Martina Weidinger

Die plazentare Regulation von 11ßHydroxysteroiddehydrogenase Typ2 und Corticotropin bei intrauteriner Wachstumsrestriktion

Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

Die plazentare Regulation von 11ßHydroxysteroiddehydrogenase Typ2 und Corticotropin bei intrauteriner Wachstumsrestriktion

Martina Weidinger

Erlangen 2008

Aus der Kinder- und Jugendklinik der
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Wolfgang Rascher

Die plazentare Regulation von 11ßHydroxysteroiddehydrogenase Typ2 und Corticotropin bei intrauteriner Wachstumsrestriktion

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
an der medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von Martina Maria Weidinger

aus Neumarkt i.d.Opf.

Gedruckt mit Erlaubnis der
Medizinischen Fakultät der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. J. Schüttler
Referent:	Prof. Dr. med. J. Dötsch
Koreferent:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. W. Rascher

Tag der mündlichen Prüfung: 22.04.2009

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über http://dnb.ddb.de abrufbar.
1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2009
Zugl.: Erlangen-Nürnberg, Univ., Diss., 2008

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2009
Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen
Telefon: 0551-54724-0
Telefax: 0551-54724-21
www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.
1. Auflage, 2009
Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-86727-965-9

”Es liegt nichts hinter uns, sondern alles in uns”
(unbekannter Autor)

In Liebe meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung **1**

2 Einleitung **5**
2.1 Die Utero-feto-plazentare Einheit 5
2.2 Das Krankheitsbild des IUGR 6
2.3 Die Theorie des „fetal programming“ 7
2.4 Der plazentare Glukokortikoidstoffwechsel und mögliche Zusammenhänge mit IUGR 9
2.4.1 Die Rolle von Glukokortikoiden in der Plazenta 9
2.4.2 Die Rolle von 11β-Hydroxysteroiddehydrogenase2 bei der Entstehung von IUGR und möglicherweise später auftretenden metabolischen Problemen 10
2.4.3 Die Rolle von CRH bei der Entstehung von IUGR und möglicherweise später auftretenden metabolischen Problemen 11
2.5 Zielsetzung und Fragestellung 12

3 Patienten und Methoden **14**
3.1 Patientenkollektive 14
3.1.1 Kollektiv für Genarray 15
3.1.2 Kollektiv 1:IUGR und Kontrollgruppe 15
3.1.3 Kollektiv 2:SGA und Kontrollen 16
3.1.4 Kollektiv 3:IUGR und SGA 16
3.1.5 Kollektiv 4:Präeklampsie und Kontrollgruppe 16
3.2 Methoden 21
3.2.1 Gewinnung und Verarbeitung von Plazentagewebe 21
3.2.2 Genarray-Analyse 21
3.2.3 RNA-Extraktion und Taqman-PCR 22
3.2.4 Western-Blot 31
3.2.5 Materialien 34

4 Ergebnisse **41**
4.1 Ergebnisse des Genarray 41
4.2 Statistisch ausgewertete Ergebnisse der Taqman-PCR 42
4.2.1 Statistik der ermittelten Werte bei der Expression von 11β HSD2 im Vergleich innerhalb genannter Kollektive 42

4.2.2 Statistik der ermittelten Werte bei der Expression von CRH im Vergleich innerhalb genannter Kollektive 45
4.2.3 Korrelationen zwischen 11HSD-Expression und Geburtsdaten . . . 47
4.2.4 Korrelationen zwischen CRH-Expression und Geburtsdaten 56
4.2.5 Korrelationen zwischen 11ßHSD2- und CRH-Expression 62
4.3 Ergebnisse der Western-Blot-Untersuchung bei 11β HSD2 64

5 Diskussion **66**
5.1 Ergebnisse zu 11βHSD2 66
5.2 Ergebnisse zu CRH 69
5.3 Ergebnisse zur Korrelation zwischen 11βHydroxysteroiddehydrogenase 2 und CRH 72

Literaturverzeichnis **73**

Abkürzungsverzeichnis **79**

Danksagung **84**

Lebenslauf **85**

1 Zusammenfassung

Hintergrund und Ziele

Der Glukokortikoidhaushalt der Mutter während der Schwangerschaft spielt eine wesentliche Rolle bei der zeitgerechten Größenentwicklung des Fetus. Veränderungen führen u.a. zur Entwicklung von intrauteriner Wachstumsrestriktion, IUGR. Das Enzymsystem der beiden 11βHydroxysteroiddehydrogenasen, insbesondere das Enzym 11βHSD2, und der Regelkreis des plazentaren Corticotropin sind wichtige Systeme der Plazenta, die eine pathologische Veränderung des Glukokortikoidhaushaltes und dessen Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten des Fetus verhindern sollen.
Ziel meiner Arbeit war es, Plazenten wachstumsveränderter Kinder (IUGR, SGA und Präeklampsie) auf eine veränderte Expression und Proteinsynthese von 11βHSD2 und CRH hin zu untersuchen und mögliche Zusammenhänge zur „ Fetal Programming Theory“ von Barker herzustellen.

Methoden (Patienten, Material und Untersuchungsmethoden)

Mittels Genarray-Analyse und quantitativer TaqMan-Real-Time-PCR wurden CRH und 11βHSD2 in Plazentaproben bestimmt. Die Proben stammten aus den Plazenten von IUGR-(n=29), SGA- (n=16), Präeklampsiegeburten (n=10) und Normalgeburten als Kontrollen (n=33). Der mRNA-Gehalt (quantitative TaqMan-Real-Time-PCR) wurde auf die Housekeeping-Gene HPRT und α-Mikroglobulin bezogen und statistisch auf signifikante Unterschiede und Korrelationen zwischen den Kollektiven untersucht. Darüberhinaus wurde mittels Western-Blot die Proteinexpression von 11βHSD2 in IUGR- und Kontrollproben (n=5+5) untersucht.

Ergebnisse und Beobachtungen

Die plazentare mRNA Genexpression von 11βHSD2 ist bei IUGR-Plazenten verglichen mit Kontrollplazenten tendentiell jedoch statistisch nicht signifikant vermindert exprimiert. Geburtsgewicht und 11βHSD2-Expression korrelierte in keiner der Gruppen, lediglich die SGA-Gruppe tendierte zu negativer Korrelation. Auch die Untersuchungen der einzelnen Gruppen auf Korrelation zwischen Geburtslänge und Expression blieb ohne statistische Signifikanz. Eine negative Korrelation von Genexpression zu Plazentagewicht wurde statistisch nicht bestätigt. Statistische Zusammenhänge zwischen Geburtslänge oder Plazentagewicht und Genexpression scheinen eher unwahrscheinlich.Auf Proteinebene konnte für 11ßHSD2 keine Veränderung bei IUGR-Plazentas festgestellt werden.
Die mRNA von CRH in IUGR-Plazenten ist verglichen mit Kontrollplazenten erhöht

exprimiert, die Genarrayanalyse zeigte eine 3,8 fache Expression von CRH in IUGR-Plazenten. Dies konnte durch die statistische Auswertung der PCR bestätigt werden. Es zeigten sich Werte von p(HPRT)= 0,003 und p(MG)= 0,02 beim Vergleich IUGR- versus Kontrollplazenten. Statistisch signifikante (p(MG)= 0,0046) bzw. annähernd signifikante Unterschiede (p(HPRT)= 0,09) beim Vergleich zwischen IUGR- und SGA-Plazenten liefern klare Hinweise für eine wichtige Rolle von CRH, insbesondere bei der Entstehung von IUGR. Auch bei der Entstehung von Präeklampsie kommt ihm eine wichtige Rolle zu, wie der Vergleich zwischen Plazenten von Präeklampsieschwangerschaften mit Kontrollplazenten zeigt. Die Präeklampsiegruppe zeigt eine statistisch signifikante Erhöhung der auf HPRT (p=0,002) bzw. auf MG (p=0,0002) normierten Messwerte.

Praktische Schlussfolgerungen

In der hier vorliegenden Arbeit wurden erstmalig zwei wichtige Parameter für Wachstumsveränderungen bei Neugeborenen (CRH und 11βHSD2 in der Plazenta) nicht nur bei dem häufig fokussiertem Patientenkollektiv der IUGR untersucht, sondern darüber hinaus ein direkter Vergleich mit SGA- und Präeklampsie-Geburten gezogen. Veränderungen in 11βHSD2 scheinen die Enstehung von SGA eher zu begünstigen als die Ausbildung von IUGR. Bei der Entstehung von Präeklampsie, sowie der Größenentwickung der Plazenta konnte kein statistischer Zusammenhang mit 11βHSD2-Expression eruiert werden. Auch auf Proteinebene zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und IUGR. Von wissenschaftlichem Interesse wäre, auf diesen Untersuchungen basierend, eine Studie mit größeren und schwangerschaftsaltergepaarten Kollektiven.
Mit diesen Untersuchungen konnte ich ebenfalls nachweisen, dass plazentares CRH beim Menschen eine wesentliche Rolle bei der Entstehung von Wachstumsrestriktionen spielt. Erhöhte CRH-Spiegel führen demnach zu vermindertem Geburtsgewicht und begünstigen vor allem die pathologische Form der Wachstumsrestriktion, IUGR. Mit der Grössenentwicklung der Plazenta korreliert CRH negativ. Von wissenschaftlichem Interesse wäre nun, diese differentiellen Regulationen auch auf Proteineben, sowie auf klinische Parameter hin zu untersuchen.

Summary

Backround and goals

The maternal status of glucocorticoids during pregnancy plays a significant role concerning the fetal growth process taking place in due time. Variances lead to intrauterine growth restriction (IUGR). The enzymatic system involved, includes both types of 11β-Hydroxysteroiddehydogenases (Type 1 and 2), especially 11βHSD2. Those enzymes and the regulatory circuit of placental corticotropin are essential keyplayers in the placenta, wich might protect the fetus from inadequate changes of glucocorticoids and the resulting consequences.
In respect to Barkers „Fetal programming theory“, my ambition was to investigate the expression and the proteinbiosynthesis of 11βHSD2 and corticotropin in the placenta. The samples examined were derived from the afterbirth of newborns suffering from changes in growth (IUGR, SGA and preeclampsia).

Materials and methods

Genarray-Analysis and TaqMan-Real-Time-PCR was performed to determine CRH and 11βHSD2 in placental samples derived from IUGR-(n=29), SGA- (n=16), preeclampsia-birth (n=10) and controls (n=33). The detected mRNA-level (quantitative TaqMan-Real-Time-PCR) was standardised to the corresponding amount of housekeeping-genes HPRT and alpha-microglobuline. The results were statistically evaluated for significant differences and correlation among the different groups.
Furthermore the proteinbiosynthesis of 11βHSD2 in IUGR- and controlsamples was investigated by westernblotting.

Results

The placental expression of 11ßHSD2 (mRNA) in IUGR-samples was reduced by trend in comparison with control. There was no direct correlation between birth weight and 11βHSD2 expression in general, just SGA-specimen indicate a negative correlation. Length at birth and placental weight showed no correlation with 11ßHSD2-levels. No changes could be observed in IUGR-placentas versus concerning 11βHSD2 protein-level. The results of the genarray-analysis showed a 3.8 times higher level of CRH (mRNA) expression in IUGR-placentas in comparison with controlplacentas. This could be approved by PCR. As a result CRH (mRNA) expression is statistically significantly increased (p(HPRT)= 0,003 und p(MG)= 0,02) in IUGR in comparison with control. A significant difference could be detected in the amount of CRH in IUGR- and SGA-samples

(p(MG)= 0,0046). Moreover CRH-levels in samples of preeclampsia were statistically significant higher than control (p(HPRT)= 0,002 und p(MG)= 0,0002). A negative correlation between placentary weight and the expression of CRH could be derived (p(HPRT)= 0,047, p(MG)=0,06).

Conclusion

This survey investigates placental CRH and 11ßHSD2, two factors playing an important role in growth variances in newborns. It draws a comparison of those genes between different types of growth variances including SGA and preeclampsia which reaches beyond the so far well established IUGR.
Changes in 11βHSD2 might support the development of SGA more than the genesis of IUGR. Preliminary data suggest no significant changes in 11βHSD2 in IUGR-group versus control.
My results show that placental CRH plays an essential role in the genesis of growth restrictions of humans. An increase of CRH-levels might lead to a reduction in birth-weight and moreover support the formation of a pathological variant of growth restriction, so called IUGR. Placental CRH shows a negative correlation with the extent of the placenta.
This findings suggest further investigation to elucidate those differential regulations in RNA- and protein-level and moreover the corresponding clinical issues should be examined.

2 Einleitung

2.1 Die Utero-feto-plazentare Einheit

Im Stadium der Morula, einem frühen embryonalen Entwicklungsstadium (ca. 6.Tag) entstehen aus der Blastozyste die äußere und die innere Zellmasse. Die innere Zellmasse, auch Embryoblast genannt, entwickelt sich weiter zum Embryo. Die äußere Zellmasse, der sogenannte Trophoblast, wird zur eigentlichen Plazenta [48][7].
Störungen der Implantation mit Auswirkungen auf die Entwicklung der Plazenta, stehen häufig im Zusammenhang mit Schwangerschaftspathologien wie z.B. Fehlgeburten, IUGR, Präeklampsie, vorzeitige und erschwerte Plazentalösung [50].
Damit die Plazenta ihre Funktion als zentrales Versorgungsorgan des Fetus aufnehmen kann, ist also eine normale Entwicklung utero- und fetoplazentarer Gefäßgebiete nötig, durch die eine ausreichende Zufuhr maternalen und fetalen Blutes in die Austauschregion der Plazenta sichergestellt wird. Störungen dieser Gefäßgebietsentwicklung finden sich u.a. bei Präeklampsie. Auch in den Plazenten von IUGR-Feten finden sich regelmäßig Fehlbildungen der uteroplazentaren Gefäße, wie z.B. Einengungen. So stellt sich eine IUGR-Plazenta nicht nur als kleinere Version einer zeitgemäß entwickelten Plazenta dar, sondern weist auch diverse Veränderungen der Vakulogenese [41][29], eine veränderte Expression trophoblastärer Transporter [23], Enzymaktivität und Hormonproduktion auf [36].
Die Veränderungen der Plazentagefäße können im Verlauf der Schwangerschaft, durch Blutdrucksteigerung mit der möglichen Folge einer hochpathologischen Blutflussumkehr zu Minderversorgung der Plazenta, einer Plazentainsuffizienz mit Hypoxie des Fetus führen. Zum Ausgleich einer Mangelversorgung stehen dem Organismus zwei Kompensationsmechanismen zur Verfügung: Steigerung von Substratzufuhr und, oder Einschränkung des Substratverbrauchs.
Die Adaptationsmechanismen der Plazenta basieren dabei funktionell v.a. auf Beschleunigung und Verstärkung der Vaskularisation, so dass es zu einer Hypervaskularisation und frühzeitiger Ausreifung der Endzotten kommt. Dies führt zu einer Funktionssteigerung der Plazenta [50].
Auf Seiten des Feten besteht eine mögliche Adaptation in einer Einschränkung von Substrat zur Vermeidung einer chronischen Hypoxie und der daraus folgenden metabolischen Azidose mit entsprechenden Gewebsschäden.
Tierexperimentell läßt sich, abhängig von Schweregrad und Dauer der Mangelversorgung, eine typische Adaptationssequenz erkennen:
„Die erste Stufe der Adaptation ist die Anpassung des Zellstoffwechsels mit Verlangsamung der Wachstumsrate, die auf einem komplexen Regelmechanismus basiert. Als

zweite Stufe wird in der Regel die Umverteilung im arteriellen Kreislauf des Fetus mit bevorzugter Perfusion lebenswichtiger Organe, wie des Gehirns, des Herzens und der Nebennieren angesehen.“ [50]. Auch “[e]ine Einschränkung der fetalen Bewegungsaktivität ist eine weitere Stufe des Sauerstoffsparprogramms des Fetus“ [24][17].
So zeigt sich, dass die Plazenta keinen rein passiven Anteil an der Schwangerschaft hat, indem sie den Transport mütterlicher Substrate zum Fetus gewährleistet. Viel mehr gleicht sie sich aktiv den maternalen Umständen an, verändert Struktur und Funktion je nach Substratangebot, das dem Fetus zur Verfügung steht, und der hormonellen Umgebung, der er ausgesetzt ist. Sie spielt eine entscheidende Rolle bei der Nährstoffversorgung des Feten sowie bei der hormonellen und metabolischen Regulation des Ungeborenen. Die Plazenta nimmt eine aktive Rolle im fetalen „Programming“ ein, das zu Erkrankungen im Erwachsenenalter führt [41]. In meiner Arbeit werden Systeme in der Plazenta untersucht, die einen möglichen Einfluss auf Schwangerschaftsverlauf, fetales Wachstum und spätere metabolische Folgen haben können.

