). "Bioactive transforming growth factor-beta in the lungs of extremely low birthweight neonates predicts the need for home oxygen supplementation." Biol Neonate **77**(4): 217-223.

Leslie, K. O., J. J. Mitchell, J. L. Woodcock-Mitchell and R. B. Low (1990). "Alpha smooth muscle actin expression in developing and adult human lung." Differentiation **44**(2): 143-149.

Lindahl, P., L. Karlsson, M. Hellstrom, S. Gebre-Medhin, K. Willetts, J. K. Heath and C. Betsholtz (1997). "Alveogenesis failure in PDGF-A-deficient mice is coupled to lack of distal spreading of alveolar smooth muscle cell progenitors during lung development." Development **124**(20): 3943-3953.

Manktelow, B. N., E. S. Draper, S. Annamalai and D. Field (2001). "Factors affecting the incidence of chronic lung disease of prematurity in 1987, 1992, and 1997." Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed **85**(1): F33-35.

Manna, S. K. and G. T. Ramesh (2005). "Interleukin-8 induces nuclear transcription factor-kappaB through a TRAF6-dependent pathway." J Biol Chem **280**(8): 7010-7021.

Margraf, L. R., J. F. Tomashefski, Jr., M. C. Bruce and B. B. Dahms (1991). "Morphometric analysis of the lung in bronchopulmonary dysplasia." Am Rev Respir Dis **143**(2): 391-400.

May, C., C. Kennedy, A. D. Milner, G. F. Rafferty, J. L. Peacock and A. Greenough (2011). "Lung function abnormalities in infants developing bronchopulmonary dysplasia." Arch Dis Child **96**(11): 1014-1019.

McGrath-Morrow, S. A., C. Cho, C. Cho, L. Zhen, D. J. Hicklin and R. M. Tuder (2005). "Vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade disrupts postnatal lung development." Am J Respir Cell Mol Biol **32**(5): 420-427.

Miyazaki, Y., K. Araki, C. Vesin, I. Garcia, Y. Kapanci, J. A. Whitsett, P. F. Piguet and P. Vassalli (1995). "Expression of a tumor necrosis factor-alpha transgene in murine lung causes lymphocytic and fibrosing alveolitis. A mouse model of progressive pulmonary fibrosis." J Clin Invest **96**(1): 250-259.

Mobius, M. A. and M. Rudiger (2016). "Mesenchymal stromal cells in the development and therapy of bronchopulmonary dysplasia." Mol Cell Pediatr **3**(1): 18.

Mobius, M. A. and B. Thebaud (2015). "Stem Cells and Their Mediators - Next Generation Therapy for Bronchopulmonary Dysplasia." Front Med (Lausanne) **2**: 50.

Mokres, L. M., K. Parai, A. Hilgendorff, R. Ertsey, C. M. Alvira, M. Rabinovitch and R. D. Bland (2010). "Prolonged mechanical ventilation with air induces apoptosis and causes failure of alveolar septation and angiogenesis in lungs of newborn mice." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **298**(1): L23-35.

Morty, R. E., M. Konigshoff and O. Eickelberg (2009). "Transforming growth factor-beta signaling across ages: from distorted lung development to chronic obstructive pulmonary disease." Proc Am Thorac Soc **6**(7): 607-613.

