

Aus der Abteilung für Experimentelle Gynäkologie und Geburtshilfe
Medizinische Fakultät
Otto-von-Guericke Universität Magdeburg

DISSERTATION

Untersuchung der therapeutischen Effizienz von niedrig dosiertem
Kohlenstoffmonoxid (CO) [einem Hämoxxygenase (HO)-1 Metabolit]
auf den Schwangerschaftsverlauf im Mausmodell

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Tarek El-Mousleh

aus Berlin

Datum der Promotion: 25.10.2013

Inhaltsverzeichnis

1.	Abstract	1
2.	Abstract (Englisch)	2
3.	Einleitung	3
4.	Ziele	4
5.	Material, Methoden	5
5.1	Tierversuche	5
5.2	Verpaarung der Mäuse	5
5.3	Kohlenstoffmonoxid (CO)-Behandlungen und experimentelle Einstellungen: Tiergruppen	5
5.4	Messung von Carboxyhämoglobin (COHb)	6
5.5	Durchflusszytometrie	6
5.6	Histologie, Hämatoxilin-Eosin (HE)-Färbung	7
5.7	Immunhistochemie	7
5.8	Proteinisolation und Western Blot	7
5.9	RNA-Isolation, cDNA Synthese und Real-Time (RT)-PCR	7
5.10	TUNEL	8
5.11	Messung von freiem Häm	8
6.	Ergebnisse, Diskussion	9
6.1	Teilprojekt 1 (Publikation 1)	9
6.1.1	HO-1-protective Effekte können durch seinen Metaboliten Kohlenstoff – monoxid (CO) über exogene Zufuhr in Form von Gas nachgeahmt werden	9
6.1.2	Inhaliertes CO während der Implantation und Plazentation wirkt anti-inflammatorisch	10
6.1.3	Inhaliertes CO verringert die Apoptoserate in der Plazenta und erhöht die Werte des zytoprotektiven Moleküls Bag-1	10
6.1.4	Inhaliertes CO übt eine pro-angiogenetische Wirkung in der Plazenta aus	10
6.1.5	Die Applikation von CO führt zu Reduzierung der C3-Komplement-Deposition	11
6.2	Teilprojekt 2 (Publikation 2)	11
6.2.1	Inhalation von niedrig dosiertem CO schützt Föten aus einer <i>Hmox1</i> ^{+/-} x <i>Hmox1</i> ^{+/-} Verpaarung vor IUGR und fötalem Tod	11
6.3	Teilprojekt 3 (Publikation 3)	12
6.3.1	Hohe Apoptose-Rate im Ovar ist der Grund für die niedrige Anzahl an Corpus Lutea (CL) in <i>Hmox1</i> ^{-/-} Mäusen	12

7	Zusammenfassung	13
8	Literaturverzeichnis	14
9	Anteilerklärung	17
10	Ausgewählte Publikationen	19
11	Lebenslauf	49
12	Komplette Publikationsliste	50
13	Selbständigkeitserklärung	52
14	Danksagung	53

1 Abstract

Intrauterine Wachstumsretardierung (intra uterine growth restriction - IUGR) gehört zu den häufigsten Ursachen für die perinatale Morbidität sowie Mortalität und beeinflusst, sofern das Kind überlebt hat, die Entwicklung nachhaltig. Eine erfolgreiche Schwangerschaft erfordert eine optimal entwickelte Plazenta, um den Embryo mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen. Ist jedoch die Entwicklung der Plazenta gestört, kann es zur einer Wachstumsretardierung und Fehlentwicklung des Fötus kommen. In den vorgelegten veröffentlichten Publikationen konnte mit Hilfe eines Mausmodells gezeigt werden, dass eine partielle Defizienz für Hämoxigenase-1 (*Hmox1^{+/-}*) trägt, dass HO-1 unentbehrlich für die Förderung der Plazentation und die fötale Entwicklung ist. Eine HO-1-Deletion in der Maus führt zu schweren pathologischen Konsequenzen, wie Plazentainsuffizienz, gefolgt von einer intrauterinen Wachstumsretardierung und einer hohen fötalen Letalität. Es konnte gezeigt werden, dass der protektive HO-1-Mechanismus unabhängig vom mütterlichen Immunsystem und von hormonellen Einflüssen agiert. Ferner konnte ermittelt werden, dass HO-1 die Ovulation begünstigt und für die Aufrechterhaltung des *Corpus Luteum* (Gelbkörper) sorgt. Dies deutet daraufhin, dass HO-1 bereits in einem frühen Stadium der Schwangerschaft eine wichtige Funktion besitzt. Es ist bekannt, dass die Metaboliten von HO-1 in einer Vielfalt von pathologischen Modellen protektiv wirken und dass insbesondere Kohlenstoffmonoxid (CO), wenn es in niedriger Konzentration inhaliert wird, die protektiven Effekte von HO-1 nachahmen kann. Aufgrund dieser Kenntnisse, wurde das therapeutische Potential von CO mit Hilfe eines Mausmodells für IUGR erforscht, um diese schwere Form von Schwangerschaftskomplikation zu unterbinden. In diesem Zusammenhang wurden die optimale Dosis und der therapeutische Zeitpunkt von CO etabliert. Es hat sich dabei herausgestellt, dass 50 ppm die optimale Dosis ist, um IUGR und intrauterinen Tod des Fötus zu verhindern, sofern CO zwischen Tag 3 und Tag 8 der Schwangerschaft (während der Implantation und der frühen Plazentation) appliziert wird. Ebenfalls konnte die gleiche Therapie *Hmox1^{+/-}* und *Hmox1^{-/-}* Fötus von *Hmox1^{+/-}* Verpaarungen vor IUGR und intrauterinem Tod schützen. CO bewirkte eine Gewichtszunahme der Plazenten und der Fötus, ohne pathologische Nebeneffekte zu zeigen. CO-Inhalation unterdrückte die inflammatorische Antwort, verringerte die Apoptose sowie die Komplementdeposition und regulierte die Angiogenese in der Plazenta. Unsere Ergebnisse bestätigen die protektive Rolle von HO-1 und CO in der Schwangerschaft und bieten Einblicke in die Mechanismen an. Aus den gewonnenen CO-Daten eröffnen sich vielversprechende Neuerungen im Hinblick auf verbesserte Therapien bei Schwangerschaftskomplikationen.