2.2 Das Krankheitsbild des IUGR

Die Abkürzung IUGR steht für Intrauterin Growth Restriktion und beschreibt ein pathologisches, intrauterines Wachstumsverhalten des Fetus, bei dem der Fetus die erwartet Grösse nicht erreicht. Wichtig ist zunächst die Diffenrenzierung zur Erscheinung des SGA.
SGA steht laut Definition alleinig für Kinder, welche die 10. Größenperzentile nach Voigt, der für das jeweilige Gestationsalter gegebenen Normalverteilung, nicht erreichen. SGA „kann Ausdruck verschiedener konstitutioneller Faktoren wie Geschlecht des Kindes, Gewicht und Körpergröße der Mutter, sowie Gewichtszunahme während der Schwangerschaft, ethnische Zugehörigkeit u.a. sein“ [50] und hat als solcher keinen pathologischen Wert. Grundsätzlich entsprechen also 10 Prozent der Neugeborenen dieser Definition.
Im Gegensatz dazu bleibt ein Kind mit IUGR hinter der seinem genetischen Potential entsprechenden Größe zurück. Demnach können IUGR-Kinder auch der Definition von SGA entsprechen, tun dies aber nicht zwangsläufig. Spezifischer definiert bezeichnet IUGR ein pathologisches intrauterines Wachstumsverhalten, auf der Basis diverser extrinsischer oder intrinsischer Faktoren, in Kombination mit pathologischen Dopplerwerten [3].
Für die FIPS-Studie beeinhaltet die Definition für IUGR- und somit für das zu untersuchende Kollektiv folgende Merkmale: Neonaten mit einem Geburtsgewicht < 10. Perz. nach Voigt und einer sonographisch erwiesenen Plazentainsuffizienz mit PI (pulsatility index) in den Aa. uterinae >90. Perzentile und / oder notching.
Neben den akuten Problemen der Perinatalphase tritt die Bedeutung von Auswirkungen eines pathologischen intrauterinen Wachstums auf die spätere Entwicklung zunehmend in das allgemeine Bewußtsein. Besonders folgenschwer sind neuromotorische Bewegungsstörungen wie Zerebralparese, die gehäuft mit intrauteriner Wachstumsrestriktion as-

soziiert sind [12], ebenso Verzögerungen der sprachlichen Entwicklung, Lernschwierigkeiten und Verhaltensstörungen. Gehäuft beobachtet werden auch Erkrankungen aus dem metabolischen Formenkreis wie Hypertonie, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Hyperlipidämie und Diabetes mellitus der Typs II.
Die exakte und frühzeitige Identifikation von IUGR gestaltet sich schwierig. Deswegen wurden verschiedene Screeningmethoden entwickelt. Dabei hat sich, zusammen mit der Beurteilung der Fruchtwassermenge in seriellen Messungen, die Ultraschallbiometrie verschiedener Körpermaße des Fetus, wie die des Abdomenumfangs und des Kopfdurchmesser bewährt. Sie hilft die Größenentwicklung des Fetus besser zu beurteilen. Während sich das Wachstum eines SGA-Fetus perzentilengerecht, parallel zu einer Perzentile verhält, verändert der IUGR-Fetus das Wachstumsverhalten und fällt vom seiner Ausgangsperzentile in einen kleineren Perzentilenrang [3].
Die Dopplersonographie der maternalen A.uterina stellt eine weitere Screeningmethode dar.
In Schwangerschaften, die IUGR oder Präeklampsie als Komplikation haben, leitet der Trophoblast die Bildung von Spiralarterien nicht vollständig ein. Als Konsequenz daraus ergibt sich ein erhöhter Gefäßwiderstand der A.uterina, der mittels Doppleruntersuchung z.T. noch vor der 34. SSW festgestellt werden kann [3]. Als weitere ultrasonografische Hinweiszeichen für IUGR gelten: Oligohydarmnion, Pathologische Dopplerflußmessungen, pathologische Herzfrequenzmuster, pathologisches Bewegungs- und biophysikalisches Profil.
Die Suche nach Ursachen für die Entstehung von IUGR bietet ein breites Spektrum an möglichen Faktoren. Die häufigste Ursache für IUGR bei einem ansonsten normal entwickelten Kind sind Pathologien der maternalen Gefäße in Verbindung mit Präeklampsie, mit folglich verminderter Perfusion. Weitere, weitaus weniger häufige maternale Ursachen sind chronische Hypertension, renale Insuffizienz, Lupus erythematodes, chronische Anämie und vorbestehender Diabetes mellitus, sowie Exposition der Mutter gegenüber Nikotin, Drogen oder anderer teratogener Stoffe. Auch plazentare Faktoren wie z.B. primär plazentare Erkrankungen und Plazentafehllagen wie z.B. Plazenta praevia können zu IUGR führen. Bleiben als Entstehungsursachen fetale Faktoren zu nennen. Eine Reihe chromosomaler Anomalien können zu intrauteriner Wachstumsrestriktion führen, ebenso Mehrlingsschwangerschaften und diaplazentar übertragbare Infektionen, wie z.B. CMV [3].

2.3 Die Theorie des „fetal programming“

Barker versucht in seiner Theorie mögliche Zusammenhäge zwischen IUGR und metabolischen Erscheinungen herzustellen [8][5][31]. Die Ursprünge dieser Theorie, der „fetal programming-Theory“ liegen weit zurück im 19. Jahrhundert in „heredity of acquired conditions“ Theorie von Lamarck. Über weitere Theorien, wie “biological freudianism“ von Dubos 1966 und Dörners „Pre- und perinatal Programming“ und „Functional Teratology“, in der er erstmals den Begriff „programming“ verwendet wird, ent-

wickelten sich diverse Theorien, in denen sich Wissenschaftler, mit der Idee von prä-, peri- und postnatalen Einflüssen der hormonellen und nahrungstechnischen Umgebung des Fetus/Embryo auf dessen prä- und postnatale Entwicklung und Stoffwechsellage beschäftigten [45]. Im Jahr 1992 stellte Barker schließlich seine „Fetal-Programming-Hypothesis“ auf und startete mit ihr den Versuch, Zusammenhänge zwischen den Beobachtungen zu erklären, dass Kinder mit einem niedrigen Geburtsgewicht ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen, sowie nicht-insulinabhängigen Diabeteses und für ein metabolisches Syndrom im Erwachsenenleben haben. Der Begriff „programming“ steht hierbei weitgehend für die Beschreibung einer Induktion, Veränderung oder beeinträchtigten Entwicklung des fetalen physiologischen Systems durch Einflüsse oder Stimuli von Außen, die während einer „sensitiven Entwicklunsphase“ auftreten. Dies mündet in eine dauerhafte Veränderung der fetalen oder neonatalen Physiologie, sowie permanent veränderte somatische Strukturen [6][22]. In den frühen 1970‘ern zeigte eine Reihe von klinischen und experimentellen Studien, dass Hormone wichtige umgebungsabhängige Modulatoren des endokrinen Systems sind, die alle wichtigen Lebensprozesse regulieren. Wenn diese auf Grund intrauteriner und/oder früher postnataler Einflüsse in nicht-physiologischen Konzentrationen vorkommen, können sie für das postnatale Hormonsystem als endogene, funktionelle Teratogene wirken und eine Fehlsteuerung des neuro-endokrinen-Immunnetzwerks bewirken, die wiederum zu Fehlentwicklung und später zu Erkrankungen führen können [45].
Häufigste Ursache für intrauterine Wachstumsrestriktion ist eine Mangelernährung der Mutter, insbesondere während der Schwangerschaft. Zahlreichen Untersuchungen ergaben, dass der Stoffwechsel intrauterin unterernährter Kinder, sprich wachstumsretardierter Kinder, Abweichungen von der Norm zeigt. Diese Abweichungen gründeten sowohl in morphologischen Veränderungen bestimmter Organe bzw. Zellformationen und -formen, z.B. von Leber und Niere, als auch in einer Veränderung der metabolischen Stoffwechsellage durch differentielle Regulierung bestimmter Gene von Enzymen und Hormonen. Wie beschrieben beschränken sich die Auswirkungen dieser Veränderungen nicht alleinig auf die intrauterine Lebenszeit, sondern haben über die Geburt hinaus auf die weitere postnatale Lebensphase Wirkung. Die „Phenotype Thrifty Hypothesis“ gibt hierfür folgende Erklärung: Unterernährung der Mutter, bzw. Nahrungsmagel während der Schwangerschaft führen auf fetaler Seite zu irreversibler Regulationsveränderung des ana- und katabolen Stoffwechsels, um zunächst das Überleben des Fetus zu sichern. Auch das postnatale Überleben des Heranwachsenden scheint auf Grund möglichen Nahrungsmangels extrauterin gefährdet zu sein, so dass die modifizierte Stoffwechsellage auch unter Malnutrition einen Überlebensvorteil bringt, und somit das Erhalten des selbigen einen gewissen Evolutionsvorteil hat [6][22]. Trifft das Neugeborene jedoch auf ein ausreichend gutes Nahrungsangebot, werden die Mechanismen, die antropologisch zu besseren Überlebenschangen führen sollten, zu Pathogenitätsfaktoren, die über Überernährung und metabolisches Syndrom zu erhöhter Morbidität und Mortalität, also einem klaren Überlebensnachteil führen.
Die pathologische Entwicklung aus fetaler Malnutrition findet in zwei Stufen statt. Zunächst führt eine veränderte metabolische Stoffwechsellage als Anpassung an widrige

Lebensumstände pränatal zu strukturellen Veränderungender fetalen Organe. Der Körper des Ungeborenen nimmt also einen bestimmten Grad an Pathogenese in Kauf, um das Überleben zu sichern. Wenn der Organismus jedoch diese Lebensumstände, wie vermindertes Nahrungsangebot etc. extrauterin nicht vorfindet, können diese pränatal strukturellen und funktionellen Anpassungen zu pathologischen Erscheinungen, so zum Beispiel zu metabolischem Syndrom führen.

2.4 Der plazentare Glukokortikoidstoffwechsel und mögliche Zusammenhänge mit IUGR

2.4.1 Die Rolle von Glukokortikoiden in der Plazenta

Glukokortikoide sind für die Reifung von Lunge und Gastrointestinaltrakt des menschlichen Fetus sehr wichtig. Sie induzieren u.a. die Expression und Funktion von GLUT-Transportern [21]. Jedoch führen intrauterine Glukokortikoidexzesse zu Fehlentwicklungen anderer Organe, wie z.B. Zentralnervensystem und Niere, sowie zur Entwicklung von Hypertension, Hyperglykämie, einer gesteigerten Aktivität der Hypothalamus-Hypophysen-NNR-Achse und Veränderungen des Angstempfindens [33][63].
Weiter heben Glukokortikoide durch eine Erhöhung des transmembranären Ca^{2+} Einstromes oder indirekt als Wirkung über gefäßregulierende Hormone den Blutdruck an [62][28].
Auch die Entwicklung bestimmter Organsysteme können durch Glukokortikoidexzesse erheblich gestört werden. So bewies eine australische Forschergruppe unter Hayley Dickinson an Mäusen, dass ein erhöhter maternaler Glukokortikoidspiegel zur Entwicklung einer verminderten Anzahl von Nephronen beim Fetus führt [18], was wiederum zu adulter Hypertonie führen kann [42][64]. Des weitern besitzen Glukokortikoide eine wichtige Funktion bei der Entwicklung der fetalen HPA-Achse. So wurde an Tiermodellen gezeigt, dass die Exposition gegenüber gewisser Stressoren, wie Fasten, Alkohol, Morphinen und maternale Infektionen in der Schwangerschaft, bei den Nachkommen zu erhöhten basalen oder stress-induzierten Glukokortikoidspiegeln führt [4][44]. Dabei wird vermutet, dass bei exzessiver Exposition des Fetus gegenüber solcher hoher Glukokortikoidspiegel, v.a. während der Phase der rapiden Neurogenese, zu dauerhafter hochregulierter HPA-Aktivität und somit zu einem veränderten anabolen Stoffwechsel führt. Desweiteren scheinen Veränderungen der CRH-Rezeptorpolulation, sowie ein reduzierter Glukokortikoidfeedbackmechanismus mit erhöhten stressinduzierten Glukokortikoidspiegeln die Folge derartiger Veränderungen zu sein [44][32]. Glukokortikoide spielen auch in der fetalen Reifung eine wichtige Rolle. Zum Ende der Schwangerschaft wird die Cortisoloxidation eingestellt, was laut Murphy und Clifton über erhöhte Glukokortikoidspiegel zur Einstellung des Wachstums, zu Gunsten der fetalen Reifung führt [39].
Zwei wichtige Steuerfaktoren für den Glukokortikoidstoffwechsel in der menschlichen Plazenta sind 11βHSD und CRH. Diese werden jedoch gleichzeitig auch selbst von

Glukokortikoiden beeinflusst. So stimuliert ein hoher plazentarer Glukokortikoidspiegel einerseits die Expression von CRH, andrerseits führt er aber auch zu einer Aktivitätssteigerung von 11βHSD [53][47], so dass eine Art Regelzusammenhang zwischen Glukokortikoiden und CRH bzw. 11βHSD besteht.