- Mueller, M., T. G. Wolfs, A. Schoeberlein, A. W. Gavilanes, D. Surbek and B. W. Kramer (2016). "Mesenchymal stem/stromal cells-a key mediator for regeneration after perinatal morbidity?" Mol Cell Pediatr **3**(1): 6.
- Mukaida, N. (2003). "Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **284**(4): L566-577.
- Naik, A. S., S. G. Kallapur, C. J. Bachurski, A. H. Jobe, J. Michna, B. W. Kramer and M. Ikegami (2001). "Effects of ventilation with different positive end-expiratory pressures on cytokine expression in the preterm lamb lung." Am J Respir Crit Care Med **164**(3): 494-498.
- Nakanishi, H., T. Sugiura, J. B. Streisand, S. M. Lonning and J. D. Roberts, Jr. (2007). "TGF-beta-neutralizing antibodies improve pulmonary alveologenesis and vasculogenesis in the injured newborn lung." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **293**(1): L151-161.
- Nicoletti, I., G. Migliorati, M. C. Pagliacci, F. Grignani and C. Riccardi (1991). "A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry." J Immunol Methods **139**(2): 271-279.
- Niedermaier, S. and A. Hilgendorff (2015). "Bronchopulmonary dysplasia - an overview about pathophysiologic concepts." Mol Cell Pediatr **2**(1): 2.
- Northway, W. H., Jr., R. C. Rosan and D. Y. Porter (1967). "Pulmonary disease following respirator therapy of hyaline-membrane disease. Bronchopulmonary dysplasia." N Engl J Med **276**(7): 357-368.
- Northway, W. H., Jr., R. C. Rosan, L. Shahinian, Jr., R. A. Castellino, M. T. Gyepes and T. Durbridge (1969). "Radiologic and histologic investigation of pulmonary oxygen toxicity in newborn guinea pigs." Invest Radiol **4**(3): 148-155.
- O'Reilly, M. and B. Thebaud (2015). "Stem cells for the prevention of neonatal lung disease." Neonatology **107**(4): 360-364.
- Pechkovsky, D. V., T. L. Hackett, S. S. An, F. Shaheen, L. A. Murray and D. A. Knight (2010). "Human lung parenchyma but not proximal bronchi produces fibroblasts with enhanced TGF-beta signaling and alpha-SMA expression." Am J Respir Cell Mol Biol **43**(6): 641-651.
- Phan, S. H. (2008). "Biology of fibroblasts and myofibroblasts." Proc Am Thorac Soc **5**(3): 334-337.
- Piek, E., C. H. Heldin and P. Ten Dijke (1999). "Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling." FASEB J **13**(15): 2105-2124.
- Popova, A. P., J. K. Bentley, T. X. Cui, M. N. Richardson, M. J. Linn, J. Lei, Q. Chen, A. M. Goldsmith, G. S. Pryhuber and M. B. Hershenson (2014). "Reduced platelet-derived growth factor receptor expression is a primary feature of human bronchopulmonary dysplasia." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **307**(3): L231-239.
- Popova, A. P., P. D. Bozyk, J. K. Bentley, M. J. Linn, A. M. Goldsmith, R. E. Schumacher, G. M. Weiner, A. G. Filbrun and M. B. Hershenson (2010). "Isolation of tracheal aspirate mesenchymal stromal cells predicts bronchopulmonary dysplasia." Pediatrics **126**(5): e1127-1133.

- Popova, A. P., P. D. Bozyk, A. M. Goldsmith, M. J. Linn, J. Lei, J. K. Bentley and M. B. Hershenson (2010). "Autocrine production of TGF-beta1 promotes myofibroblastic differentiation of neonatal lung mesenchymal stem cells." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **298**(6): L735-743.
- Rahman, A. and F. Fazal (2011). "Blocking NF-kappaB: an inflammatory issue." Proc Am Thorac Soc **8**(6): 497-503.
- Randell, S. H., R. R. Mercer and S. L. Young (1990). "Neonatal hyperoxia alters the pulmonary alveolar and capillary structure of 40-day-old rats." Am J Pathol **136**(6): 1259-1266.
- Reicherzer T., A. Schulze, H. Ehrhardt (2010). "Phänotypische Charakterisierung der Lungenfibroblasten aus dem Trachealspirat von Frühgeborenen < 29 vollendeten Schwangerschaftswochen." Klinische Pädiatrie 2010; **222**:70-71, Georg Thieme Verlag.
- Reicherzer T., S. Häffner, J. Gertheiss, A. Schulze, H. Ehrhardt (2016). "Phenotype of lung mesenchymal stromal cells predicts severity of BPD in extremely preterm infants" ; EAPS Congress 2016/Abstract; Eur J Pediatr **175**:1393–1880).
- Roberts, D. and S. Dalziel (2006). "Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth." Cochrane Database Syst Rev(3): CD004454.
- Rogers, L. K., T. E. Tipple, L. D. Nelin and S. E. Welty (2009). "Differential responses in the lungs of newborn mouse pups exposed to 85% or >95% oxygen." Pediatr Res **65**(1): 33-38.
- Sabatini, F., L. Petecchia, M. Taviani, V. Jodon de Villeroche, G. A. Rossi and D. Brouty-Boye (2005). "Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities." Lab Invest **85**(8): 962-971.
- Sadler, T. (2003). Medizinische Embryologie - Die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen. D-71636 Ludwigsburg, Georg Thieme Verlag, 10. Auflage, Kapitel 13, S.238-247, ISBN: 3-13-446610-4.
- Schermuly, R. T., E. Dony, H. A. Ghofrani, S. Pullamsetti, R. Savai, M. Roth, A. Sydykov, Y. J. Lai, N. Weissmann, W. Seeger and F. Grimminger (2005). "Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition." J Clin Invest **115**(10): 2811-2821.
- Schittny, J. C., S. I. Mund and M. Stamanoni (2008). "Evidence and structural mechanism for late lung alveolarization." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **294**(2): L246-254.
- Schmidt, B., R. S. Roberts, P. Davis, L. W. Doyle, K. J. Barrington, A. Ohlsson, A. Solimano, W. Tin and G. Caffeine for Apnea of Prematurity Trial (2006). "Caffeine therapy for apnea of prematurity." N Engl J Med **354**(20): 2112-2121.
- Schmolzer, G. M., A. B. Te Pas, P. G. Davis and C. J. Morley (2008). "Reducing lung injury during neonatal resuscitation of preterm infants." J Pediatr **153**(6): 741-745.
- Schneibel, K. R., A. M. Fitzpatrick, X. D. Ping, L. A. Brown and T. W. Gauthier (2013). "Inflammatory mediator patterns in tracheal aspirate and their association with bronchopulmonary dysplasia in very low birth weight neonates." J Perinatol **33**(5): 383-387.