2 Abstract (English)

One of the leading causes of perinatal morbidity and mortality is intrauterine growth restriction (IUGR). This has further serious consequences as predisposition to lifelong increased risk of hypertension, cardiovascular disorders, renal disease among others. Pregnancy establishment implies the existence of an ideal developed placenta, which ensures the supply of oxygen and nutrients to the fetus. Factors influencing placental vascular development and function have a dramatic impact on fetal growth and development, and by extension on neonatal survival and growth. Using a mouse model which carries a Heme Oxygenase-1 (HO-1) deletion, we could show that HO-1 act as a pivotal factor in supporting placentation and fetal development in our recent publications. Mice deficient in *Hmox1* present aberrant placentation followed by a clear phenotype of IUGR and subsequent intrauterine fetal death. The effects of HO-1 seem to occur independent of the maternal adaptive immune system and hormonal influence. Furthermore we determined that HO-1 plays a significant role in the process of oocyte ovulation as well as fertilization. This shows that HO-1 plays an important function even at the early stage of pregnancy. The salutary effects of HO-1 are most probably mediated by one of the end-products of heme catabolism, namely carbon monoxide (CO). It has been shown that exogenous supply of CO at low concentrations can regulate physiological processes without apparent toxicity and is able indeed to restore the immunoregulatory and cytoprotective effects of HO-1 after its pharmacologically inhibition in a variety of pathologies. Based on these findings we aimed to investigate the therapeutic potential of CO in preventing pregnancy complications. To do so, we established the optimal doses and treatment schedule of using CO via inhalation in a clinically relevant mouse model of IUGR. We could show that the success and effectiveness of the CO therapy are highly dependent on both the dose (50 parts per million) and the time frame of application (between day 3 and day 8 of pregnancy). Likewise the CO therapy prevented IUGR and intrauterine fetal death of *Hmox1*^{+/-} and *Hmox1*^{-/-} fetuses from *Hmox1*^{+/-} mouse breeding. We observed a positive effect on placental and fetal weight without showing any pathological effects. The positive effects of inhaled CO were associated with an anti-inflammatory local immune response, with tissue protection, anti-apoptosis and pro-angiogenesis. We have confirmed the positive effects of HO-1 and CO on pregnancy outcome in an animal model of IUGR. We have shown that the effectiveness of CO-gas therapy depends on the careful selection of the dose and time frame to be applied. This is of extreme importance for the putative design of clinical trials.

3 Einleitung

Kommt es zum Verlust eines Fötus, erfolgt dies in den meisten Fällen während der frühen Schwangerschaft (1, 2). In dieser frühen Phase finden kritische Ereignisse, wie die Entwicklung der Plazenta (Plazentation) und Embryogenese, statt (3, 4). Die Plazenta ist ein einzigartiges Organ, es versorgt das Ungeborene mit Sauerstoff und Nährstoffen. Weiterhin schützt die Plazenta den Fötus vor schädlichen Stoffen und Einflüssen, entsorgt seine Stoffwechselprodukte und produziert Hormone, die für den Erhalt der Schwangerschaft sorgen (5). Die Plazenta stellt somit das Leben eines Fötus sicher. Im Falle des Auftretens einer Plazentainsuffizienz kommt es zu einer Minderversorgung des Fötus, welches sich in einer intrauterinen Wachstumsretardierung (IUGR) und im schlimmsten Fall mit dem Tod des Fötus äußern kann (6). Eine spezifische Therapie der IUGR steht derzeit nicht zur Verfügung. Während der Schwangerschaft beim Menschen und bei Nagetieren wurden sehr hohe Pegel an Hämoxigenase-1 (HO-1) in Trophoblastzellen nachgewiesen (7 - 9). HO-1 ist ein Enzym, das Häm zu Eisen, Biliverdin und Kohlenstoffmonoxid oxidiert und abbaut (10). Es kommt in Säugetieren in den Mikrosomen der Zellen vor. Arbeiten unserer Gruppe konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass hohe Abortraten mit einer niedrigen HO-1- und HO-2-Expression assoziiert waren (11, 12). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu einer normalen Mausschwangerschaft (CBA/J-Weibchen verpaart mit BALB/c-Männchen), die CBA/J-Weibchen geringere HO-1- und HO-2-Proteinexpression in der Plazenta aufweisen, wenn sie mit DBA/2J-Männchen (IUGR-Modell) verpaart wurden (12). Ähnliches wurde bei schwangeren Frauen beobachtet, die unter einer spontanen Fehlgeburt gelitten haben oder die Präeklampsie aufwiesen (9). In Patienten mit IUGR wurden ebenfalls reduzierte HO-1-Expressionen an der föto-maternalen Grenzfläche entdeckt (13). Interessanterweise konnte in verschiedenen Modellen festgestellt werden, dass die Zufuhr von exogenem Kohlenstoffmonoxid (CO), einem HO-1 Metabolit, die immunregulatorischen und zytoprotektiven Effekte von HO-1 vollständig ersetzen kann, wenn die enzymatische Aktivität von HO-1 gleichzeitig inhibiert wird (14 - 16). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die HO-1 protektiven Effekte zum großen Teil von seinem Gasotransmitter CO vermittelt werden. Zusammenfassend ist davon auszugehen, dass das Molekül HO-1 und sein Metabolit CO, eine entscheidende Rolle für den erfolgreichen Verlauf der Schwangerschaft spielen.

4 Ziele

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, zu untersuchen inwieweit der HO-1 Metabolit Kohlenstoffmonoxid die protektive Eigenschaft von HO-1 in einer Maus-Schwangerschaft nachahmen kann.

Dafür sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- 1) Kann der protektive Effekt von HO-1 durch seinen Metaboliten CO über exogene Zufuhr in Form von Gas nachgeahmt werden?
- 2) Kann CO-Inhalation, Föten aus einer *Hmox1*^{+/-} x *Hmox1*^{+/-} Verpaarung vor IUGR und fötalem Tod schützen?
- 3) Inwieweit spielt HO-1 im frühen Stadium der Schwangerschaft eine Rolle?

5 Material und Methoden

5.1 Tierversuche

Hmox1-kompetente oder -defiziente Mäuse (17) wurden von Dr. Saw Feng-Yet zur Verfügung gestellt (BALB/c Hintergrund) und in unseren Räumlichkeiten als Zuchtkolonie erhalten. CBA/J-, DBA/2J- und BALB/c-Mäuse stammten von Charles River. Die Haltung der Tiere erfolgte artgerecht mit einem 12-stündigen Licht-/Dunkelrhythmus in unseren Tiereinrichtungen in Berlin und Magdeburg mit Wasser und Nahrung *ad libitum*. Experimentelle Versuche an den Tieren entsprachen den Institutsrichtlinien gemäß den Anforderungen der leitenden staatlichen Behörden in Berlin und Magdeburg (LaGeSo Berlin 0062/03 und Sachsen- Anhalt Ministerium 2-868). (siehe Publikationen 1 und 2).