2.4.2 Die Rolle von 11β-Hydroxysteroiddehydrogenase2 bei der Entstehung von IUGR und möglicherweise später auftretenden metabolischen Problemen

Prinzipiell wird 11βHSD2 beim Erwachsenen u.a. in der Niere und im Colon exprimiert [1]. Dort bewahrt es Mineralkortikoidrezeptoren vor Cortisolexzessen, indem es Aldosteron zur Interaktion mit den Mineralkortikoidrezeptoren aktiviert. Stärker verbreitet ist dieses Enzym im Gewebe menschlicher Feten [54], einschließlich der Plazenta, wo es in besonders großen Mengen vorkommt [38][13][14][55][49][60][53]. Als Barrierefunktion für zu hohe Glukokortikoidspiegel besitzt die Plazenta die 11βHydroxysteroiddehydrogenase 2, die Cortisol inaktiviert.
Der Trophoblast der menschlichen Plazenta synthetisiert zwei Isoformen des Enzyms 11β Hydroxysteroiddehydrogenase (11β HSD), Typ 1 und 2. Die beiden Enzyme bilden ein duales Funktionssystem, das die Umwandlung zwischen inaktivem Cortison und aktivem Cortisol katalysiert [41][30][59]. Während 11βHSD1 bidirektional, sowohl als Dehydrogenase, als auch als Oxidoreduktase mit niedriger Affinität zu Cortisol und NADP(H)-abhängig arbeitet(Km für cortisol = 1 ìM; Km für cortison = 0.3 ìM), ist 11β HSD2 eine unidirektionale, NAD-abhängige Dehydrogenase, die aktives Cortisol in inaktives Cortison verwandelt [53]. Postnatal hat 11βHSD1 u.a. zusätzlich Einfluss auf die Wirkung des Aldosteronrezeptors [16]. Die Expression und Aktivität von plazentarer 11βHSD2 wird abhängig vom Schwangerschaftsalter reguliert [43]. Ab dem ersten Trimenon kann das Auftreten von 11βHSD2 in der Plazenta nachgewiesen werden [53], dieser 11βHSD2- Grundspiegel steigt dann mit der Dauer der Schwangerschaft an und variiert bei sich verändernder Sauerstofflage in seiner Expression und Aktivität [2]. Gegen Ende der Schwangerschaft, zwischen der 38. und 40 SSW, fällt die 11β HSD2-Aktivität schließlich physiologischerweise wieder ab und setzt damit eine Kaskade in Gang, die über verminderte Cortisoloxidation zu erhöhten Glukokortikoidspiegeln führt. Dies wiederum führt in den letzten Schwangerschaftswochen physiologisch zur Einstellung des Fetenwachstums zu Gunsten der fetalen Reifung. Im Schafmodell konnte gezeigt werden, dass bei Nahrungsrestriktion von länger als 45 Tagen die plazentare 11βHSD2 signifikant abfällt, während sich gleichzeitig eine Wachstumsrestriktion, IUGR entwickelt [36]. Insgesamt kann also festgestellt werden, dass ein veränderter Glukokortikoidspiegel in der Plazenta, mit Nahrungsrestriktion und Hypoxie assoziiert ist, welche beide zu IUGR und „fetal programming „ führen [41]. Sun untersuchte in einer Studie mit beidseitig perfundierter Plazenta die Aktivität von 11βHSD 1 und die Wirkung von Cortisol auf den plazentaren Gefäßtonus, sowie die Rolle von 11βHSD bei der Ausschüttung von CRH [61][59]. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen die Bedeutung der

beiden Hydroxysteroiddehydrogenasen und insbesondere der 11βHSD2. 11βHSD2 ist in der humanen Plazenta der Hauptfaktor bei der Umwandlung von Cortisol zu Cortison, wenn nicht sogar alleinig dafür zuständig und kann somit den Fetus vor zu hohen Glukokortikoidspiegeln schützen [53]. Die Prädominanz von 11βHSD 2 erklärt somit auch die im Vergleich zur Cortisol wesentlich höheren Cortisonrate. Die Anwesenheit bzw. Wirkung dieser Oxidasen wurde in Suns Studie auch durch die Beobachtung gestützt, dass die Umwandlung von Cortisol zu Cortison nach der Gabe von Carbenoxolon, einem potenten 11βHSD Inhibitor, blockiert war [59].
Die zentrale Rolle der 11βHSD bei der zeitgerechten Grössenentwicklung des menschlichen Fetus wird besonders deutlich, betrachtet man die möglichen Fehlentwicklungen von ungeborenen Kindern unter dem Einfluss zu hoher Glukokortikoidspiegel. So ist das Bild des IUGR z.B. eine charakteristische Erscheinung des Syndroms bei fortschreitenden intrauterinem Glukokortikoidexzess als Folge einer das Enzym 11βHSD2 inaktivierenden Punktmutation [9]. Des Weiteren konnte in Studien von Lindsay, Benediktsson und Mc Calla durch Versuche an Ratten gezeigt werden, dass die Nachkömmlinge von Ratten, die während der Schwangerschaft mit Carbenoxolon oder dem synthetischen Steroid Dexamethason, beides Inhibitoren der 11βHSD, behandelt wurden, ein erhöhtes Risiko für Hypertonie und Hyperglykämie aufweisen [33][34][10].
In vorliegender Arbeit sollen die Zusammenhänge zwischen intrauteriner Wachstumsrestriktion, der Expression von 11βHSD2 in menschlicher Plazenta und deren mögliche Einflüsse auf postnatale Entwicklung der Kinder untersucht werden.

2.4.3 Die Rolle von CRH bei der Entstehung von IUGR und möglicherweise später auftretenden metabolischen Problemen

Humanes CRH ist ein aus 41 Aminosäuren bestehendes Peptid, das klassischer Weise als neuronales Steuerhormon des Hypothalamus bekannt ist. In diesem Hypothalamus-Hypophysen-NNR-Regelkreis übernimmt CRH als Neuropeptid die Funktion eines Releasinghormons, das die Freisetzung von ACTH bewirkt, welches seinerseits wiederum als Releasinghormon die NNR zur Synthese von Kortikoiden anregt. Hohe Cortisolspiegel hemmen die Freisetzung von CRH und bilden somit ein negatives Feedbacksystem. Jedoch hat CRH darüber hinaus auch in anderen Geweben des menschlichen Körpers wichtige Funktionen [27][26], so z.B. im Immunsystem, beim Energieumsatz oder im weiblichen Reproduktionssystem [46].
Auch in der menschlichen Plazenta kann die Synthese von CRH nachgewiesen werden. Die Struktur ist dem neuronalen CRH gleich. Eine hohe Cortisolkonzentration im fetalen oder maternalen Kreislauf führt jedoch, anders als im neuro-adrenalen Regelkreis zu einer vermehrten Synthese und Freisetzung von CRH in der Plazenta, welches wie das Neuropeptid sowohl die mütterliche, als auch die kindliche NNR zum Wachstum, und somit zur erhöhten Synthese und Freisetzung von Cortisol anregt. So entsteht ein

positives Feedbacksystem, das in einen kontinuierlich-ansteigenden CRH-Spiegel in der Plazenta mündet. Plazentares CRH kann nicht vor der 8. SSW im Plazentagewebe und ab ca. der 16.- 22. SSW im maternalen Plasma nachgewiesen werden. Der Plasmakonzentrationsanstieg erfolgt exponentiell und erreicht während der Wehentätigkeiten einen Peak. Auch im fetalen Blut übernimmt CRH eine wichtige physiologische Rolle. Über die Stimulation der NNR bewirkt CRH die Ausschüttung von Glukokortikoide auf der maternalen und fetalen Seite, was vor allem gegen Ende der Schwangerschaft die Maturation des Fetus forciert. Weitere Funktionen, die plazentarem CRH zugesprochen werden, sind Effekte auf den plazentaren Blutfluss, auf die maternale Hypothalamus-Hypophysen-Achse, sowie eine Aktivierung der fetalen NNR und Einfluss auf das Voranschreiten der Schwangerschaft [27]. Obgleich die genaue Rolle von CRH in der Plazenta noch nicht eindeutig erforscht ist, wird vermutet, dass CRH in der Plazenta eines der Hormone ist, welches auch für die Mechanismen zur Erhaltung einer Schwangerschaft eine große Rolle spielen. Demnach habe CRH die Funktion einer plazentaren Uhr, die den Beginn der Geburt nach einer prädeterminierten Schwangerschaftsdauer einleitet, so dass der maternale Plasmaspiegel von CRH als Indikator für den Fortschritt des Geburtsvorgangs genommen werden kann [26][35]. Eine weitere wichtige Erkenntnis aus Karteris´Studie ist, dass chronisch erhöhte CRH-Exposition auf fetaler und maternaler Seite zu einer Downregulation von CRH-Rezeptoren auf fetaler, maternaler und plazentarer Seite führt. Folgen davon sind verminderte Vasodilatation, mit einer durch Angiotensin-Übergewicht hervorgerufenen Vasokostriktion. Dies führt auf maternaler, wie auch auf fetaler Seite zu Hypertonus, sowie zu einer Minderversorgung des Fetus auf Grund plazentarer Vasokonstriktion. Damit ist auch der regelmäßig erhöhte CRH-Plasmaspiegel bei Schwangerschaften mit Komplikationen wie z.B. Präeklampsie oder Hypertonus im maternalen Blut zu erklären. Auch auf der fetalen Seite sind Zusammenhänge zwischen CRH-Plasmaspiegel und fetaler Entwicklung untersucht worden, so stellte sich heraus, dass der CRH-Spiegel im Plasma des Nabelschnurblutes von wachstumsretardierten Kindern durchschnittlich höher war als der bei AGA-Kindern. In diesem Zusammenhang werden auch Erklärungsversuche für die Vorgänge der „Fetal programming theory“ gesucht.
In meiner Arbeit will ich mich näher mit der Frage beschäftigen, welche möglichen Zusammenhänge zwischen CRH- Expression in humaner Plazenta und der Entwicklung von IUGR bestehen und welche weiteren Faktoren möglicherweise Einfluss auf die CRH-Expression und somit auf die fetale Entwicklung nehmen können.

2.5 Zielsetzung und Fragestellung

Es war Ziel dieser Arbeit, mögliche Zusammenhänge zwischen der Expression von 11βHSD2 und CRH in der menschlichen Plazenta und der Entwicklung von IUGR festzustellen, sowie zu untersuchen, in wie weit diese beiden Gene in Plazenten von IUGR-, Präeklampsie-, SGA- und AGA-Plazenten differentiell reguliert werden.

Im einzelnen sollen folgende Fragen beantwortet werden:

Kann bei IUGR eine verminderte Expression von 11βHSD2 festgestellt werden?

Können Expressionsunterschiede von 11βHSD2 auf Proteinebene bestätigt werden?

Kann bei IUGR eine erhöhte Expression von CRH in der Plazenta festgestellt werden?

Können Zusammenhänge zwischen Expression von 11β HSD2 und CRH in der menschlichen Plazenta, insbesondere bei IUGR-Plazenten festgestellt werden?

3 Patienten und Methoden

3.1 Patientenkollektive

In Anlehnung an und für die FIPS (fetal programming of intrauterin growth restriction)-Studie der Universitätskinderklinik Erlangen wurden in Zusammenarbeit mit der Universitätsfrauenklinik Erlangen, der Klinik für Gynäkologie der Universität Halle-Wittenberg und der Universitätsfrauenklinik Jena zwischen April 2002 und März 2006 Materialproben aus Plazentagewebe gesunder Schwangerer mit komplikationslosem Schwangerschaftsverlauf, unmittelbar nach primärer Sectio caesarea oder Spontangeburt mit Zustimmung der Mütter entnommen. Als Auswahlkriterien für das Patientenkollektiv wurden die Ein- und Ausschlusskriterien der FIPS-Studie weitestgehend übernommen. Ausschlusskriterien waren: mütterlicher Diabetes mellitus, Gestationsdiabetes, Alkohol- bzw. Drogenabusus, TORCH- oder kongenitale Infektionen, erwiesene primäre Sepsis, fetale Chromosomenaberrationen oder Syndrome und andere kongenitale oder erworbene Erkrankungen, die zur postnatalen Wachstumsretardierung führen können. Auch Daten von Patienen mit weiteren per se zur Wachstumsrestriktion führenden Veränderungen, wie z.B. Mehrlingsschwangerschaften wurden nicht in die Studie eingeschlossen. Das für diese Arbeit untersuchte Material entstammte so einem Patientenkollektiv, aus insgesamt 98 Neonaten, die nach ihrem Geburtsgewicht, den Perzentilen nach Voigt et al. für deutsche Neugeborene und einer sonographisch erwiesenen Plazentainsuffizienz in die Gruppen IUGR (n=29), SGA ohne IUGR(n=16), 10.-25. Perzentile (n=11), 75.-90. Perzentile (n=6), Kontrolle (n=33) und LGA (n=3) eingeteilt wurden. In die Gruppe IUGR (Intrauterine Growth Retardation) wurden Neonaten mit einem Geburtsgewicht $<$ 10. Perzentile nach Voigt und einer sonographisch erwiesenen Plazentainsuffizienz mit PI (pulsatility index) in den Aa. uterinae >90. Perzentile und / oder notching aufgenommen. Zur Gruppe SGA (small for gestational age) zählen ebenfalls Kinder $<$ 10. Perzentile nach Voigt, jedoch ohne pathologischem Plazentabefund. In der Gruppe LGA (large for gestational age) befinden sich Neonaten mit einem Geburtsgewicht $>$ 90. Perzentile nach Voigt. Während AGA Kinder (appropriate for gestational age) zwischen der 25. und 75. Perzentile nach Voigt zur Kontrollgruppe zählen, stellen die restlichen AGAs (10.-25. Perzentile und 75.-90. Perzentile nach Voigt) jeweils eine eigene Gruppe dar. Des Weiteren wurde eine Gruppe aus Patientinnen mit nach internationlen Kriterien diagnostizierter Präeklampsie gebildet. Diese hatten Blutdruckwerte von systolisch >140-160 mmHg und diastolische >90-100 mmHg, die Größe der Gruppe beträgt n=3. Aufgeführte Gruppen wurden je nach zu untersuchenden Faktoren in verschiedene Kollektive zusammengefasst und miteinander verglichen. Alle Untersuchungen waren von die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg genehmigt.

3.1.1 Kollektiv für Genarray

Das Kollektiv für die Genarray Untersuchung setzt sich aus 9 Proben der IUGR- und 7 Proben der Kontrollgruppe zusammen. Das Gewicht der IUGR ist definiert als <10te Perzentile nach Voigt, wohingegen sich hier in der Kontrollgruppe Kinder zwischen der 10ten und der 90ten Perzentile befinden. Der Geburtszeitpunkt betrug bei den IUGR-Proben im 36.3 +/- 2.9 SSW und bei den Kontroll-Proben 36.8 +/- 2.5 SSW, so dass der, über Mann-Withney-Test bestimmte p-Wert mit p=0.71 keine Signifikanz zeigte. Weitere Daten zum Kollektiv sind der Tabelle 3.1 zu entnehmen.