Schuliga, M. (2015). "NF-kappaB Signaling in Chronic Inflammatory Airway Disease." Biomolecules **5**(3): 1266-1283.

Seifert, R. A., S. A. Coats, E. W. Raines, R. Ross and D. F. Bowen-Pope (1994). "Platelet-derived growth factor (PDGF) receptor alpha-subunit mutant and reconstituted cell lines demonstrate that transforming growth factor-beta can be mitogenic through PDGF A-chain-dependent and -independent pathways." J Biol Chem **269**(19): 13951-13955.

Shahzad, T., S. Radajewski, C. M. Chao, S. Bellusci and H. Ehrhardt (2016). "Pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia: when inflammation meets organ development." Mol Cell Pediatr **3**(1): 23.

Sime, P. J., R. A. Marr, D. Gauldie, Z. Xing, B. R. Hewlett, F. L. Graham and J. Gauldie (1998). "Transfer of tumor necrosis factor-alpha to rat lung induces severe pulmonary inflammation and patchy interstitial fibrogenesis with induction of transforming growth factor-beta1 and myofibroblasts." Am J Pathol **153**(3): 825-832.

Sime, P. J., Z. Xing, F. L. Graham, K. G. Csaky and J. Gauldie (1997). "Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor-beta1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung." J Clin Invest **100**(4): 768-776.

Speer, C. P. (2003). "Inflammation and bronchopulmonary dysplasia." Semin Neonatol **8**(1): 29-38.

Speer, C. P. (2004). "Pre- and postnatal inflammatory mechanisms in chronic lung disease of preterm infants." Paediatr Respir Rev **5 Suppl A**: S241-244.

Speer, C. P. (2006). "Inflammation and bronchopulmonary dysplasia: a continuing story." Semin Fetal Neonatal Med **11**(5): 354-362.

Speer, C. P. (2006). "Pulmonary inflammation and bronchopulmonary dysplasia." J Perinatol **26 Suppl 1**: S57-62; discussion S63-54.

Speer, C. P. (2009). "Chorioamnionitis, postnatal factors and proinflammatory response in the pathogenetic sequence of bronchopulmonary dysplasia." Neonatology **95**(4): 353-361.

Stoll, B. J., N. Hansen, A. A. Fanaroff, L. L. Wright, W. A. Carlo, R. A. Ehrenkranz, J. A. Lemons, E. F. Donovan, A. R. Stark, J. E. Tyson, W. Oh, C. R. Bauer, S. B. Korones, S. Shankaran, A. R. Laptook, D. K. Stevenson, L. A. Papile and W. K. Poole (2002). "Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network." Pediatrics **110**(2 Pt 1): 285-291.

Strieter, R. M., E. C. Keeley, M. A. Hughes, M. D. Burdick and B. Mehrad (2009). "The role of circulating mesenchymal progenitor cells (fibrocytes) in the pathogenesis of pulmonary fibrosis." J Leukoc Biol **86**(5): 1111-1118.