5.2 Verpaarungen der Mäuse

Hmox1^{+/-} Weibchen wurden mit *Hmox1*^{+/-} Männchen verpaart. Weiterhin wurden zwei Monate alte weibliche CBA/J Mäuse mit zwei bis vier Monate alten männlichen DBA/2J- (UGR Gruppe) bzw. BALB/c- (Gruppe der normalen Schwangerschaft) Mäusen verpaart. Zweimal täglich wurden die weiblichen Mäuse auf einen vaginalen Pfropfen (Inseminationsfleck) hin untersucht. Das Auftreten dieses Merkmals wurde als Tag 0 der Schwangerschaft angesehen. Die Weibchen wurden daraufhin von den Männchen getrennt. Die Implantationsrate sowie die Anzahl der toten Föten wurden am Tag 14 der Schwangerschaft analysiert. Föten und Plazenten wurden frei präpariert und gewogen. (siehe Publikationen 1 und 2).

5.3 Kohlenstoffmonoxid (CO)-Behandlungen und experimentelle Einstellungen:

Tiergruppen

Die Mäuse in ihren Käfigen wurden in 98-Liter große Plexiglaskammern gesetzt und mit CO oder gemischter Luft (Kontrolle) behandelt. Die Expositionskonzentration und Expositionsdauer sind in Tabelle 1 dargestellt. Die CO-Durchflussmenge wurde kontinuierlich bei einer Rate von 12 L/min. gehalten. Die Konzentration von 5 % CO in Luft (20,9 %) wurde mit Druckluft gemischt, um die finale Konzentration von 50 oder 125 parts per million (ppm) in den Zielkammern zu erreichen. Kontrolltiere wurden lediglich mit Luft behandelt. (siehe Publikationen 1 und 2).

Konzentration in ppm	Kontinuierliche Expositionsdauer	Trächtige Mäuse	Tag der Präparation
125	3-5	CBA/J	14
50	3-5	CBA/J	14
50	3-8	CBA/J, <i>Hmox1</i> ^{+/-}	14
50	3-8	CBA/J	8
50	5-8	CBA/J	14

Tab. 1 Expositionskonzentration und Expositionsdauer von CO.

CBA/J Weibchen wurden mit DBA/2J Männchen (IUGR Gruppe) verpaart. Anschließend wurden schwangere CBA/J Mäuse mit 125 ppm oder 50 ppm CO zwischen Tag 3 und Tag 5 oder zwischen Tag 3 und Tag 8 behandelt. Eine weitere Gruppe wurde zwischen Tag 5 und Tag 8 der Schwangerschaft mit 50 ppm behandelt. Die Präparation erfolgte an Tag 8 oder Tag 14 der Schwangerschaft. Schwangere CBA/J Weibchen verpaart mit BALB/c Männchen (normale Schwangerschaft), wurden mit 50 ppm CO zwischen Tag 3 und Tag 8 der Schwangerschaft behandelt. Die Präparation erfolgte an Tag 14 der Schwangerschaft. *Hmox1*^{+/-} Weibchen wurden mit *Hmox1*^{+/-} Männchen verpaart und mit 50 ppm zwischen Tag 3 und Tag 8 der Schwangerschaft behandelt. Die Tötung der Tiere erfolgte an Tag 14 der Schwangerschaft. Kontrolltiere wurden mit Luft behandelt.

5.4 Messung von Carboxyhämoglobin (COHb)

Blut von anästhesierten Mäusen wurde durch Herzpunktion entnommen. Die Werte von COHb und total Hämoglobin (tHb) wurden oxymetrisch durch ein Blutgasanalysegerät ermittelt. (siehe Publikationen 1 und 2).

5.5 Durchflusszytometrie

Für die Stimulation der Zytokin-Sekretion wurden Zellen aus der Milz, den Lymphknoten sowie der Dezidua isoliert und für eine Stunde mit 50 ng/ml PMA und 1 µg/ml Ionomycin bei 37 °C inkubiert. Für die intrazelluläre Akkumulation der Proteine wurde 2 µM Monensin hinzugefügt und für weitere 3 Stunden inkubiert. Die Zellen wurde daraufhin mit 1 % PFA über Nacht bei 4 °C fixiert und schließlich in FACS-Puffer resuspendiert. Nicht stimulierte Zellen wurden für die Detektion der extrazellulären Proteine verwendet. (siehe Publikation 1).

5.6 Histologie, Hämatoxin-Eosin (HE)-Färbung

Entparaffiniertes Plazentagewebe wurde für 2 Min. mit Hämatoxin und anschließend 5 Min. mit Eosin gefärbt. Daraufhin erfolgte eine konsekutive Waschreihe mit Ethanol (75 %, 95 % und 100 %). Zum Abschluss wurden die Proben in Xylol entwässert (2 x 5 Min.) und mit Roti-Histokit fixiert. (siehe Publikationen 1, 2 und 3).

5.7 Immunhistochemie

Zur Visualisierung von VEGF oder HO-1-Proteinen, wurde entparaffiniertes Plazentagewebe verwendet. Für die Detektion von C3-Komplement wurde eingefrorenes Plazentagewebe eingebettet in Kryoschnitte herangezogen. Um die Aktivität der endogenen Peroxidase zu unterdrücken, wurden die Schnitte mit 3 % H₂O₂ behandelt. Um unspezifische Proteinbindungen zu verhindern, wurden die Proben mit 5 % BSA in TBS inkubiert. Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper, wurden die Proben mit dem Substrat 3-Amino-9-Ethylcarbazole (AEC) entwickelt und anschließend mit Hämalaun gegengefärbt und mit Aquatex fixiert. (siehe Publikationen 1 und 2).

5.8 Proteinisolation und Western Blot

Gefrorene Plazentagewebestücke wurden in Lysis-Puffer homogenisiert und zentrifugiert. Der Überstand (Proteine) wurde in ein neues Röhrchen überführt. Die Proteinkonzentration, wurde mittels BCA Protein Assay ermittelt. Für die Elektrophorese wurden 20 µg (Bag-1, sEng, sFlt-1) oder 50 µg (VEGF) Protein auf ein 8 % (s-Flt-1), 10 % (Bag-1, sEng) oder 15 % (VEGF) Polyacrylamid-Gel mit denaturisierenden Konditionen eingesetzt. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert. Sekundäre Antikörper waren entweder direkt gekoppelt mit HRP oder biotinyliert. GAPDH oder β-Actin wurden als House-Keeping-Gen benutzt. Die Entwicklung der Chemilumineszenzsignale wurde mit einem hauseigenen ECL-Reagenz generiert. Die Quantifizierung der Bilder wurde mittels der GeneSnap Software von Syngene ermittelt. (siehe Publikation 1).