	IUGR (N=9)	Kontrollgruppe (N=7)
Schwangerschaftsdauer (Wochen)	$36{,}3 \pm 2{,}9^{ns}$ P=0,71	36,8 ± 2,5
Geburtsgewicht (g)	1687 ± 671* P=0,01	2684 ± 730
Plazentagewicht (g)	336 ± 78* P=0,02	486 ± 149

Tabelle 3.1: Patientendaten aus Kollektiv für Gen-array (IUGR und Kontrollen). Hier sind Geburtsgewicht und Plazentagewicht der IUGR-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant vermindert. Bei der Schwangerschaftsdauer zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen: * p<0,05; ** p<0,005; *** p<0,0001; NS: nicht signifikant.

3.1.2 Kollektiv 1:IUGR und Kontrollgruppe

Das Kollektiv 1 setzt sich aus 29 Patienten der IUGR-Guppe und 33 Neonaten der Kontrollgruppe, also der normalgewichtig geborenen AGA-Kindern zusammen, deren Geburt jeweils zwischen der 30+0 SSW und 40+3 SSW liegt. Darunter befinden sich 30 Frühgeborene (< 37+0) und 32 Reifgeborene. Unter den Neugeborenen der IUGR-Gruppe dieses Kollektivs finden sich 15 Frühgeborene, 4 Fälle von Präeklampsie und 5 Kinder von Patientinnnen, die während der Schwangerschaft rauchten. Bei den Kindern

der 33 Kontroll-Plazenten handelte es sich um 15 Frühgeborene und zwei Kinder von Raucherinnen. Weitere mütterliche und kindliche Daten werden in Tabelle 3.2 dargestellt.

3.1.3 Kollektiv 2:SGA und Kontrollen

Für das Kollektiv 2 werden 16 SGA Neugeborene mit 33 Kindern aus der Kontrollgruppe verglichen. Die 36 Plazentaproben stammen von Geburten zwischen SSW 30+0 und 40+4 SSW. Unter den Müttern der SGA Neonaten befinden sich 5 Raucherinnen, in der Kontrollgruppe dagegen nur zwei.
Weitere mütterliche und kindliche Daten sind in Tabelle 3.3 dargestellt.

3.1.4 Kollektiv 3:IUGR und SGA

Im Kollektiv 3 werden die Werte von 29 IUGR- mit denen von 16 SGA-Plazentaproben verglichen. Unter den IUGR Kindern befinden sich 15 Frühgeborene, 14 Reifgeborene und 5 Kinder von Raucherinnen, während man unter den Kindern der SGA Gruppe ein Frühgeborenes, 15 Reifgeborene und 5 Kinder von Raucherinnen findet. Weitere mütterliche und kindliche Daten sind in Tabelle 3.4 dargestellt.

3.1.5 Kollektiv 4:Präeklampsie und Kontrollgruppe

Das Kollektiv 4 besteht aus den Kindern der 10 Patientinnen mit Präeklampsie aus verschiedenen Gruppen, die mit 16 Plazenten aus der Kontrollgruppe verglichen werden. Unter den Neonaten der Präeklampsie-Gruppe befinden sich 8 Frühgeborene und 2 Reifgeborene. Zwei der Mütter sind Raucherinnen. Die Kontrollgruppe enthält dagegen 11 Frühgeborene und 6 Reifgeborene und eine Raucherin als Mutter. Weitere mütterliche und kindliche Daten sind in Tabelle 3.5 dargestellt.

	IUGR (N=29)	Kontrollgruppe (N=33)
Alter der Mutter (Jahre)	28 ± 6 ns (16-39) (N=27)	32 ± 6 (20 - 38) (N=32)
BMI der Mutter (kg/m^2)	21,4 ± 3,6 ns (17,0 - 30,5) (N=26)	22,7 ± 2,9 (18,3 - 29,0) (N=24)
Schwangerschaftsdauer (Wochen)	34+1 ± 19,6 ns (30+0 - 38+0)	37+1 ± 17,4 (30+0 - 40+3)
Geburtsgewicht (g)	1560 ± 578 (686 - 2700)	3010 ± 539 (1420 - 3570)
GG SDS	-2,24 ± 0,69*** (-3,89 - -1,01) (N=23)	-0,44 ± 0,37 (-1,14 - 0,20)
GL SDS	-2,23 ± 0,99** (-4,59 - -0,59) (N=23)	-0,30 ± 0,80 (-1,74 - 0,60)
KU SDS	-2,00 ± 1,08 ns (-3,57 - 0,81) (N=21)	-0,30 ± 0,80 (-1,95 - 1,34) (N=32)
Plazentagewicht (g)	350 ± 110*** (190 - 660) (N=25)	515 ± 113 (320 - 780) (N=28)

Tabelle 3.2: Patientendaten aus Kollektiv 1 (IUGR und Kontrollen). Während sich Alter und BMI der Mutter, sowie die Schwangerschaftsdauer, Geburtsgewicht und Kopfumfang SDS nicht unterscheiden, zeigt sich eine signifikante Erniedrigung von Geburtsgewicht SDS (GG SDS), Geburtslänge SDS (GL SDS)und Plazentagewicht bei der IUGR-Gruppe. Die Werte sind als Mittelwert ± SD (Minimum-Maximum) dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen: * $p<0,05$; ** $p<0,005$; *** $p<0,0001$; NS: nicht signifikant.

	SGA (N=16)	Kontrollgruppe (N=33)
BMI der Mutter (kg/m^2)	21,0 ± 3,2^{ns} (17,6 - 27,6) (N=12)	22,7±2,9 (18,3 - 29,1) (N=24)
Schwangerschaftsdauer (Wochen)	39+3 ± 7,7*** (36+0 - 40+4)	37+1 ± 17,4 (30+0 - 40+3)
Geburtsgewicht (g)	2680 ± 248** (2050-3070)	3010 ± 539 (1420 - 3570)
GG SDS	-1,93 ± 0,50^{ns} (-2,55 - -0,95) (N=14)	-0,44 ± 0,37 (-1,14 - 0,20)
GL SDS	-1,65 ± 0,73^{ns} (-2,44 - -0,34) (N=14)	-0,56 ± 0,61 (-1,74 - 0,60)
KU SDS	-1,11± 1,01^{ns} (-3,07- 0,11) (N=14)	-0,30 ± 0,80 (-1,95 - 1,34) (N=32)
Plazentagewicht (g)	460 ± 105^{ns} (315 - 690) (N=15)	515 ± 113 (320 - 780) (N=28)

Tabelle 3.3: Patientendaten aus Kollektiv 2 (SGA und Kontrollen). Patientendaten aus Kollektiv 2 (SGA und Kontrollen). Hier ist das Geburtsgewicht in der SGA-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant vermindert, die Schwangerschaftsdauer signifikant größer. BMI der Mütter, Plazentagewicht, GG SDS, GL SDS und KU SDS zeigen keine Unterschiede. Die Werte sind als Mittelwert ± SD (Minimum-Maximum) dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen: * $p<0,05$; ** $p<0,005$; *** $p<0,0001$; NS: nicht signifikant.

	IUGR (N=29)	SGA (N=16)
BMI der Mutter (kg/m^2)	21,4 ± 3,6^{ns} (17,0 - 30,5) (N=26)	21,0±3,2 (17,6 - 27,6) (N=12)
Schwangerschaftsdauer (Wochen)	34+1 ± 19,6*** (36+0 - 39+1)	39+3 ± 7,7 (36+0 - 40+4)
Geburtsgewicht (g)	1560 ± 578*** (686 - 2700)	2680 ± 248 (2050 - 3070)
GG SDS	-2,24 ± 0,69^{ns} (-3,89 - -1,01) (N=23)	-1,93 ± 0,50 (-2,55 - 0,95) (N=14)
GL SDS	-2,32 ± 0,69^{ns} (-4,59 - -0,59) (N=23)	-1,65 ± 0,73 (-2,44 - 0,34) (N=14)
KU SDS	-2,00 ± 1,08^{ns} (-3,57 - 0,81) (N=21)	-1,11 ± 1,01 (-3,07 - 0,11) (N=14)
Plazentagewicht (g)	350 ± 110^{ns} (190 - 660) (N=25)	460 ± 105 (315 - 690) (N=15)

Tabelle 3.4: Patientendaten aus Kollektiv 3 (IUGR und SGA). Hier sind Schwangerschaftsdauer, sowie Geburtsgewicht in der IUGR-Gruppe im Vergleich zur SGA-Gruppe signifikant vermindert. BMI der Mütter, Geburtsgewicht SDS, GL SDS, KU SDS und Plazentagewicht zeigen keine signifikanten Unterschiede. Die Werte sind als Mittelwert ± SD (Minimum-Maximum) dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen: * $p<0,05$; ** $p<0,005$; *** $p<0,0001$; NS: nicht signifikant.

	Präeklampsie (N=10)	Kontrollgruppe (N=16)
Alter der Mutter (Jahre)	27 ± 4 ns (23-34) (N=9)	31 ± 7 (20 - 38) (N=15)
BMI der Mutter (kg/m^2)	21,6 ± 4,3 ns (18,8 - 30,5) (N=9)	23,0 ± 2,5 (18,3 - 27,1) (N=11)
Schwangerschaftsdauer (Wochen)	33+6 ± 15,9 ns (31+2 - 38+2)	35+4 ± 14,5 (31+3 - 38+3)
Geburtsgewicht (g)	1960 ± 770 ns (1000 - 3310)	3010 ± 539 (1600 - 3250)
GG SDS	-0,70 ± 0,95*** (-2,72 - -0,31)	-0,41 ± 0,32 (-0,93 - 0,17)
GL SDS	-1,21 ± 1,19** (-4,59 - -0,59)	-0,66 ± 0,54 (-1,62 - 0,25)
KU SDS	-0,92± 1,22 ns (-3,57- 0,13) (N=9)	-0,37 ± 0,89 (-1,95 - 1,12) (N=15)
Plazentagewicht (g)	360 ± 82 ns (260 - 540)	475 ± 90 (330 - 560) (N=12)

Tabelle 3.5: Patientendaten aus Kollektiv 4. Hier sind GG SDS und GL SDS der Präeklampsiegruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe signifikant erhöht. BMI und Alter der Mutter„ Schwangerschaftsdauer, Geburtsgewicht, KU SDS und Plazentagewicht zeigen keine signifikanten Unterschiede. Die Werte sind als Mittelwert ± SD $Minimum - Maximum$ dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen: * $p<0,05$; ** $p<0,005$; *** $p<0,0001$; NS: nicht signifikant.

3.2 Methoden

3.2.1 Gewinnung und Verarbeitung von Plazentagewebe

Sämtliche Proben wurden an den Universitätsfrauenkliniken Erlangen, Halle und Jena bis maximal 30 Minuten nach primärer Sectio caesarea oder nach Spontangeburt aus drei verschiedenen Stellen der Plazenta, Nabelschnur nah, mittig der Plazenta und fern der Nabelschnur, an makroskopisch unauffälligen und für das Gesamtorgan repräsentativen Stellen entnommen. Die Schnittführung erfolgte sagittal zur Chorion- und Basalplatte über die gesamte Höhe des Organs, so dass der Gewebeblock einmal von maternaler Dezidua und zum andern von der fetalen Chorionplatte begrenzt wurde. Diese ca. $2cm \times 2cm \times 2cm$ großen Proben wurden in steriler physiologischer Kochsalzlösung mehrfach gewaschen, um sie weitgehend vom Blut zu reinigen. Nach der ebenfalls die gesamte Höhe einschließenden Halbierung der Proben wurde jeweils einer der beiden Teile von Chorionplatten- und Deziduaanteilen befreit, in Stickstoff schockgefroren und anschließend bis zur Weiterverarbeitung bei -80 C gelagert. Die zweite Hälfte der jeweiligen Proben wurde zunächst für 24 bis 48h in Formalin gelegt und daraufhin bis zur Einbettung in Paraffin in 70 prozentigem Isopropanol zum Entwässern eingelegt.

3.2.2 Genarray-Analyse

Für unsere Studie benutzten wir die Affimetrix Gene-Chip-Technologie, in der Proben auf 38000 cDNAs untersucht werden. Die genaue Vorgehensweise dieser Technik ist bei Xu et al. detailiert beschrieben [65].
Die Biotin-markierte zyclische RNA entstand durch in vitro Transkription und wurde, gemäß den Angaben des Herstellers an die GeneChips hybridisiert [19]. Für die Synthese der first-strand cDNA, wurden 9μl (13.5μg) Gesamt-RNA mit 1μl einer Mischung aus 3 polyadenylierten Kontroll-RNA´s und 1 μl, 100μM T7-oligo-d(T)21V primer (5GCATTAGCGGCCGCGAAATTAATACGACTC-ACTATAGGGAGA[T]21V-3) gemischt, 10 Minuten bei 70 C inkubiert und daraufhin auf Eis gelagert. Im nächsten Schritt wurden 4μl von 5× first-strand Buffer MDTT und 1μl von 10μM Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTPs) hinzugefügt und die Reaktion für 2 Minuten bei 42 C präinkubiert. Nach hinzugeben von 2μl (200U) Superscript, folgte die Inkubation für eine Stunde bei 42 C. Die Synthese des second-strand, erfolgte mit 30μl von 5* second-strand Buffer (91μl von RNAse-freies Wasser, 3ml 10mM dNTPs, 4μl (40U) E. coli DNA Polymerase I, 1μl (12U) E. coli Ligase, und 1μl (2U) RNAse. Diese Reaktion inkubierte 2 Stunden lang bei 16 C. Abschließend, wurden 2,5mL (10U) T4 DNA Polymerase I hinzugegeben und 5 Minuten bei 16 C inkubiert. Durch Zugabe von 10μl 0.5 M Ethylenediaminetetraessigsäure gestoppt kam diese Reaktion zum Stillstand. Die doppelsträngige cDNA wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert und schließlich die wässrige Phase über Phase-Lock Gel Seperation entfernt. Nach Präzipitation wurde die cDNA in 12μl RNAsefreiem Wasser wieder aufgenommen. 5μl der doppelsträngigen cDNA verwendeten wir zur Herstellung von biotinilierter cRNA. Dabei benutzten wir das

BioArray high-yield transcript labeling kit. Mit dem RNeasy mini kit wurde die Biotin-markierte cRNA aufgereinigt. Die Fragmentierung der cDNA, die Hybridisierung an die Gene-Chips, die Waschschritte, das Anfärben und das Scannen der Arrays mit dem Genarray-Scanner wurde nach den Angaben des Affymetrix gene expression analysis technical manual durchgeführt.