Thebaud, B., F. Ladha, E. D. Michelakis, M. Sawicka, G. Thurston, F. Eaton, K. Hashimoto, G. Harry, A. Haromy, G. Korbitt and S. L. Archer (2005). "Vascular endothelial growth factor gene therapy increases survival, promotes lung angiogenesis, and prevents alveolar damage in hyperoxia-induced lung injury: evidence that angiogenesis participates in alveolarization." Circulation **112**(16): 2477-2486.

Vicencio, A. G., C. G. Lee, S. J. Cho, O. Eickelberg, Y. Chuu, G. G. Haddad and J. A. Elias (2004). "Conditional overexpression of bioactive transforming growth factor-beta1 in

- neonatal mouse lung: a new model for bronchopulmonary dysplasia?" Am J Respir Cell Mol Biol **31**(6): 650-656.
- Wang, J., R. Zohar and C. A. McCulloch (2006). "Multiple roles of alpha-smooth muscle actin in mechanotransduction." Exp Cell Res **312**(3): 205-214.
- Wang, L., B. Walia, J. Evans, A. T. Gewirtz, D. Merlin and S. V. Sitaraman (2003). "IL-6 induces NF-kappa B activation in the intestinal epithelia." J Immunol **171**(6): 3194-3201.
- Wang, P., P. Wu, M. I. Siegel, R. W. Egan and M. M. Billah (1995). "Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms." J Biol Chem **270**(16): 9558-9563.
- Warner, B. B., L. A. Stuart, R. A. Papes and J. R. Wispe (1998). "Functional and pathological effects of prolonged hyperoxia in neonatal mice." Am J Physiol **275**(1 Pt 1): L110-117.
- Willet, K. E., A. H. Jobe, M. Ikegami, J. Newnham, S. Brennan and P. D. Sly (2000). "Antenatal endotoxin and glucocorticoid effects on lung morphometry in preterm lambs." Pediatr Res **48**(6): 782-788.
- Willis, B. C., R. M. duBois and Z. Borok (2006). "Epithelial origin of myofibroblasts during fibrosis in the lung." Proc Am Thorac Soc **3**(4): 377-382.
- Zhang, H. and S. C. Sun (2015). "NF-kappaB in inflammation and renal diseases." Cell Biosci **5**: 63.
- Zhang, H. Y. and S. H. Phan (1999). "Inhibition of myofibroblast apoptosis by transforming growth factor beta(1)." Am J Respir Cell Mol Biol **21**(6): 658-665.
- Zhou, X., W. Wu, H. Hu, J. Milosevic, K. Konishi, N. Kaminski and S. E. Wenzel (2011). "Genomic differences distinguish the myofibroblast phenotype of distal lung fibroblasts from airway fibroblasts." Am J Respir Cell Mol Biol **45**(6): 1256-1262.



## 8. Anhang

### 8.1. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen werden in der Regel bei erster Nennung in den jeweiligen Kapiteln erläutert. Einige Abkürzungen finden sich nachfolgend. Physikalische Größen wurden entsprechend dem System der SI-Einheiten ("Système international d'unités") bezeichnet.

A	Ampere
Abb.	Abbildung
ANOVA	Analysis of Variance
APS	Ammoniumpersulfat
ARDS	Akutes Atemnotsyndrom ("Acute Respiratory Distress Syndrome")
BPD	Bronchopulmonale Dysplasie
BSA	Bovines Serumalbumin
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of Differentiation
cm	Zentimeter
Co	Kontrolle
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung ("Chronic Obstructive Pulmonary Disease")
d	Tag ("day")
dd	doppelt destilliert ("double-distilled")
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ("Deoxyribonucleic acid")
ECL	Enhanced Chemilumineszenz - Lösung
etc.	et cetera
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetales Kälberserum ("Fetal Calf Serum")
FGF	Fibroblast Growth Factor
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
ggf.	gegebenenfalls

h	Stunde ("hour")
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HRP	Meerrettichperoxidase ("Horseradish Peroxidase")
IL	Interleukin (z.B. IL-1 $\beta$ /Interleukin-1beta)
kDa	Kilo Dalton
KNS	koagulasenegative Staphylokokken
LPS	Lipopolysaccharid
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
mA	Milliampere
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	Ribonukleinsäure ("messenger Ribonucleic Acid")
MSC	Mesenchymale Stromazelle ("mesenchymal stromal cell")
n	natürliche Zahl
NF $\kappa$ B	Nuclear Factor - Kappa B
ng	Nanogramm
NLS	nukleäres Lokalisierungssignal
nM	Nanomolar
n.s.	Nicht signifikant
p	Passage (Zellkultur), Signifikanzwert (Statistik)
P	Positivkontrolle
p.m.	post menstruationem
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ("phosphate buffered saline")
PDGF-A	Platelet-derived Growth Factor-A
PEEP	Positiver Endexpiratorischer Druck ("positive end-expiratory pressure")
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Ionenkonzentration
PI	Proliferationsindex
p-Smad	phospho-Smad
PVDF	Polyvinylidenfluorid
QL	Quanten Licht