5.9 RNA-Isolation, cDNA Synthese und Real-Time (RT)-PCR

RNA aus gefrorenem Plazentagewebe wurde nach der klassischen Phenol/Chloroform-Methode extrahiert. Die RNA-Proben wurden weiterhin mittels der *reversen Transkriptase* (Moloney-Maus-Leukämie-Virus Reverse Transkriptase, MMLV-RT) in cDNA umgeschrieben und anschließend bei -20 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Für Bag-1, Bcl, Bclxl, Bax, wurde die RT-PCR mittels der TaqMan®-Technologie durchgeführt. RT-PCR mittels der SYBR® Green-Technologie wurde eingesetzt um VEGF, PGF, SDF-1α und

HIF-1 α zu amplifizieren. Sowohl TaqMan® als auch SYBR® Green wurden am i-Cycler durchgeführt. β -Actin wurde als House-Keeping-Gen eingesetzt. Die Menge an RNA wurde in beiden Fällen als $2^{-\Delta C_t}$ kalkuliert. (siehe Publikation 1).

5.10 TUNEL

Die TUNEL-Methode (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) dient der Darstellung von Zellkernen apoptotischer Zellen. Plazentaprobe, eingebettet in Paraffin, wurden verwendet, um die apoptotischen Zellkerne zu visualisieren. Die Analyse fand unter einem Lichtmikroskop durch zwei unabhängige Beobachter ohne Kenntnis der Probe statt. (siehe Publikationen 1 und 3).

5.11 Messung von freiem Häm

Freies Häm wurde in Plasmaproben untersucht. Das Blut wurde durch Herzpunktion entnommen, in heparinisierte Röhrchen gefüllt und zentrifugiert. Die Quantifizierung von freiem Häm wurde entsprechend der Herstellerangaben vollzogen. (siehe Publikation 2).

6 Ergebnisse, Diskussion

6.1 Teilprojekt 1 (Publikation 1)

6.1.1 HO-1-protective Effekte können durch seinen Metaboliten Kohlenstoffmonoxid (CO) über exogene Zufuhr in Form von Gas nachgeahmt werden

Da HO-1 essentiell für die Plazentation ist (18) und Beobachtungen vermuten lassen, dass die HO-1-protectiven Effekte zum großen Teil von seinem Metabolit CO vermittelt werden, war es das Ziel, das therapeutische Potential von CO in der Maus-Schwangerschaft zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden der Zeitpunkt und die optimale Dosis ermittelt, um den schwangeren Mäusen CO via Inhalation zu applizieren. Für dieses Anliegen haben wir das CBA/J x DBA/2J Mausmodell ausgewählt, das ein klinisch relevantes Modell für IUGR und spontane Fehlgeburten darstellt (19). Als Kontrolle haben trächtige Mäuse normale Luft geatmet. Das CBA/J x BALB/c Modell (normale Schwangerschaft) diente als Vergleichskombination und wurde ebenso mit CO oder Luft behandelt. Die Tötung der Mäuse erfolgte an Tag 14 der Schwangerschaft. Die Behandlung während der Implantation (Tag 3 bis Tag 5 der Schwangerschaft) mit 125 ppm CO war nur teilweise protektiv und die Applikation von 50 ppm CO zeigte keine Wirkung in der gleichen Behandlungszeit. Wurde jedoch 50 ppm CO für eine längere Expositionszeit, nämlich während der Implantation und der frühen Plazentation (Tag 3 bis Tag 8 der Schwangerschaft) eingesetzt, konnte CO in niedriger Konzentration vor IUGR und fötalem Tod schützen. Die Applikation mit CO führte im Vergleich zu luftbehandelten schwangeren Mäusen zu keiner Veränderung in den Werten wie Carboxyhämoglobin (COHb) sowie total Hämoglobin (tHb). Die Behandlung mit 50 ppm CO führte interessanterweise dazu, dass die Gewichte der Föten und Plazenten im Vergleich zu luftbehandelten Mäusen erhöht waren. Weiterhin konnten wir auch direkt nach der Behandlung (Tag 8 der Schwangerschaft) mit 50 ppm CO keine erhöhten Werte von COHb oder tHb feststellen, welches sicherstellt, dass es während der Behandlung mit CO nicht zu einer Intoxikation gekommen ist. Zusammenfassend schützt die Gabe von 125 ppm CO während der Embryoimplantation zwar vor dem fötalen Tod, zeigte jedoch unerwünschte Nebeneffekte. Geringere Mengen an CO (50 ppm) in der gleichen Applikationszeit zeigten immerhin keine toxischen Nebeneffekte gegenüber dem Fötus, waren aber nicht effizient genug, um den intrauterinen Tod des Föten komplett zu unterbinden. Wurde allerdings die niedrige Konzentration an CO (50 ppm) für einen längeren Zeitraum appliziert (während der Implantation und frühen Plazentation), war CO in der Lage den Fötus effektiv und ohne unerwünschte Nebeneffekte vor dem intrauterinen Tod zu schützen. Interessanterweise

konnten weitere Experimente zeigen, dass wenn CO während der Plazentation (Tag 5 bis Tag 8 der Schwangerschaft) verabreicht wurde, es auch vor IUGR und fötalem Tod schützen konnte. Daraus lässt sich schließen, dass der Erfolg und der Wirkungsgrad der Therapie mit CO strikt von der zu applizierenden Dosis sowie vom Zeitfenster der Applikation abhängig sind.

6.1.2 Inhaliertes CO während der Implantation und Plazentation wirkt anti-inflammatorisch

Es ist bekannt, dass Th1- und Th17-Zytokine mit Schwangerschaftskomplikationen assoziiert sind (20, 21), während Th2-Zytokine in der Schwangerschaft protektiv wirken (22). Immunzellen aus der Milz und der Dezidua sekretierten weniger IFN- γ in trächtigen Mäusen, die mit CO behandelt worden sind, als die mit Luft behandelten. CO konnte auch die Sekretion von IL-17 in Zellen aus der Dezidua, der Milz und den Beckenlymphknoten signifikant vermindern. Ebenfalls konnte CO den Gehalt an CD4⁺CD69⁺ aktivierten T-Zellen verringern, während es die Frequenz der CD4⁺FoxP3⁺ regulatorischen Zellen erhöhte. Diese Daten deuten darauf hin, dass der positive Effekt von CO auf das Überleben des Föten durch eine Verlagerung der Immunantwort zu einem nicht inflammatorischen, protektiven Kurs verknüpft ist.