3.2.3 RNA-Extraktion und Taqman-PCR

RNA-Extraktion

Die Isolierung der Ribonukleinsäuren erfolgte mittels Guadinium-Thiocyanat-Phenol-Chloroform-Lösung. Die vierstufige Methode umfasst Homogenisierung, Extraktion, Präzipitation und Waschen. Die RNA wurde aus den Plazentaproben durch Guanidin-Isothiocyanat-Acid-Phenol (TRIZOL Reagent, Invitrogen GmbH, Karsruhe) lysiert, wobei jeweils 100 mg Plazentagewebe mit 1 ml TRIZOL Reagent versetzt wurden. Die Zerkleinerung des Gewebes erfolgte in einem 2 ml Eppendorf-Cup durch Hinzufügen von Trizol und zwei Metallkügelchen für 2 Minuten bei 30 Hz im Homogenisator. In Folge von Proteindenaturierung durch die Substanzen kommt es zur Zerstörung der Zellmembranen, während gleichzeitig die Bildung von RNA-Komplexen mit Guanidium und Wassermolekülen gefördert wird. Durch Verhindern der Bindung an die hydrophile Phase entfernen jene effizient enthaltene DNA-Fragmente und Proteine aus der Wasserphase. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis wurden 200μl Chloroform 10% hinzugefügt, der Inhalt des Cups kurz im Whirl-Mix vermischt und anschließend bei 4 C und 12000 U/min für 15 Minuten zentrifugiert. Bei diesem Vorgang bildeten sich zwei Phasen innerhalb der Reaktionsgefäße: Die obere wässrig-klare Phase enthielt RNA, die untere zäh-bläuliche Phenolchloroform-Phase DNA und Proteine. Die oberste Schicht wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß abpipettiert. Zur Anreicherung der RNA-Konzentration wurde zum Überstand nun 500μl Isopropanol hinzugegeben, erneut gemischt, 20 Minuten auf Eis gelagert und im Anschluss bei 4 C und 15000 U/min 15 Minuten lang zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde vorsichtig mittels einer Saugpipette abgesaugt und das zurückgebliebene an der Luft getrocknete Pellet mit 1 ml 75% -igem Ethanol versetzt, gründlich gemischt und bei 4 C und 15000 U/min nochmals 5 Minuten lang zentrifugiert. Nach erneutem Absaugen des Ethanolüberstandes wurde das RNA-haltige Pellet für 2-3 Minuten an der Luft getrocknet und anschließend in 50μl DEPC-Wasser (Diethylpyrocarbonat in Aqua dest.) gelöst. Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung und gelelektrophoretischer Auftrennung der extrahierten Ribonukleinsäurefragmente erfolgte deren Lagerung bei -80 C. Aufgrund der heterogenen Struktur des Plazentagewebes wurde die RNA von zwei unterschiedlichen Stellen der Plazenta extrahiert und unabhängig voneinander quantifiziert.

Photometrie

Die photometrische Konzentrationsbestimmung der isolierten Ribonukleinsäuren diente als Grundlage für eine exakte Berechnung der einzusetzenden Menge an Nukleinsäurelösung bei der reversen Transkription. Nukleinsäuren absorbieren in Abhängigkeit von ihrer Konzentration ultraviolettes Licht der Wellenlänge 260 nm. Einer Absorption von 1,0 bei 260 nm (A260) entspricht eine Konzentration von 40μg/ml RNA oder einzelsträngiger DNA bzw. eine Konzentration von 50μg/ml doppelsträngiger DNA. Proteine absorbieren UV-Licht bei 280 nm. Eventuelle Verunreinigungen der Probe mit Aromaten, Phenolresten und Salzen führen zu einer Absorption von ultraviolettem Licht der Wellenlänge 230 nm. Die Verhältnisse A260/A280 bzw. A260/A230 liegen für reine Nukleinsäurelösungen über 1,5 und im Falle von Verunreinigungen wesentlich darunter. Nach Eichung des Photometers mit destilliertem Wasser erfolgte die photometrische Absorptionsmessung der mit Aqua dest. im Verhältnis von 1:39 verdünnten RNA.

Agarose-Gelelektrophorese

Durch eine elektrophoretische Auftrennung entsprechend ihrer Größe in Agarosegelen kann die Qualität - insbesondere der Degradationsgrad - extrahierter Ribonukleinsäurefragmente abgeschätzt werden. Nukleinsäuren tragen in wässrigen Lösungen bei neutralem pH durch Dissoziation von Wasserstoffatomen der Phosphorsäurereste negative Ladungen. Lineare doppelsträngige DNA-Moleküle zeigen im elektrischen Feld eine zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes umgekehrt proportionale Wanderungsgeschwindigkeit. Die transluminatorische Darstellung der aufgetrennten Ribonukleinsäurefragmente erfolgte mittels Ethidiumbromid, einem Farbstoff mit positiver Ladung, der während seiner Wanderung zur Kathode zwischen den Ringstrukturen der Basen interkaliert. 500 mg Agarose (SEAKEM LE Agarose, FMC Bio Products, Rockland, ME, USA) wurden durch kurzes Aufkochen in 50 ml 1× TAE Puffer gelöst. Dieses flüssige 1% Agarosegel wurde mit 0,1 μl Ethidiumbromid (2 mg/ml; VWR International, Darmstadt) pro 1 ml Gel versetzt und in eine abgedichtete Plexiglasform gegossen, wobei mittels eines PVC-Kammes nahe der Kathode mehrere Taschen ausgespart wurden. In diese wurden nach Aushärtung des Gels je 2 μl Probe gelöst und in 3 μl Aqua destillata und 1,5 μl 5× TAE Puffer (zur Beurteilung der zurückgelegten Strecke mit Bromphenolblau angefärbt) pipettiert (6,5 μl/ Tasche). Die Elektrophoresekammer wurde mit 1×TAE Puffer gefüllt. Die Auftrennung der RNA erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 80V für 30 Minuten. Anschließend wurden Qualität und Quantität der RNA-Fragmente unter Bestrahlung mit ultraviolettem Licht der Wellenlänge 254 nm beurteilt. Diese Betrachtung lässt Nukleinsäurefragmente infolge der Anlagerung von Ethidiumbromid als fluoreszierende Banden sichtbar werden. Die weitere Dokumentation erfolgte mittels konventioneller Photographie der dargestellten Ribonukleinsäurefragmente. Ein Beispiel zeigt Abbildung 3.1.

Abbildung 3.1: Die Nukleinsäurefragmente werden als fluoreszierende Banden sichtbar

Reverse Transkription

Voraussetzung für eine Analyse und Amplifikation der Nukleinsäuren mittels einer Polymerasekettenreaktion (PCR) ist die Überführung von RNA in komplementäre DNA (cDNA). Hierzu wurde die aus dem Retrovirus Molony Murine Leukosis Virus (MmuLV) gewonnene Reverse Transkriptase mit 5 -3 DNA-Polymerase-Aktivität der Fa. Invitrogen (Karlsruhe) eingesetzt. Nach dem Auftauen wurden alle Substanzen gemischt. Um 1 μg RNA zu gewinnnen, wurde 1μl Probe entsprechend des vorher photometrisch bestimmten RNA-Gehalts gemäß eines im Labor etablierten Protokolls mit Aqua destillata verdünnt. Anschließend wurde folgender Reaktionsansatz hergestellt:

1 μg RNA

4 μl 5× First Strand Buffer (Invitrogen, Karlsruhe)

2 μl dNTP-Mix, 10 mM (Finnzymes OY, Espoo, Finnland)

1 μl p(dN)6 Random Primer

2 μg/μl (Primer-Mix zur unspezifischen Replikationsinduktion; Invitrogen)

1,0 μl Dithiothreonin, 0,1 M (Enzymprotektor; Invitrogen)

1,0 μl Dnase/Rnase free (Roche Diagnostics, Mannheim)

0,5 μl Rnase-Inhibitor (Roche Diagnostics, Mannheim)

Diese Lösung wurde 15 Minuten lang bei 37 C und anschließend 5 Minuten lang bei 70 C im Heizblock inkubiert, um Sekundärstrukturen aufzulösen, und um die Ribonukleinsäuresequenzen zu linearisieren. Im Anschluss an eine zweiminütige Lagerung auf Eis wurden 0,5 μl RNase Inhibitor (40 U/μl; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) und 1 μl Reverse Transkriptase (200 U/μl; Invitrogen, Karlsruhe) hinzugefügt. Nach Inkubation für 60 Minuten bei 39 C und Denaturierung des Reaktionsproduktes erfolgte nach 2 Minuten bei 94 C ebenfalls im Heizblock erfolgte die Lagerung bis zur Weiterverarbeitung bei einer Temperatur von −20 C.

TaqMan-Real-Time-PCR

Das Produkt einer reversen Transkription (cDNA) setzt sich aus einer Vielzahl überwiegend doppelsträngig vorliegender DNA-Fragmente zusammen. Voraussetzung für die Selektivität einer Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifizierung von bestimmten darin enthaltenen Genomabschnitten ist die Kenntnis der Nukleotid-sequenz von DNA-Bereichen, welche die gesuchte Region flankieren. Komplementär zu den 3 -Enden dieser spezifischen DNA-Sequenzen werden zwischen 16 und 30 Basen lange Oligonukleotide synthetisiert, die als Startermoleküle (Primer) für die zugegebene DNA-Polymerase dienen. Diese amplifiziert von dort aus DNA-Abschnitte in 5 -Richtung des Ursprungsstranges. Entsprechend ihres Hybridisierungsortes werden die hergestellten Oligonukleotide unterschieden in forward Primer (hybridisieren am 3 -Ende des zur RNA-Matrize komplementären cDNA-Stranges) und reverse Primer (initiieren die Synthese eines komplementären DNA-Stranges in entgegengesetzter Richtung zur ursprünglichen RNA-Matrize). Die PCR stellt ein Verfahren zur exponentiellen Vermehrung von DNA-Fragmenten in vitro dar. Sie verläuft in einem dreiphasigen Zyklus: Im ersten Schritt (Melting) wird durch Temperaturerhöhung auf 94 C die doppelsträngige DNA nach Lösung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen zu Einzelsträngen denaturiert. Im zweiten Schritt (Annealing) hybridisieren die zu den 3 -Enden der beiden DNA-Einzelstränge komplementären Primer durch Abkühlung des Reaktionsgemisches auf ca. 60 C auf den jeweiligen Matrizen und legen somit den Startpunkt für die DNA-Synthese fest. Diese erfolgt im dritten Schritt (Extension) durch das hitzestabile Enzym Taq-DNA-Polymerase, welches die einzelsträngige DNA bei Temperaturen von 72 C in 3 $\rightarrow$ 5 Richtung zu einem Doppelstrang ergänzt. Diese Schritte werden vielfach wiederholt, woraus sich bei einer Verdopplung der Ausgangs-DNA (Template) in n-Zyklen eine exponentielle Vermehrung mit einem Vermehrungsfaktor von theoretisch $2n$ ergibt. Um geringfügige Unterschiede der Genexpression mit hoher Sensitivität und Spezifität zu quantifizieren, wurde in der vorliegenden Arbeit das sogenannte TaqManTM PCR-Assay eingesetzt. Dieses Verfahren basiert auf dem ursprünglichen 5 -Nuklease-Assay und stützt sich ebenfalls auf die 5 -3 -Exonuklease-Aktivität der AmpliTaq-DNA-Polymerase. Zur Detektion amplifizierter DNA-Abschnitte wird eine spezielle fluorogene Sonde eingesetzt, die aus einem Oligonukleotid besteht. An dessen 5 -Ende ist kovalent ein fluoreszenter Reporter-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat; meist 6-Carboxy-Fluorescein, FAM) gebunden. Das 3 -Ende trägt einen Quencher-Farbstoff (ein Rhodamin-Derivat: 6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin, TAMRA) und ist außerdem mit einem Phosphatrest blockiert, um eine Extension während der PCR zu vermeiden. Die Bindungstemperatur der Sonde sollte 10 C höher liegen als die der Primer, damit sie während der Abkühlphase der PCR als erste binden kann. Wird die intakte Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge (488 nm) zur Fluoreszenz angeregt, unterdrückt die räumliche Nähe zum Quencher die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffes durch einen Fluoreszenz-Energietransfer. Während der Annealing-Phase der PCR hybridisiert zunächst die Sonde und anschließend das genspezifische Primerpaar (Forward Primer, Reverse Primer) an den Matrizenstrang. In der Extensionsphase wird durch Ver-

drängung der Sonde und deren daraus resultierender Y-förmiger Sekundärstruktur die 5 -3 -Exonuklease-Aktivität der AmpliTaq-DNA-Polymerase aktiviert. Die Sonde wird hydrolysiert, und es kommt zu einer Unterbrechung des Fluoreszenz-Energietransfers zwischen Reporter und Quencher (vgl. Abb.3.2). Noch bevor die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase aktiviert wird, werden nicht komplett bindende Sondenmoleküle von der Matrix verdrängt.

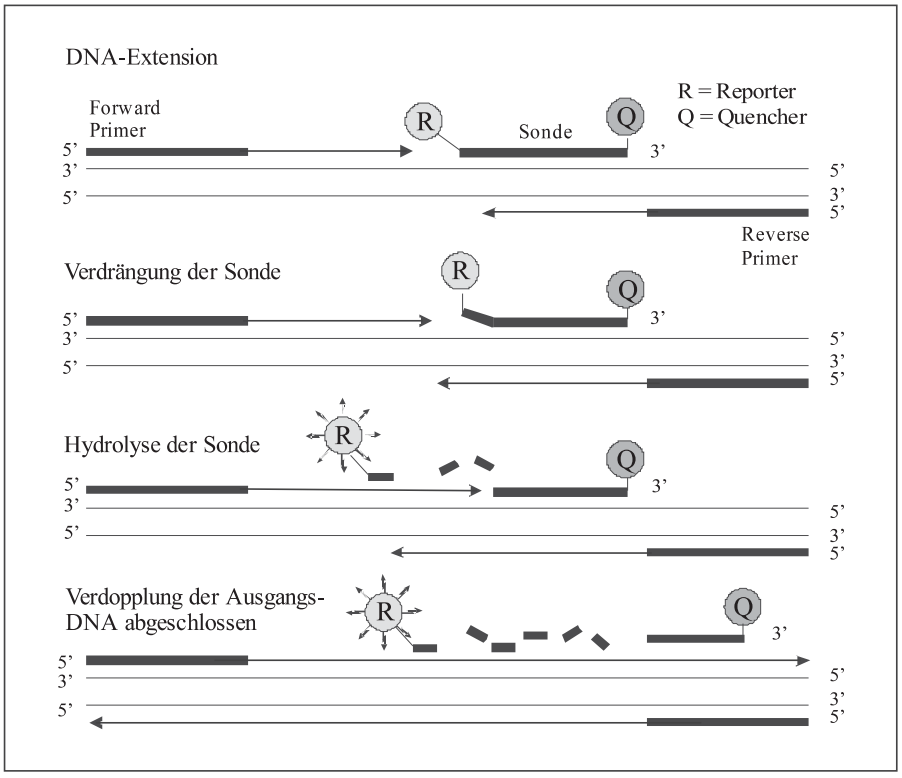


Abbildung 3.2: Prinzip der TaqMan-PCR, bei der während der Extensionsphase die an den Matrizenstrang hybridisierte fluorogene Sonde verdrängt und anschließend durch die 5 -3 -Exonuklease-Aktivität der AmpliTaq-DNA-Polymerase hydrolysiert wird. Dadurch wird die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher unterbrochen und somit die unterdrückende Wirkung des Quencher-Farbstoffes auf die Fluoreszenz des Reporters gelöscht. Die darauffolgende auftretende Emission von Fluoreszenz-Signalen dient der Detektion amplifizierter DNA-Abschnitte (Nach TaqMan Universal PCR Master Mix, Perkin Elmer/ Applied Biosystems, Weiterstadt, 1998, S.2).