RNA	Ribonukleinsäure ("Ribonucleic Acid")
rpm	Umdrehungen pro Minute ("revolutions per minute")
RTCA DP	Real-Time Cell Analysis Dual Purpose
S.	Seite
s.	siehe
SDS	Sodium (Natrium) - Dodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid- Gelelektrophorese
SEM	Standardfehler ("standard error of the mean")
siRNA	small interfering Ribonucleic Acid/Ribonukleinsäure
siNFκBp65	small interfering RNA gegen Nuclear Factor - Kappa Bp65
α-SMA	alpha - Smooth Muscle Actin
SSW	Schwangerschaftswoche
TBST	Mischung aus Tris-buffered saline und Tween20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF-β1	Transforming Growth Factor-beta 1
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Einheit)
u.a.	unter anderem
u.v.m.	und vieles mehr
V	Volt
v.a.	vor allem
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

## 8.2. Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn PD. Dr. med. Harald Ehrhardt, danke ich besonders herzlich für die hervorragende Betreuung der Arbeit, die vielen wissenschaftlichen Diskussionen und Anregungen, die Einarbeitung im Labor, die tatkräftige Unterstützung und für die ständige Erreichbarkeit bei neu aufgetretenen Fragen. Vielen Dank für die motivierenden und freundschaftlichen Worte in allen Lebenslagen der letzten Jahre und die 100%ige Zuverlässigkeit, die besonders zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Besonders möchte ich mich für die Übernahme der Betreuung und die Beurteilung der Arbeit bedanken.

Meinem ehemaligen Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Andreas Schulze, danke ich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, die Dissertation im Rahmen des Förderprogramms für Forschung und Lehre der LMU durchführen zu können. Vielen Dank auch für die lehrreiche Zeit, die ich auf der neonatologischen Intensivstation verbringen durfte.

Bei den weiteren Gutachtern möchte ich mich im Voraus für ihre Mühe bei der Beurteilung meiner Doktorarbeit bedanken.

Dem Förderprogramm für Forschung und Lehre unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann möchte ich für das lehrreiche begleitende Promotionsstudium, die Möglichkeit zum Austausch mit anderen Doktoranden im Methodenkolloquium und die Anschubfinanzierung besonders danken.

Dem Team der neonatologischen Intensivstation danke ich für die Bereitstellung der Trachealsekrete von Frühgeborenen nach Routineabsaugungen. Besonders danke ich den Eltern der Frühgeborenen für die Einwilligung in die Studie, die damit die Durchführung meiner wissenschaftlichen Arbeit erst ermöglicht haben.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Frau PD. Dr. med. Irmela Jeremias für die Bereitstellung eines ausgezeichneten Labors am Helmholtz Zentrum München und bei Frau Dr. Michaela Grunert und dem ganzen Team der "Forschungsgruppe Apoptose" für die freundschaftliche Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft. Besonders möchte ich mich bei Tobias Reicherzer für die gute Einarbeitung in die labortechnischen Methoden, die gute, jahrelange Zusammenarbeit und den regen wissenschaftlichen Austausch bedanken. Auch Carla Mehaffey danke ich für ihre freundschaftliche Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Fabian, meinen Eltern und meiner Familie für ihre dauerhafte Unterstützung und Ermutigung während der Studien- und Promotionszeit und darüber hinaus.

### 8.3. Eidesstattliche Versicherung

#### Eidesstattliche Versicherung

Ganss, geb. Häffner, Susanne Christina Maria

Name, Vorname

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

**"Wirkung der pro-inflammatorischen Zytokine auf die mesenchymalen Stromazellen  
aus dem Trachealsekret von extrem kleinen Frühgeborenen"**

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

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

Regensburg, 01.07.2018

Ort, Datum

Susanne Ganss

Unterschrift Doktorandin