6.1.3 Inhaliertes CO verringert die Apoptoserate in der Plazenta und erhöht die Werte des zytoprotektiven Moleküls Bag-1

Plazentaprobe aus Tag 14 der Schwangerschaft wurden mittels der TUNEL-Methode auf apoptotische Zellen untersucht. Im Vergleich zu luftbehandelten Mäusen offenbarte die TUNEL-Analyse eine signifikante Reduzierung an apoptotische Zellen in der CO-behandelten Gruppe. Wir konnten weiterhin feststellen, dass das gewebeschützende Bag-1 Molekül nach der Behandlung mit CO signifikant hochreguliert war (Protein und mRNA-Ebene). Demzufolge unterstützt CO die Plazentaentwicklung, indem es Apoptose inhibiert und die Expression des gewebeschützenden Moleküls Bag-1 steigert.

6.1.4 Inhaliertes CO übt eine pro-angiogenetische Wirkung in der Plazenta aus

Aufgrund der bekannten Wirkung von CO auf die Angiogenese in vielen Modellen, untersuchten wir den Effekt von CO *in vivo* in Trophoblast-Zellen. CO-Inhalation bewirkte eine signifikante Erhöhung des pro-angiogenetischen Moleküls vascular endothelial growth factor (VEGF) auf Protein- und mRNA- Ebene in der Plazenta. Im Vergleich zu luftbehandelten Mäusen zeigte die Inhalation von CO in der Immunhistochemie auch eine

starke Zellfärbung von VEGF. Plazentation und Embryoentwicklung finden vorwiegend in hypoxischer Umgebung statt. Dabei ist hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) ein wichtiger Marker in diesem Prozess. Unter anderem ist HIF-1 α ein Transkriptionsfaktor und ein primärer Regulator für die VEGF-Induktion. Wir beobachteten eine Hochregulierung des HIF-1 α Moleküls, ein Effekt der durch die Inhalation von CO reguliert wird, aber nicht von Luft. Es ist davon auszugehen, dass die transient erniedrigten O₂-Werte, die für die Embryoimplantation und Plazentation wichtig sind, HIF-1 α hochreguliert und dabei die Expression der zytoprotektiven Moleküle anregt und so den Embryo vor oxidativem Stress schützt. Ebenfalls erhöhte CO signifikant die pro-angiogenetischen Moleküle stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α) und placental growth factor (PGF) auf mRNA-Ebene. Darüber hinaus führte die Inhalation mit CO zur deutlichen Verringerung der anti-angiogenetischen Moleküle, wie soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) und soluble endoglin (sEng). Demzufolge übt CO eine pro-angiogenetische Wirkung in der Plazenta aus, was dazu beiträgt, eine vitale Plazentaentwicklung zu unterstützen.

6.1.5 Die Applikation von CO führt zu Reduzierung der C3-Komplement-Deposition

Im CBA/J x DBA/2J, ein Modell für IUGR, ist das C3-Komplement ein bekanntes Molekül, welches für die gestörte Plazentation und die daraus resultierende fötale Schädigung verantwortlich ist (19). C3-Komplementaktivierung führt auch zur Deregulierung der angiogenetischen Moleküle, die für eine normale Schwangerschaft benötigt werden. Die Intensitäten der C3-Färbung in Plazenten von CO-behandelten Mäusen waren signifikant geringer als die in Plazenten von luftbehandelten Mäusen. CO scheint demnach einen Einfluss auf die Ablagerung von C3 in der Plazenta auszuüben, indem es die komplementabhängige Zytotoxizität vom C3-Komplement inhibiert. Das Gas schützt so vor vaskulären Verletzungen, normalisiert die Plazentahistologie und sichert eine vitale Schwangerschaft.

6.2 Teilprojekt 2 (Publikation 2)

6.2.1 Inhalation von niedrig dosiertem CO schützt Föten aus einer *Hmox1*^{+/-} x *Hmox1*^{+/-} Verpaarung vor IUGR und fötalem Tod

Da CO die protektiven Effekte von HO-1 in einem Mausmodell für IUGR nachahmen konnte (23), testeten wir den Effekt von inhaliertem CO auf Mäuse, die partiell defizient für HO-1 (*Hmox1*^{+/-}) sind. Mäuse inhalierten 50 ppm CO zwischen Tag 3 und Tag 8 der Schwangerschaft (während der Implantation und frühen Plazentation). Im Vergleich zu luftbehandelten Mäusen senkte CO signifikant die Rate an fötalem Tod in *Hmox1*^{+/-} x *Hmox1*^{+/-} Verpaarungen und erhöhte die Gewichte der Föten sowie der Plazenten. CO

beeinflusste nicht die Implantationsrate, jedoch führte die Applikation von CO in einer höheren Anzahl an lebensfähigen *Hmox1*^{-/-} Föten verglichen mit luftbehandelten Mäusen aus der *Hmox1*^{+/-} x *Hmox1*^{+/-} Verpaarung. Weiterhin reduzierte die Behandlung mit CO die Mortalitätsrate von *Hmox1*^{+/+} und *Hmox1*^{+/-} Föten. Die Behandlung mit CO führte zu einer signifikant höheren Anzahl an Trophoblast-Riesenzellen und geringerer Fibrose in *Hmox1*^{+/-} und *Hmox1*^{-/-} Plazenten. Dies bestätigt, dass die protektiven Effekte von HO-1 seinem Metaboliten CO zuzuordnen sind. Weiterhin eröffnet diese Erkenntnis die Möglichkeit, CO therapeutisch einzusetzen, um Schwangerschaftskomplikationen die beispielsweise mit *Hmox1* Polymorphismen assoziiert sind oder mit IUGR einschließlich niedrigem HO-1 Pegel, zu unterbinden.