Der oben beschriebene Prozess erfolgt bei jedem Zyklus; er interferiert nicht mit der exponentiellen Akkumulation der PCR-Produkte. Die mit jedem PCR-Zyklus zunehmende Emission von Fluoreszenz-Signalen wird mittels eines automatischen Sequenzdetektors in Verbindung mit einer speziellen Software (ABI Prism 7700 Sequence Detection Systems 1.7, Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA) detektiert. Aufgrund der spezifischen Hybridisierung zwischen Sonde und Template, welche benötigt wird, um Fluoreszenz-

Signale zu generieren, werden unspezifische DNA-Amplifikationen nicht detektiert. Die ursprüngliche Menge eingesetzter DNA wird durch Analyse der Fluoreszenzintensität bestimmt. Hierbei normalisiert zunächst ein Algorithmus das Fluoreszenz-Signal der Reporter-Sonde auf eine passive Referenz (FAM, TAMRA, ROX). Anschließend multipliziert dieser Algorithmus die Standardabweichung der Hintergrundfluoreszenzen während der ersten Zyklen (in den meisten PCR-Systemen Zyklus 3-15) mit einem Fehlerfaktor von 10, um einen Schwellenwert zu bestimmen. Als Schwellenzyklus (CT) wird hierbei der Zyklus definiert, der diesen Grenzwert überschreitet. Dessen Absolutwert hängt von der Effizienz sowohl der DNA-Amplifikation als auch des Abspaltens der Sonde ab. Zwischen CT und dem Logarithmus der anfangs eingesetzten Menge an DNA besteht ein linearer Zusammenhang über fünf Zehnerpotenzen hinweg. Die CT-Werte der Proben werden dabei auf eine externe Standardkurve interpoliert, welche mittels Verdünnungsreihen einer definierten cDNA-Probe erstellt wurde.

Proteinverfahren

Um die durch die TaqMan-Real-Time-PCR gewonnenen Ergebnisse auf ihre Aussagekraft hin zu überprüfen, wurde mit Westernblot ein Bestätigungsverfahren durchgeführt. Dieser sollte qualitative Aussagen über die Expression der untersuchten Gene auf Protein- bzw. Zellebene liefern.

Proteinisolierung

Um aus den, wie oben beschrieben gewonnenen Proben aus humaner Plazenta das enthaltene Protein zu isolieren, wurden jeweils zwischen 0,05 und 0,1g des Gewebes in einen 1,5 ml-Reaktionsgefäß eingewogen. Auf Eis wurde jeweils 500 μl modifizierter RIPA-Puffer hinzu pipettiert, bevor das Gewebe mit einem Mörser zerkleinert und mit Ultraschall behandelt wurde. Nachdem die Proben eine Stunde auf Eis gelagert wurden, um die Zellen vollständig aufzuschließen, wurden die Reaktionsgefäße fünf Minuten lang bei 15.000 Umdrehungen pro Minute und 4 C zentrifugiert. Der entstandene proteinhaltige Überstand wurde mit Hilfe einer Pipette abgenommen und aliquotiert. Die Proteinproben wurden bei -80 C eingelagert.

Proteinmengenbestimmung

Um die Protein-Konzentration in der gewonnen Lösung zu bestimmen, wurde mit Hilfe des BCA^{TM} Protein Assay Kits ein BCA^{TM}-Assay nach Pierce (Doppelbestimmung) durchgeführt. Der Nachweismethode liegt die Ausbildung eines Biuretkomplexes in Blauviolett zu Grunde, dessen Konzentration mit Hilfe eines Elisareaders Rückschlüsse auf die vorhandene Proteinkonzentration in der jeweiligen Probe zulässt. Hierzu wurde zunächst eine Verdünnungsreihe ausgehend von der Mischung aus 25 μl Albumin-Standard und 25 μl modifiziertem RIPA-Puffer angesetzt. Die Rektionsgefäße wurden anschließend auf Eis gelagert. Nun wurde die zu messende Proteinlösung im Verhältnis 1:5 und 1:10 mit RIPA-Puffer verdünnt. Jeweils 10 μl der gemischten Proben bzw.

des Standards wurden nun in eine 96well-Platte pipettiert, bevor jeweils 200 μl der Reaktionslösung aus dem BCA^{TM} Protein Assay Kit zugegeben wurden. Dieses „Working Reaget“ setzt sich aus 50 Teilen der Lösung A und einem Teil der Lösung B aus dem Kit zusammen. Nach einer Inkubationszeit von einer halben Stunde bei 37 folgte die photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 562 nm im Elisareader. Durch das Mitführen der Standardreihe konnte auf den Proteingehalt der Proben geschlossen werden, wobei an dieser Stelle der Verdünnungsfaktor wieder mit einberechnet werden musste.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Nach der beschriebenen Proteingewinnung konnte nun ihre Auftrennung nach dem Molekulargewicht folgen. Dazu wurden Trenngele in verschiedenen Konzentrationen gegossen, die sich nach dem Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins richteten. Je kleiner das Protein ist, desto dichter, also höherprozentiger sollte das Gel sein. Die folgende Tabelle stellt die Zusammensetzung der verschiedenprozentigen Gele dar. Die Gießangaben reichten für ein großes Gel ($10 \times 14cm$).

Gel-konzentration	Aqua destillata	30% Acrylamid-Mix	1,5 M Tris (pH 8,8)	10% SDS	10% APS	TEMED
10%	9,9 ml	8,3 ml	6,3 ml	0,25 ml	0,25 ml	0,01 ml
12%	8,2 ml	10,0 ml	6,3 ml	0,25 ml	0,25 ml	0,01 ml
15%	5,7 ml	12,5 ml	6,3 ml	0,25 ml	0,25 ml	0,01 ml

Die Mischung wurde nun mit Hilfe einer Pipette zwischen zwei Glasplatten mit den entsprechenden Maßen von $10 \times 14cm$ gebracht. Die Ränder wurden mit in Aqua destillata gelöster Agarose abgedichtet, und auf das Gel wurde als Schutz gegen Austrocknung und Blasenbildung destilliertes Wasser aufgegossen. Über Nacht härtete das Gel aus. Nach dem Ansetzen des Sammelgels wurde das Wasser abgegossen und das Sammelgel auf das Trenngel aufgebracht. Der Kamm zur Aussparung von 15 Geltaschen wurde eingeschoben. Das Sammelgel setzte sich wie folgt zusammen.
Während der etwa einstündigen Aushärtungszeit des Sammelgels wurden die einzusetzenden Proben vorbereitet. Mit Hilfe der gemessenen Proteinkonzentration wurde errechnet, welches Volumen der gewonnenen Poteinprobe eingesetzt werden musste, um je nach Versuch auf die gewünschten 50 oder 100 μg Protein zu kommen. In einem Reaktionsgefäß wurden zu jedem Proteinanteil jeweils 25 μl Blaupuffer hinzu pipettiert. Das Gemisch wurde mit der entsprechenden Menge RIPA-Puffer auf 100 μl aufgefüllt und im Heizblock für zehn Minuten auf 95 C erhitzt. Nach Auftragen des Proteinmarkers

Aqua destillata	30% Acrylamid-Mix	1,5 M Tris (pH 8,8)	10% SDS	10% APS	TEMED
4,1 ml	1,0 ml	0,75 ml	0,06 ml	0,06 ml	0,006 ml

und dem Einbringen der Proben in die Geltaschen wurde die Elektrophoresekammer mit einfach konzentriertem Laemmli-Puffer aufgefüllt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte nun für die Dauer von etwa einer Stunde bei 90 V (Sammelgel) und je nach zu untersuchendem Protein für zwei bis drei Stunden bei 120 V (Trenngel) beziehungsweise bis der Proteinmarker sichtbar in Banden aufgetrennt war und die Front das Gelende erreicht hatte.
Für die PCR wurden folgende Reagenzien (TaqMan qPCR Kit: Eurogentec, Seraing, Belgien) nach einem standardisierten Protokoll verwendet:

2,50 μl 10x Taq-Buffer II

1,00 μl dNTP-Mix (UTP), 5mM

MgCl2, 50mM (Menge abhängig von Primer, siehe Tabelle 2.1)

0,13 μl AmpliTaq Gold DNA-Polymerase

0,25 μl AmpERase UNg (Schutz vor Kontaminationen durch reamplifizierte übertragene PCR-Produkte)

Aqua destillata (Menge abhängig vom MgCl2-Volumen)

2,5 μl forward Primer (3 oder 6 μM)

2,5 μl reverse Primer (3 oder 6 μM)

2,5 μl TaqMan-Sonde (2 μM)

2,5 μl cDNA-Template

Um Schwankungen der Messwerte aufgrund ungleich eingesetzter RNA- oder cDNA-Mengen auszugleichen, wurden die Genexpressionsdaten zu den sogenannten Housekeeping-Genen, d.h. zu konstant exprimierten Genen, in Beziehung gesetzt. Dabei wurden die Housekeeping-Gene Human hypoxanthine Phosphoribosyltransferase (HPRT) und α2-Mikroglobulin (α 2-MG) verwendet. Die jeweiligen Primer und TaqMan-Sonden sind in Tabelle 3.6 aufgeführt. Tabelle 3.7 zeigt den jeweiligen Reaktionsansatz der PCR. Da die AmpliTaq Gold DNA-Polymerase bereits bei Temperaturen von $>$ 55 C eine signifikante Aktivität besitzt, bietet es sich an, Annealing und Extension zu einem

Human hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT)	
Forward	5`-CCG GCT CCG TTA TGG-C -3‘
Reverse	5`-GGT CAT AAC CTG GTT CAT CAT CA-3`
TaqMan-Sonde	5‘-(FAM)-CGC AGC CCT GGC GTC GTG ATT A-(TAMRA)3‘
Alpha2-Mikroglobulin (alpha2MG)	
Forward	5‘-TGA CTT TGT CAC AGC CCA AGA TA-3‘
Reverse	5`-CCA AAT GCG GCA TCT TC-3`
TaqMan-Sonde	5`(FAM)-TGA TGC TGC TTA CAT GTC TCG ATC CCA-(TAMRA)3‘
Corticoin resleasing protein (CRH)	
Forward	5‘- CAG CCA CTG TCA GGA CCT CAG CAC G-3‘
Reverse	5‘-CGG CAG CCG CAT GTT AG-3‘
TaqMan-Sonde	5‘(FAM)- AAA GGA GAC AAT TTG GCT CTG C-(TAMRA)3‘
11ß-Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 2 (11ß-HSD2)	
Forward	5‘-CCG TAT TGG AGT TGA ACA GCC-3‘
Reverse	5‘-CAA CTA CTT CAT TGT GGC CTG C-3‘
TaqMan-Sonde	5‘(FAM)-CTA GAG TTC ACC AAG GCC CAC ACC ACC-(TAMRA)3‘

Tabelle 3.6: Primer für die TaqmanPCR

Primer	MgCl2	MgCl2	Aqua dest.
CRH	3,0 mM	1,75 μl	9,37 μl
11βHSD2	3,5 mM	2,00 μl	9,12 μl
HPRT	4,50 mM	2,25 μl	8,87 μl
ß2-MG	5,00 mM	2,50 μl	8,62 μl

Tabelle 3.7: Menge und Volumen von MgCl2 bzw. Aqua destillata im Reaktionsansatz der PCR in Abhängigkeit vom dazugehörigen Primer.

gemeinsamen Schritt bei 60 C zusammenzufassen. Die Durchführung der Extensionsphase bei einer Temperatur <72 C besitzt einen positiven Einfluss auf die Bindung der Sonde. Dadurch dass deren Hydrolyse durch die 5 -3 -Exonuklease-Aktivität der AmpliTaq Gold DNA-Polymerase effizienter verlaufen kann, lässt sich oftmals ein Anstieg des sequenz-spezifischen Fluoreszenz-Signals verzeichnen. Ein durchgeführter PCR-Lauf umfasste somit zunächst zwei Denaturierungsphasen von 2 Minuten bei 50 C (Verhinderung der Carry-Over-Kontaminationen mit Uracil-N-Glycosylase) sowie 10 Minuten lang bei 95 C (zur Inaktivierung der Uracil-N-Glycosylase und Aktivierung der AmpliTaq Gold DNA-Polymerase/hot start PCR). Anschließend folgte die eigentliche 2-Schritt-PCR zu 40 Zyklen mit Heizphasen von je 15 Sekunden Dauer bei 94 C und 1 Minute Dauer bei 60 C. Lediglich bei der Messung von ApM1 wurde wegen der späten Reaktion die Zykluszahl auf 45 erhöht. Ein abschließender Schritt von 10 Minuten Dauer bei 72 C diente der Verlängerung aller unvollständigen PCR-Produkte. Die Quantifizierung der Startkopienzahl der eingesetzten cDNA erfolgte relativ zu Verdünnungsreihen definierter Standards, wofür bei allen Genen Plazentagewebe einer bestimmten Probe verwendet wurde. Zudem erfolgte stets eine Negativkontrolle mit HPLC-Wasser anstelle eines Templates, um Kontaminationen zu detektieren.

Statistik

Zur Quantifizierung der Genexpression wurden keine Absolutwerte verwendet sondern relative Einheiten aus den Quotienten der zu untersuchendem Genen und den Housekeeping-Genen HPRT und α2-Mikroglobulin. Diese relativen Werte bildeten die Grundlage für die statistischen Auswertungen. Alle Werte wurden in Tabellen und Grafiken als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (SD) dargestellt. Als Statistikprogramm diente GraphPad Prism 3.0. Nach nach der Prüfung bzgl. einer Gaußverteilung wurden normalverteilte Daten mit dem t-Test nach Student, nicht normalverteilte mittels des Mann-Whitney-Tests auf ihre statistische Signifikanz hin verglichen. Um die Daten auf Korrelationen hin zu prüfen, wurden der Test nach Pearson für normalverteilte Werte, der Test nach Spearman für nicht normalverteilte Werte, sowie die lineare Regressions-Analyse durchgeführt. Ein p-Wert von <0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen. Die Daten wurden nur dann als signifikant beurteilt, wenn die Ergebnisse in Relation zu beiden untersuchten House-keeping-Genen signifikant waren. Zur Darstellung der Kontingenztabellen diente das Programm Instat 3, wobei der Chi-Quadrat-Test und bei einer geringeren Zahl an Messwerten der Fisher‘s exact test benutzt wurde. Auch hier galt ein p-Wert <0,05 als statistisch signifikant.

3.2.4 Western-Blot

Nach dem Ende der Elektrophorese wurden die Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel mit Hilfe eines Semitrockentransfers auf eine Nitrocellulose-Membran überführt. Dies geschah nach folgendem Prinzip:

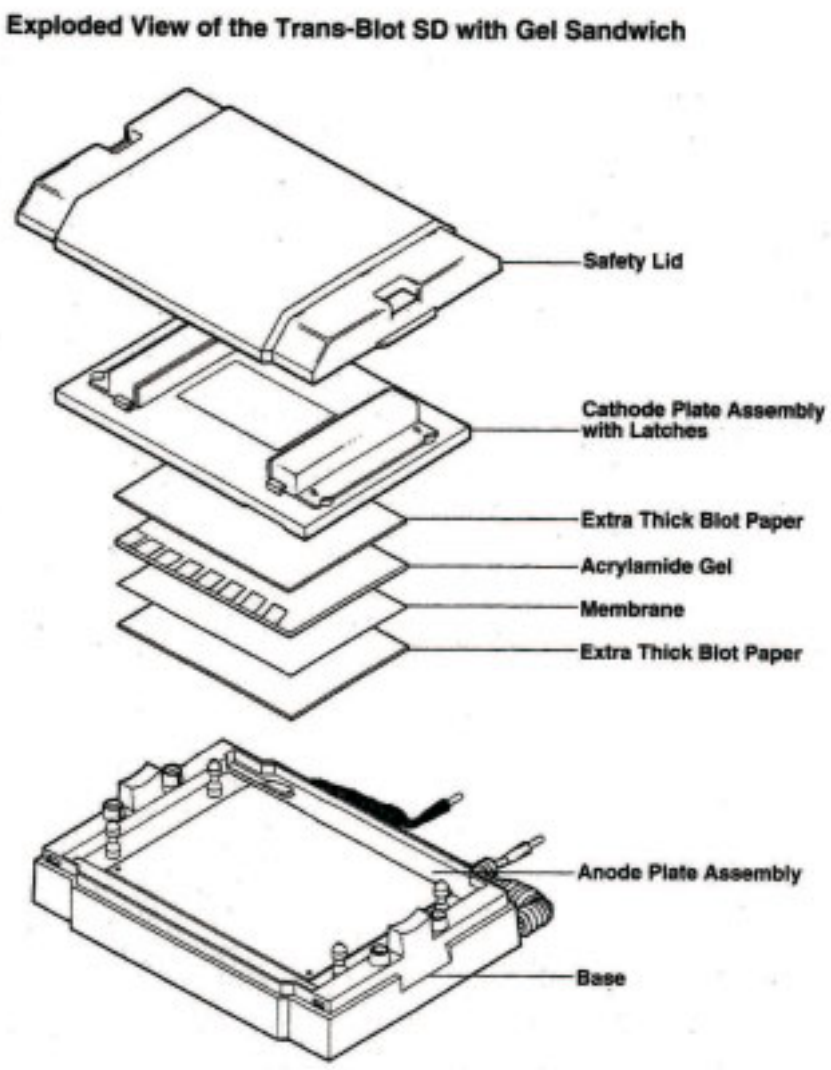


Abbildung 3.3: übernommen aus der Arbeitsanleitung zur Semi-Dry Blotkammer „Trans-Blot SD“ von Bio-Rad (Vgl. Punkt „Geräte“)

Vor dem Start des Semitrockentransfers wurde die Nitrocellulose-Membran in Wasser kalibriert, während die extradicken Whatman-Papiere in einfach konzentriertem Blotpuffer (1x Toubin-Puffer) eingeweicht wurden. In der Transferkammer wurde dann auf zwei Whatman-Papiere die zuvor noch kurz in Blotpuffer getauchte Nitrocellulose-Membran aufgelegt, worauf wiederum das Gel und zwei weitere Whatman-Papiere aufgebracht wurden. Um Luftblasen zu vermeiden, wurde mehrfach mit einer Walze über das obenauf liegende Papier gerollt. Nach einem weiteren Befeuchten des Stapels mit Blotpuffer wurde der Transfer der Proteine von Kathode in Richtung Anode gestartet. Der Blotvorgang erfolgte mit 1,2mA/cm2, bei einem großen Gel mit den Maßen $10 \times 14cm$ also mit 168 mA. Je nach Molekulargewicht des untersuchten Proteins dauerte das Blotten zwischen 60 und 90 Minuten. Die Effizienz des Transfervorgangs wurde danach beurteilt, wie deutlich die Banden des aufgetrennten Proteinmarkers auf der Nitrocellulose-Membran sichtbar waren. Weiterhin wurde die Membran mit Ponceau S-Färbelösung eingefärbt, um die Gleichmäßigkeit des Blots und die transferierte Poteinmenge abschätzen zu können. Die Blockierlösung zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen wurde im Anschluss an das Entfärben durch Waschen in 1x TTN, 1x TN und 1x TTN für jeweils etwa fünf Minuten auf die Nitrocellulose-Membran aufgebracht. Der Blockiervorgang dauerte schüttelnd zwei Stunden bei Raumtemperatur bzw. die Nacht über bei 4 C. Nach dem Abkippen der Blockierlösung wurde die Membran nun zusammen mit dem mit Milchpulver in 1x TTN gelösten Erstantikörper in Plastikfolie eingeschweißt und zwei Stunden bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 4 C behandelt (schüttelnd). Anschließend wurde die Membran erneut für jeweils etwa 15 Minuten in 1x TTN, 1x TN und 1x TTN gewaschen. Es folgte das Aufbringen des Zweitantikörpers, ebenfalls in 15 ml Milchpulverlösung, und das erneute Einschweißen in Plastikfolie. Nach dem schüttelnden Inkubieren für 45 Minuten bei Raumtemperatur folgten erneut drei Waschschritte in 1x TTN, 1x TN und 1x TTN für jeweils 15 Minuten. Die Detektion der Bindungen erfolgte in der Dunkelkammer mit Hilfe der Elektrochemilumineszenz (ECL). Hierzu wurde das ECL Plus Western Blotting Detection System nach den Angaben des Herstellers verwendet, wobei 250 μl der Lösung B mit 10 ml der Lösung A aus dem Kit gemischt wurden. Die Nitrocellulosemembran wurde daraufhin für fünf Minuten in der Reaktionslösung geschwenkt. Die ECL-Lösung enthält Luminol, welches durch den Sekundärantikörper oxidiert wird und in diesem Zustand ein Lichtsignal aussendet. Anschließend wurde die Nitrocellulose-Membran möglichst blasenfrei in Frischhaltefolie eingewickelt und eine Röntgenkassette gelegt. Darauf wurde der Röntgenfilm aufgelegt. Je nach Signalintensität betrug die Belichtungsdauer zwischen 30 Sekunden und 15 Minuten. Daraufhin folgte das Entwickeln des Röntgenfilms: Nach etwa ein- bis zweiminütigem Schwenken in Entwicklerlösung wurde der Film kurz gewässert (etwa 20 bis 30 Sekunden), um dann für ca. drei Minuten in Fixierlösung geschwenkt und abschließend für zehn Minuten erneut gewässert zu werden.

Stripping

Zur Qualitätskontrolle der Ergebnisse des vorausgehenden Western Blots wurde auf die Nitrocellulosemembranen im Anschluss ein weiterer Antikörper aufgebracht. Der gegen β-Actin gerichtete Primärantikörper dient zum Nachweis des ubiquitär vorkommenden Proteins, das sowohl in IUGR- als auch in AGA-Kontrollen bei gleichem Proteineinsatz auch in gleichem Maße nachzuweisen sein sollte. Somit wurde also abschließend ausgeschlossen, dass die Ergebnisse des vorausgehenden Western Blots durch Unterschiede in der eingebrachten Proteinmenge hervorgerufen worden sind. Die Nitrocellulosemembran wurde zu diesem Zweck nach dem Waschen in einfach konzentriertem TTN-Puffer für zehn Minuten zunächst gemeinsam mit einer ausreichenden Menge an Stripping-Puffer in eine Plastikfolie eingeschweißt. Es folgten die Inkubation für 30 bis 45 Minuten im Wasserbad bei 50 C sowie ein weiterer Waschvorgang in einfach konzentriertem TTN-Puffer für etwa 15 Minuten. Erneut wurden mit der BSA-haltigen Blockierlösung unspezifische Bindungsstellen abgesättigt, wozu die Membran zwei Stunden lang bei Raumtemperatur (oder über Nacht bei 4 C) in der Lösung gewaschen wurde. Nach einem erneuten Waschvorgang in TTN-Puffer folgte das Aufbringen des Primärantikörpers gegen β-Actin. Der Antikörper wurde zuvor in der Verdünnung von 1:1000 in Milchpulverlösung eingebracht. Die Nitrocellulosemembran wurde daraufhin gemeinsam mit der entstandenen Lösung in Plastikfolie eingeschweißt und bei 4 C über Nacht bzw. bei Raumtemperatur für zwei Stunden inkubiert. Um verbliebene Reste der Lösung auf der Membran zu beseitigen, wurde diese abwechselnd in 1x TTN- bzw. 1x TN-Puffer für jeweils 15 Minuten gewaschen. Der passende Sekundärantikörper anti goat wurde anschließend auf dieselbe Weise mit Milchpulverlösung versetzt und mit der Memban eingeschweißt, um für 45 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt zu werden. Nach weiteren Waschvorgängen folgte die Aktivierung der Immunfluoreszenz-Reaktion wie oben mit Hilfe des ECL Plus Western Blotting Detection Systems sowie Belichtung und Entwicklung der Röntgenfilme.

3.2.5 Materialien

Geräte

Produkt	Hersteller
ABi PRISM 7700 Sequence Detection System	Perkin-Elmer/Applied Biosystems, Weiterstadt
Autoclav	Varioclav Typ 400 EP-Z, H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Blotkammer	Trans-Blot SD, Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

Blotpapier	Whatman Schleicher + Schuell, GB005, Gel Blotting Papier, Whatman GmbH, Dassel
Chloroform	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Eismaschine	Scotsman Enodis , Frimont S.p.A, Bettolino di Pogliano, ITA
Elektrophoresekammer	Power Pac 300, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA Typ P9DS, Owl Separation Systems Inc., Portsmouth, NH, USA
Falcons	15 ml und 50 ml, Conical Tubes, Falcon , Bacton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
Film	Kodak Bio Max Light Film, Scientific Imaging Film, Kodak Industrie, Chalon-sur-Saone, FRA
Gefrierschrank -80	Typ HFU 586 STD-V14, Herafreeze, Heraeus Instruments GmbH, Osterode
Gefrierschrank -20	Economic super, Robert Bosch GmbH, Gerlingen LowEnergy, Electrolux Hausgeräte Vertriebs GmbH, Nürnberg
Geldokumentation	INTAS GDS-System, INTAS , Göttingen
Haushaltsfolienschweißgerät	Severin Folio, Severin, Sundern
Homogenisator	Polytron PT 3000, Kinematika AG, Luzern, CH
Kassette	Siemens Orthex 13x18
Kühlschrank $4C$	LowEnergy, Electrolux Hausgeräte Vertriebs GmbH, Nürnberg
Magnetrührgerät	RCTbasic, IKA Labortechnik Janke + Kunkel GmbH + Co. KG, Staufen
Mikrowellenherd	Quickchef 650, Moulinex, Solingen privileg8020, Typ M1716, Privileg/Quelle, Fürth
Millipore-Anlage	Milli Q PF Plus, Millipore S.A., Molsheim, FRA
Nitrocellulose-Membran	Whatman Schleicher + Schuell, 45μm, Whatman GmbH, Dassel
PCR Optical Tubes	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Photometer	BioPhotometer 6131, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Pipetten	Eppendorf Reference Variabel, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg Pipetman, Gilson Inc., Middleton, USA Labmate, ABiMED HTL,Analysen-Technik GmbH, Langenfeld pipetus -akku, Hirschmann Laborgeräte GmbH + Co. KG, Eberstadt

Pipettenspitzen	Filtertips DNase-free, sterile, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg Art Molecular Bioproducts, Inc, San Diego, USA verschiedene Größen, Sarstedt AG + Co. KG, Nümbrecht Kapillarspitzen, Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf Multi -Pipettenspitzen Kristall, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Costar, SRIPETTE , Corning Inc., Corning, USA
Skalpell	Produkte für die Medizin AG, Köln. Disposable Scalpel, Feather Safety Razor CO., LTD., JAP
Schalen	USA/Scientific Plastics (Europe), UK
Schüttler	Mini Rocker, Typ Bio MR-1, PeQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Stromgeber	Power Pac 300, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Thermoblock	TRIO-Thermoblock, Biometra, Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen Thermomixer 5436, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Tubes/Cups	verschiedene Größen, Sarstedt AG + Co., Nümbrecht
UV-Lampe	Foto/PrepI Typ FLX-20M950903, Biometra, Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen
Vakuumpumpe	PM 12617-86, Biometra, Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen
Vortexer	REAX 1D, Heidolph, Kelheim Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Inc. Laboratory Equipment, Bohemia, USA
Waage	Typ LC 421, Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad	Typ U 3/8, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Zentrifugen	Typ EBA 12 R, Hettich, Tuttlingen Rotanda ITRC, Hettich, Tuttlingen Typ 1000, Tischzentrifuge, Hettich, Tuttlingen Micro Centrifuge, Model SD, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Chemikalien

Produkt	**Hersteller**
Acrylamid/Bisacrylamid	Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn
Agarose	Seakem LE Agarose for gel electrophoresis, Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Ammoniumpersulfat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Aprotinin	Sigma -Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Aqua destillata	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
BioArray transcript kit	BioArray high-yield transcript labeling kit, Enzo Diagnostics, NY

BSA(bovinesa erumalbumin)	Albumin bovine Fraction V, pH 7,0, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Bromphenolblau	Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn
Chloroform	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
dNTP-Lösung	Finnzymes OY, Espoo, FIN
DTT (Dithiothreitol)	nvitrogen GmbH, Karlsruhe Sigma -Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
ECL-Kit	ECL Plus Western Blotting Detection System, GE Healthcare Ltd., Little Chalfont, UK
Entwickler	Roentgenogen liquid, Röntgen-Rapid-Entwickler, Tetenal AG + Co. KG, Norderstedt
Essigsäure 100 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn
Ethidiumbromid	VWR International, Darmstadt
Fixierer	Roentgenogen Superfix, Röntgen-Fixierlösung, Tetenal AG & Co. KG, Norderstedt
Gene-Chip	Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 Chip
Glycerin	Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn
Glycerin/Glycerol	Serva/Boehringer Ingelheim, Bioproducts Partnership, Heidelberg
Glycin	Sigma -Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Isopropanol	Sigma -Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Leupeptin	Sigma -Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ligase	E.coli ligase, TaKaRa Biomedical Europe, Genneviliers, France
Marker Kaleidoscope	Proteinmarker IV (Prestained), PeQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Methanol	Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn
Milchpulver	Blotting grade, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumfluorid	Sigma -Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumorthovanadat	Sigma -Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Reverse Transkriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
PCR Primer	Eurogentec, Seraing, BEL
PCR Sonden	Eurogentec, Seraing, BEL
Pepstatin A	Sigma -Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Pepstatin A	Sigma -Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Phase-Lock Gel	Phase-Lock Gel, Eppendorf, Hamburg, Germany