6.3 Teilprojekt 3 (Publikation 3)

6.3.1 Hohe Apoptose-Rate im Ovar ist der Grund für die niedrige Anzahl an Corpus Lutea (CL) in *Hmox1*^{-/-} Mäusen

In diesem Teil der Arbeit haben wir entdeckt, dass HO-1 bereits in frühen Stadien der Maus-Schwangerschaft hinsichtlich der Ovulation und Fertilisation eine wichtige Rolle spielt (24). *Hmox1*^{-/-} Mäuse produzierten signifikant weniger Oozyten als *Hmox1*^{+/+} Mäuse, die jeweils eine hormonelle Stimulation erfahren haben. Es war daher zu klären, ob eine nicht kontrollierte Apoptose eine mögliche Ursache für die niedrige Anzahl an Oozyten in *Hmox1*^{-/-} Mäusen wäre. CL produzieren Hormone, die bedeutend für eine Vorbereitung des Uterus auf eine mögliche Implantation des Embryos sind. Nichtfunktionale oder niedrige Anzahl an CL kann ein Grund für die geringe Fertilisationsrate sein. Apoptose spielt eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Lebensdauer der CL. Da HO-1 unter anderem auch eine anti-apoptotische Eigenschaft besitzt, liegt es nah, dass HO-1 einen Einfluss auf das Überleben der CL hat. Die Anzahl der apoptotischen Zellen in *Hmox1*^{+/+} - oder *Hmox1*^{-/-} - Mäusen wurde durch die TUNEL-Methode ermittelt. Im Vergleich zu *Hmox1*^{+/+} Mäusen zeigten Ovarien von *Hmox1*^{-/-} Mäuse signifikant höhere Apoptoseraten, insbesondere in CL. Demnach erklärt die hohe Apoptoserate in *Hmox1*^{-/-} Tieren das marginale reproduktive Ergebnis.

7 Zusammenfassung

Eine Schwangerschaftskomplikation wie die intrauterine Wachstumsretardierung (IUGR), gehört zu den häufigsten Ursachen für die perinatale Mortalität und Morbidität. IUGR beeinflusst, sofern das Kind überlebt hat, die Entwicklung nachhaltig (25, 26). Da eine spezifische Therapie der IUGR derzeit nicht zur Verfügung steht, ist es von zentraler Bedeutung ein Lösungskonzept zu finden, um diese schwere Form von Schwangerschaftskomplikation zu vermeiden oder zu vermindern. Hämoxxygenase-1 (HO-1) ist ein Enzym, das Häm zu Eisen, Biliverdin und Kohlenstoffmonoxid oxidiert und abbaut (10). Es kommt in Säugetieren in den Mikrosomen der Zellen vor. Im Verlauf der Human-, Ratten- und Maus-Schwangerschaft findet eine hohe Expression an HO-1 speziell in Trophoblast-Zellen statt, während Fehlgeburten und Prä-eklampsie mit geringen Expressionen an HO-1 in der Plazenta assoziiert wurden (7 - 9). In IUGR Schwangerschaftskomplikationen wurden ebenfalls reduzierte HO-1-Expressionen an der föto-maternalen Grenzfläche entdeckt (13). Aufgrund unserer Entdeckungen lässt sich zusammenfassend aussagen, dass HO-1 eine zentrale Rolle in der Reproduktion spielt, welches die Plazentation und infolgedessen fötales Wachstum und Entwicklung sicherstellt. HO-1 zeichnet sich als protektives Gen aus, das Zell- und Gewebeschädigungen verhindert und so eine vitale Schwangerschaft gewährleistet. Im Übrigen begünstigt HO-1 auch die Ovulation und sorgt für die Aufrechterhaltung des *Corpus Luteum* (Gelbkörper), welches für die rechtzeitige Embryoimplantation und für eine vitale Plazentation sorgt. Dies deutet daraufhin, dass HO-1 bereits in einem frühen Stadium der Schwangerschaft eine wichtige Funktion besitzt. Es hat sich herauskristallisiert, dass CO, ein Stoffwechselprodukt von HO-1, leitend für die protektiven Effekte ist. Unsere Ergebnisse mit dem Versuch, CO als Gas-Therapie in einem klinisch relevanten IUGR-Mausmodell einzusetzen, waren sehr erfolgreich. Ferner schützt die Inhalation von niedrig dosiertem CO, Föten aus einer *Hmox1*^{+/-} x *Hmox1*^{+/-} Verpaarung vor IUGR und fötalem Tod. Wir konnten zeigen, dass die Effektivität der CO-Gas-Therapie von der Dosis und vom Zeitraum der Applikation abhängig ist. Diese Parameter sind für einen Entwurf klinischer Studien von elementarer Bedeutung. Die erfolgreichen Schwangerschaften waren hervorgehoben durch die Zunahme der Gewichte von Plazenten sowie der Föten und die Prävention von fötalem Tod. Diese positiven Effekte wurden von einer anti-inflammatorischen Immunantwort, dem Schutz vor Gewebeschädigung sowie anti-Apoptose und pro-angiogenetischen Effekten begleitet. Aus den gewonnenen CO-Daten eröffnen sich vielversprechende Möglichkeiten und Neuerungen im Hinblick auf verbesserte Therapien bei Schwangerschaftskomplikationen.

8 Literaturverzeichnis

- 1) Edwards RG: Causes of early embryonic loss in human pregnancy. *Hum Reprod* 1986, 1:185-98
- 2) Goldstein SR: Embryonic death in early pregnancy: a new look at the first trimester. *Obstet Gynecol* 1994, 84:294-7.
- 3) Cross JC, Werb Z, Fisher SJ: Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science* 1994, 266:1508-18.
- 4) Reynolds LP, Redmer DA: Utero-placental vascular development and placental function. *J Anim Sci* 1995, 73:1839-1851.
- 5) Pillitteri, A: Maternal and Child Health Nursing (6th Edition [Philippine Edition]): *Lippincott Williams & Wilkins* 2010
- 6) Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A: Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996, 380:435-9.
- 7) Ihara N: Developmental changes of gene expression in heme metabolic enzymes in rat placenta. *FEBS Lett* 1998, 439:163–167.
- 8) Barber A, Robson S.C, Myatt L, Bulmer J, Lyall F: Heme Oxygenase Expression in Human Placenta and Placental Bed: Reduced Expression of Placenta Endothelial HO-2 in Pre-Eclampsia and Fetal Growth Restriction. *FASEB J* 2001, 15:1158-1168.
- 9) Zenclussen AC, Lim E, Knoeller S, Knackstedt M, Hertwig K, Hagen E, Klapp BF, Arck PC: Heme Oxygenases in Pregnancy II: HO-2 Is Downregulated in Human Pathologic Pregnancies. *Am. J. Reprod. Immunol* 2003, 50:66-76
- 10) Tenhunen R, Marver H.S, Schmid R: The Enzymatic Conversion of Heme to Bilirubin by Microsomal Heme Oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1968, 61: 748-755
- 11) Zenclussen AC, Joachim R, Hagen E, Klapp B, Arck P: Low levels of Decidual heme Oxygenase in stress-triggered Th1-mediated murine abortion. *Scand J Immunol* 2002, 6:555-560.
- 12) Zenclussen AC, Sollwedel A, Zambon Bertoja A, Gerlof K, Zenclussen ML, Woiciechowsky C, Volk HD: Heme Oxygenase as a therapeutic target in immunological pregnancy complications. *Int Immunopharmacol* 2005a.
- 13) Ahmed A, Rahman M, Zhang X, Acevedo CH, Nijjar S, Rushton I, Bussolati B, St John J: Induction of placental heme oxygenase-1 is protective against TNFalpha-induced cytotoxicity and promotes vessel relaxation. *Mol Med* 2000, 6:391-409.

- 14) Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, Davis RJ, Flavell RA, Choi AM: Carbon Monoxide Has Anti-Inflammatory Effects Involving the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. *Nat. Med* 2000, 6:422-428.
- 15) Brouard S, Otterbein LE, Anrather J, Tobiasch E, Bach FH, Choi AM, Soares MP: Carbon Monoxide Generated by Heme Oxygenase 1 Suppresses Endothelial Cell Apoptosis. *J. Exp. Med* 2000, 192:1015-1026.
- 16) Lee T.S, Chau L.Y. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nat Med* 2002, 8:240-246.
- 17) Yet SF, Perrella MA, Layne MD, Hsieh CM, Maemura K, Kobzik L, Wiesel P, Christou H, Kourembanas S, Lee ME: Hypoxia induces severe right ventricular dilation and infarction in heme oxygenase-1 null mice. *J Clin Invest* 1999, 103:R23-9.
- 18) Zenclussen ML, Casalis PA, El-Mousleh T, Rebelo S, Langwisch S, Linzke N, Volk HD, Fest S, Soares MP, Zenclussen AC: Haem oxygenase-1 dictates intrauterine fetal survival in mice via carbon monoxide. *J Pathol* 2011, 225:293-304.
- 19) Girardi G, Yarilin D, Thurman JM, Holers VM, Salmon JE: Complement activation induces dysregulation of angiogenic factors and causes fetal rejection and growth restriction. *J Exp Med* 2006, 203:2165-75.
- 20) Zenclussen AC, Gerlof K, Zenclussen ML, Sollwedel A, Bertoja AZ, Ritter T, Kotsch K, Leber J, Volk HD: Abnormal T-cell reactivity against paternal antigens in spontaneous abortion: adoptive transfer of pregnancy-induced CD4+CD25+ T regulatory cells prevents fetal rejection in a murine abortion model. *Am J Pathol* 2005, 166:811-22.
- 21) Mjösberg J, Berg G, Jenmalm MC, Ernerudh J: FOXP3+ regulatory T cells and T helper 1, T helper 2, and T helper 17 cells in human early pregnancy decidua. *Biol Reprod* 2010, 82:698-705.
- 22) Piccinni MP, Beloni L, Livi C, Maggi E, Scarselli G, Romagnani S: Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. *Nat Med* 1998, 4:1020-4.
- 23) El-Mousleh T, Casalis PA, Wollenberg I, Zenclussen ML, Volk HD, Langwisch S, Jensen F, Zenclussen AC: Exploring the potential of low doses carbon monoxide as therapy in pregnancy complications. *Med Gas Res* 2012, 20;2:4.
- 24) Zenclussen ML, Jensen F, Rebelo S, El-Mousleh T, Casalis PA, Zenclussen AC: Heme oxygenase-1 expression in the ovary dictates a proper oocyte ovulation, fertilization, and corpora lutea maintenance. *Am J Reprod Immunol* 2012, 67:376-82.

- 25) Kaufman P, Black S, Huppertz B: Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod* 2003, 69:1-7.
- 26) Ounsted M, Moar V, Scott WA: Perinatal morbidity and mortality in small-for-dates babies: the relative importance of some maternal factors. *Early Hum Dev* 1981, 5:367-375.

9 Anteilserklärung

Herr Tarek El-Mousleh hat seine experimentelle kumulative Doktorarbeit mit dem Thema „Untersuchung der therapeutischen Effizienz vom niedrig dosierten Kohlenstoffmonoxid (CO) [einem Hämoxygenase (HO)-1 Metabolit] auf den Schwangerschaftsverlauf im Mausmodell“ angefertigt. Grundlage für die kumulative Promotion sind folgende drei Publikationen:

Publikation 1

El-Mousleh T, Casalis PA, Wollenberg I, Zenclussen ML, Volk HD, Langwisch S, Jensen F, Zenclussen AC. Exploring the potential of low doses carbon monoxide as therapy in pregnancy complications. Medical Gas Research, 2012

Beitrag: 90% Prozent.

Herr El-Mousleh war für die Durchführung der praktischen Experimente dieser Publikation überwiegend selbständig verantwortlich. Die Analysen führte er vollständig unabhängig durch. Ferner trug er zur Manuskripterstellung bei.

Publikation 2

Zenclussen ML, Casalis PA, **El-Mousleh T**, Rebelo S, Langwisch S, Linzke N, Volk HD, Fest S, Soares MP, Zenclussen AC. Haem oxygenase-1 dictates intrauterine fetal survival in mice via carbon monoxide. J Pathol, 2011.

Beitrag: 30% Prozent.

Herr El-Mousleh trug wichtige Experimente zur Publikation bei.

- 1) Durchführung von *in vivo* Mausexperimente mit CO sowie Analyse der Ergebnisse
- 2) Ermittlung der Gewichte von Föten und Plazenten von verschiedenen HO-1 Genotypen aus der *Hmox1*^{+/-} x *Hmox1*^{+/-} Verpaarungen
- 3) Generierung der Daten von freien Häm

Weiterhin beteiligte sich Herr El-Mousleh an der Diskussion zur Entstehung des Manuskriptes.

Publikation 3

Zenclussen ML, Jensen F, Rebelo S, **El-Mousleh T**, Casalis PA, Zenclussen AC], [Heme Oxygenase-1 Expression in the Ovary Dictates a Proper Oocyte Ovulation, Fertilization, and Corpora Lutea Maintenance. Am J Reprod Immunol, 2012.

Beitrag: 15% Prozent

Herr El-Mousleh trug ein wichtiges Experiment zur Publikation bei.

- 1) Messung der apoptotischen Zellen im Ovar von *Hmox1*^{+/+} und *Hmox1*^{-/-} Mäusen mit Hilfe von TUNEL

Weiterhin beteiligte sich Herr El-Mousleh an der Diskussion bei der Entstehung des Manuskriptes.

10 Ausgewählte Publikationen

Die Seiten 20 bis 48 umfassen folgende Originalartikel:

Publikation 1

El-Mouseh T, Casalis PA, Wollenberg I, Zenclussen ML, Volk HD, Langwisch S, Jensen F, Zenclussen AC. Exploring the potential of low doses carbon monoxide as therapy in pregnancy complications. *Med Gas Res* 2012, 20;2:4.

Journal Impact Factor: Noch nicht bekannt

Publikation 2

Zenclussen ML, Casalis PA, **El-Mouseh T**, Rebelo S, Langwisch S, Linzke N, Volk HD, Fest S, Soares MP, Zenclussen AC. Haem oxygenase-1 dictates intrauterine fetal survival in mice via carbon monoxide. *J Pathol* 2011, 225:293-304.

Journal Impact Factor: 6,32

Publikation 3

Zenclussen ML, Jensen F, Rebelo S, **El-Mouseh T**, Casalis PA, Zenclussen AC], [Heme Oxygenase-1 Expression in the Ovary Dictates a Proper Oocyte Ovulation, Fertilization, and Corpora Lutea Maintenance. *Am J Reprod Immunol* 2012, 67:376-82.

Journal Impact Factor: 3,05

11 Lebenslauf

„Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.“

12 Komplette Publikationsliste:

Schumacher A, Wafula PO, Teles A, **El-Mouseh T**, Brachwitz N, Zenclussen ML, Langwisch S, Wollenberg I, Casalis PA, Volk HD, Fest S, Zenclussen AC. HO-1 blockage abrogates the protective effect of regulatory T cells on murine pregnancy outcome by turning dendritic cells into mature antigen presenting cells. *PLoS ONE* 2012, 7.

Jensen F, Wallukat G, Herse F, Budner O, **El-Mouseh T**, Costa SD, Dechend R, Zenclussen AC: CD19⁺CD5⁺ cells as indicators of pre-eclampsia. *Hypertension* 2012, 59:861-8.

El-Mouseh T, Casalis PA, Wollenberg I, Zenclussen ML, Volk HD, Langwisch S, Jensen F, Zenclussen AC: Exploring the potential of low doses carbon monoxide as therapy in pregnancy Complications. *Medical Gas Research* 2012, 2:4.

Zenclussen ML, Jensen F, Rebelo S, **El-Mouseh T**, Casalis PA, Zenclussen AC: Heme Oxygenase-1 Expression in the Ovary Dictates a Proper Oocyte Ovulation, Fertilization, and Corpora Lutea Maintenance. *Am J Reprod Immunol* 2011, 67:376-82.

Zenclussen ML, Casalis PA, **El-Mouseh T**, Rebelo S, Langwisch S, Linzke N, Volk HD, Fest S, Soares MP, Zenclussen AC: Haem oxygenase-1 dictates intrauterine fetal survival in mice via carbon monoxide. *J Pathol* 2011, 225:293-304.

Leber A, Zenclussen ML, Teles A, Brachwitz N, Casalis P, **El-Mouseh T**, Jensen F, Woidacki K, Zenclussen AC: Pregnancy: tolerance and suppression of immune responses. *Methods Mol Biol* 2011, 677:397-417.

Kongresse/Tagungen:

28/ 05 – 01/ 06/ 2012 7th International Congress on Heme Oxygenases and Related Enzymes Edinburgh, Schottland.

Posterpräsentation: Exploring the therapeutical potential of low doses carbon monoxide in pregnancy complications.

05/ 10 – 08/ 10/ 2011 1st Reproductive Biology and Immunology Autumn School, Magdeburg, Deutschland.

Posterpräsentation: Exploring the therapeutical potential of low doses carbon monoxide in pregnancy complications.

- 22/ 09 – 25/ 09/ 2010 40th Annual Meeting DGFI. German Society for Immunology. Leipzig, Deutschland.
Posterpräsentation: Carbon monoxide improve pregnancy outcome by induction of tolerogenic dendritic cells.
- 30/ 09 – 04/ 10/ 2009 Heme Oxygenases in Biology and Medicine. 6th International Congress on Heme Oxygenases. Miami Beach, Florida (USA).
Posterpräsentation: CO application prevents fetal rejection.
- 13/ 09 – 16/ 09/ 2009 2nd European Congress of Immunology. Berlin, Deutschland.
Posterpräsentation: The protective effect of carbon monoxide (CO) on pregnancy outcome.
- 14/ 05 – 16/ 05/ 2009 Reproductive Medicine and Beyond: The 3rd International IVI Congress. Madrid, Spanien.
Posterpräsentation: HO-1 expression does not affect blastocyst attachment in vitro but is necessary for their proper pre-implantation development and placentation.
- 07/ 05 – 08/ 05/ 2009 Networks in Molecular Immunology-Infection and Immunity. Magdeburg, Deutschland.
- 01/ 12/ 2007 Herbsttagung der Medizinisch-Wissenschaftlichen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe. Magdeburg, Deutschland.

13 Selbständigkeitserklärung

Ich, Tarek El-Mousleh, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema “Untersuchung der therapeutischen Effizienz vom niedrig dosierten Kohlenstoffmonoxid (CO) [einem Hämoxygenase (HO)-1 Metabolit] auf den Schwangerschaftsverlauf im Mausmodell“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

14 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Ana Claudia Zenclussen, für die bereitwillige Übernahme der Betreuung meiner Promotion. Sie war mir jederzeit eine kompetente, hilfsbereite und freundschaftliche Doktormutter, die mir durch fruchtbare Diskussionen immer wieder zum roten Faden verholfen hat.

Natürlich möchte ich mich auch ganz herzlich bei all den vielen Kollegen bedanken, die mich im Laufe meiner Doktorarbeit begleitet haben. Ein besonderer Dank gilt an meine Kollegen Pablo Casalis, Dr. Maria Laura Zenclussen, Ana Teles und Dr. Paul Wafula für ihre Hilfsbereitschaft, harmonievollere Zusammenarbeit und die schöne Zeit im Labor in Berlin und Magdeburg.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meiner ganzen Familie bedanken. Meinen Eltern und Schwiegereltern, die mich immer sowohl seelisch als auch finanziell in allen Lebenssituationen unterstützt haben.

Mein allergrößter Dank gilt meiner lieben Frau Zehra El-Mousleh und meiner Tochter Aliyah El-Mousleh, die mich mit unendlicher Geduld, Verständnis und Liebe stets unterstützt haben.