PMSF (Phenylmethylsulfonylflourid)	Sigma -Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Polymerase I	E.coli DNA polymerase I Life Technologies, Karlsruhe, Germany
Ponceau S	Practical Grade, Sigma -Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Reinigungskit	RNeasy mini kit, Qiagen, Hilden, Germany
RNAse	RNAse H,TaKaRa Biomedical Europe, Genneviliers, France
RNase-Inhibitor	Roche Diagnostics, Mannheim
RNeasy mini kit	Qiagen, Hilden, Germany
SDS (Dodecylsulfat Natriumsalz)	Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn
Superscript II	Superscript II, Life Technologies, Karlsruhe, Germany
TaqMan qPCR Kit	Eurogentec, Seraing, Belgien
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH
Tris	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
TRIZOL Reagent	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Tween 20 (Polyoxylethylen-Sorbit-Monoaurat)	Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn

Zusammensetzungen

Blaupuffer (8 ml)
120 mg DTT in 4,4, ml Aqua destillata
1 ml Sammelgelpuffer (Zusammensetzung: Vgl. unten)
0,8 ml Glycerin/Glycerol
1,6 ml SDS 10%
0,2 ml Bromphenolblau 0,1%

Blockierlösung (50 ml)
2,5 g Milchpulver
1 g Bovines Serumalbumin
50 ml 1x TTN

Laemmli-Elektrophoresepuffer (10 l) 10x
290 g Tris
1440 g Glycin
100 g SDS
Aqua destillata 10 l

Milchpulverlösung (50 ml)
2,5 g Milchpulver
50 ml 1x TTN

Ponceau S Färbelösung
0,1% Ponceau
5% Eisessig

RIPA-Puffer, modifiziert (5 ml)
1 μl Aprotinin
3,4 μl Pepstatin A
5 μl Leupeptin
25 μl Na3VO4
25 μl Natriumfluorid
25 μl PMSF (kurz vor Gebrauch dazu geben)

Sammelgelpuffer (1,0 M Tris, pH 6,8, 100 ml)
6 g Tris
Aqua destillata 100 ml (pH-Wert gegebenenfalls mit HCl 32% einstellen)

TaqMan qPCR Kit
AmpEraseUNg
AmpliTaqGold
beneAmp 10x PCR-Buffer II
dNTP-Lösung
MgCl2, 50mM

TAE-Puffer (1000 ml) 50x
242 g Tris
57,1 ml Eisessig
100 ml 0,5M Na2-EDTA
Aqua destillata 1000 ml

TAE Auftragspuffer(1000 ml) 5x
10% Glycerin
0,08% Bromphenolblau
1xTAE (20 ml 50xTAE ad 1000ml Aqua destillata)

TN-Puffer (1000 ml, pH 7,5) 10x
58,44 g NaCl
12,11 g Tris
1000 ml Aqua destillata
(gegebenenfalls pH-Wert mit HCl 32% einstellen)

TTN-Puffer 10x
10x TN-Puffer
0,05 % Tween 20

Toubin Blotpuffer 10x
30,3 g Tris
144 g Glycin
1000 ml Aqua destillata
(kurz vor Gebrauch zu 1x Toubin Blotpuffer 20% Methanol hinzufügen)

Trenngelpuffer (1,5 M Tris, pH 8,8)
90,75 g Tris
500 ml Aqua destillata
(gegebenenfalls pH-Wert mit HCl 32% einstellen)

Antikörper

Im Westernblot wurden folgende Antikörper verwendet:

Erstantikörper	Zweitantikörper	Hersteller
11βHSD2	Anti-Chicken IgY, HRP Conjugate, Catalog No. G135	Promega Corporation, Madison, USA

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse des Genarray

Im Genarray Verfahren wurden einige Plazenten, mittels Mikroarray- Technik, mit Hilfe des Affymetrix $HG-U133$ Plus Chip voruntersucht. An neun Plazenten von IUGR-Babys, sowie sieben Kontrollplazenten wurden 38000 Gene auf differentiell regulierte Expression hin untersucht und mit dem Mann-Whitney-Test statistisch ausgewertet. Gewertet wurden Ergebnisse mit p 0.05 und registrieten positiven Signalen in mindestens 33% der Proben. In den IUGR-Proben wurden so 241 differentiell regulierte Faktoren gefunden, von denen 190 stimuliert (2fach) und 51 supprimiert (0.05fach) waren. Nach Auswertung wurden 45 ausgeschlossen, da ihre Signalintensität gering war und sich nicht sicher vom Hintergrund abhob. Auch das von mir zu untersuchende Hormon CRH konnte dabei als diffelrentiell reguliert ausfindig gemacht werden. Wie der Tabelle 3.1. entnommen werden kann, wurden für das Gen CRH in IUGR-Plazenten 3.8 fach höhere Werte gemessen als in Kontrollplazenten. Nach Ausschluss von cDNA Proben, die bisher keinem genauen Gen zugeordnet werden können, wurden von den übrigen folgende, in Tabelle 4.1 dargestellten, upregulierte Gene in der FIPS Studie näher untersucht [58].

	IUGR vs Kontrolle	Kontrolle vs IUGR
IGFBP1	116,6	0,0
Tachykinin	18,4	0,1
MAO-B	12,9	0,1
Prolaktin	7,8	0,1
Leptin	5,2	0,2
CRH	3,8	0,3

Tabelle 4.1: Ergebnisse des Genarreys

4.2 Statistisch ausgewertete Ergebnisse der Taqman-PCR

In der vorliegenden Arbeit werden überwiegend Ergebnisse aus Genexpressionsmessungen dargestellt. Es erfolgte keine absolute, sondern eine relative Quantifizierung der jeweiligen mRNA-Mengen. Diese werden als relative Einheiten des zu untersuchenden Gens im Verhältnis zum Housekeeping-Gen angegeben.

4.2.1 Statistik der ermittelten Werte bei der Expression von 11β HSD2 im Vergleich innerhalb genannter Kollektive

In vorangegangenen Studien der Universitätskinderklinik Erlangen, konnte bereits eine, im Vergleich zu Plazenten gesunder Kontrollpatienten differentiell regulierte Genexpression von 11β HSD2 bei IUGR- bzw. Präeklampsieplazenten bewiesen werden [57][52][51]. Ebenso wurde bereits, eine signifikant positive Korrelation der Expression von 11β HSD2 mit dem Geburtsgewicht [57], sowie eine mit zunehmendem Gestationsalter signifikant ansteigende Genexpression des Cortisol metabolisierenden Enzyms 11β HSD2 in der Plazenta nachgewiesen [56]. Auf diese Studien aufbauend und ergänzend zu diesen, sollten durch meine Untersuchungen weitere mögliche differentielle Regulationen von 11β HSD2 in verschiedenen pathologischen Schwangerschaftsveränderungen, insbesondere im Vergleich von AGA, SGA, IUGR und Präeklampsie erkannt werden. Im folgenden möchte ich die Ergebnisse der Untersuchungen der Proben mittels Taqman-PCR nach der in Kapitel 3.1 beschriebenen Kollektivkonstellation darstellen. Die Abbildungen zeigen die Expression in Relation zu den Housekeeping-Genen HPRT und α Mikroglobulin.

Kollektiv 1

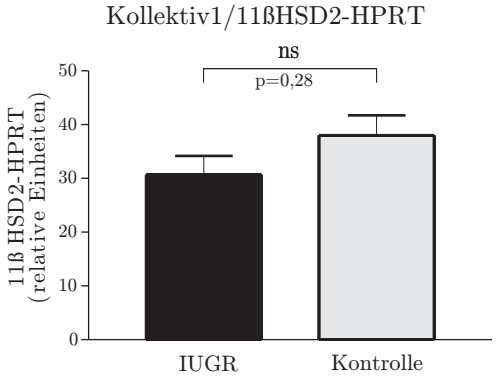


Abbildung 4.1: Kollektiv 1: 11β HSD2-Expression im Vergleich von IUGR- und Kontrollgruppe; *HPRT:p=0,28*

Im Kollektiv 1, also beim Vergleich zwischen IUGR-Plazenten und Kontrollplazenten, zeigten die Ergebnisse bezogen auf die beiden Houskeepinggenen, Mikroglobulin und HPRT, keine signifikant verminderte Expression von 11β HSD2 (HPRT: p=0,28; MG: p=0.15) in den Plazenten der IUGR-Gruppe. Jedoch ist eine tendenziell erniedrigte Exprimierung zu bemerken. Abbildung 4.1 zeigt diese Ergebnisse noch einmal in Diagrammform.

Kollektiv 2

Beim Vergleich der SGA-Probengruppe und der Kontroll-Gruppe zeigt sich im Kollektiv 2 bei P-Werten von: HPRT:p=0,13 und MG:p=0,12 keine signifikant erniedrigte Exprimierungen von 11β HSD2 der SGA-Plazenten. Es kann jedoch ein Tendenz zur niedrigeren Expression von 11β HSD2 bei SGA-Plazenten festgestellt werden. Siehe Abbildung 4.2.

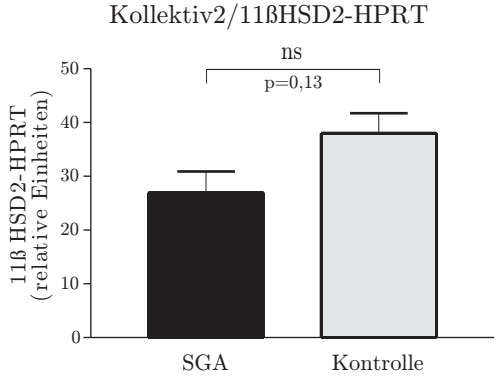


Abbildung 4.2: Kollektiv 2: 11β HSD2-Expression im Vergleich von SGA- und Kontrollgruppe; *HPRT:p=0,13*

Kollektiv 3

Im Kollektiv 3 wurden die Unterschiede der 11β HSD2-Expression zwischen SGA- und IUGR-Plazenten untersucht. Signifikanzunterschiede konnten hier nicht festgestellt werden. Die p-Werte liegen für HPRT für p=0,26 und bei MG bei p=0,05. So kann vorallem bezogen auf MG von starker Tendenz hin zur höheren Expression bei IUGR-Plazenten gesprochen werden. Graphisch ist dies in Abbildung 4.3 dargestellt.

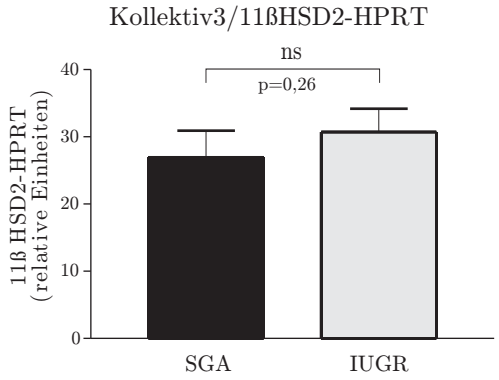


Abbildung 4.3: Kollektiv 3: 11β HSD2-Expression im Vergleich von IUGR- und SGA- Gruppe; *HPRT:p=0,26*

Kollektiv 4

Die Signifikanzunterschiedssuche zwischen Präeklampsie-Gruppe und Kontrollgruppe war negativ. Mit p-Werten für HPRT: p= 0,07 und für MG: p= 0,43 kann allenfalls von einer tendenziell erniedrigten Expression bei der Präeklampsiegruppe gesprochen werden. Abbildung 4.4 zeigt dies in graphischer Darstellung.

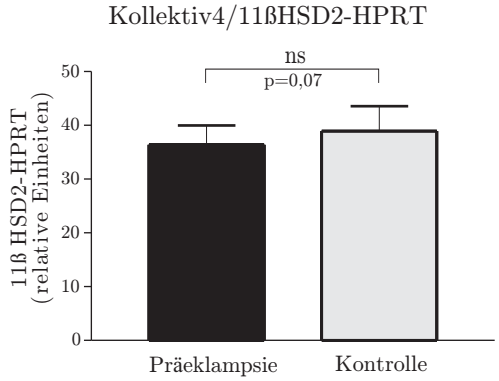


Abbildung 4.4: Kollektiv 4: 11β HSD2-Expression im Vergleich von Präeklampsie- und Kontrollgruppe; *HPRT:p=0,07*

Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Kollektiven 1 bis 4

Zusammenfassend kann man sagen, dass, obwohl in keinem der untersuchten Kollektive eine Signifikanz festgestellt werden konnte, sich eine Tendenz hin zu einer verminderten Expression von 11β HSD2 bei klein geborenen Kindern im Vergleich zu normal groß geborenen Kindern abzeichnet. Grundsätzlich bestehen keine statistisch signifikanten Expressionsunterschiede von 11β HSD2 zwischen den beiden hier behandelten Formen von Wachstumsrückstand, SGA und IUGR.

4.2.2 Statistik der ermittelten Werte bei der Expression von CRH im Vergleich innerhalb genannter Kollektive

Nach signifikanten Expressionsunterschieden von CRH zwischen IUGR- und Kontrollplazenten in der Genarray-Untersuchung, wurden erweiterte und veränderte Probenkollektive mittels Taqman-PCR auf mRNA Expressionsunterschiede untersucht.

Kollektiv 1

Der Vergleich zwischen IUGR- und Kontroll-Plazenten führte zu folgenden Ergebnissen: Mit einem P-Wert von: p=0,003 (bei HPRT) und einem P-Wert von p=0,02 (bei MG) zeigte sich eine eindeutig signifikant erhöhte Expression von CRH bei IUGR-Plazenten. Graphisch sind die Daten in Abbildung 4.5 dargestellt.

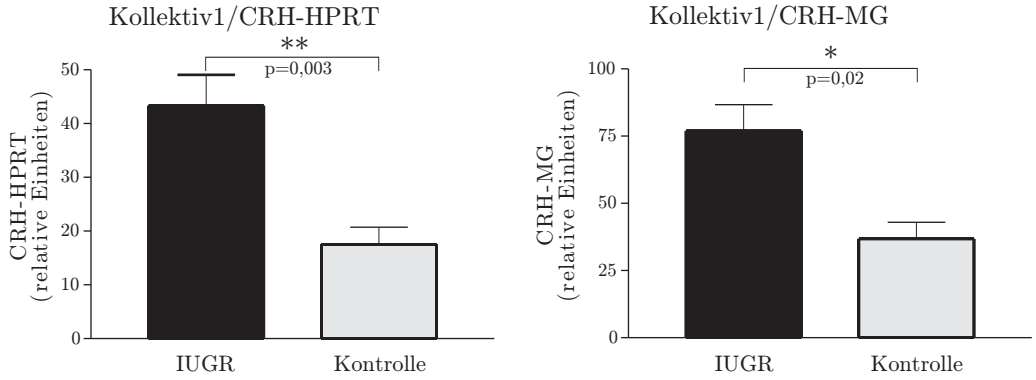


Abbildung 4.5: Kollektiv 1: CRH- Expression im Vergleich von IUGR- und Kontrollgruppe; *HPRT:p=0,003; MG: p=0,02*

Kollektiv 2

Im Kollektiv 2 konnte keine Signifikanz zwischen SGA- und Kontrollplazenten festgestellt werden. Deskriptiv kann bei p-Werten von p=0,19 bzgl. HPRT und p=0,12 bzgl MG durchaus von Tendenzen hin zur niedrigern Expression bei gesunden Kindern gesprochen werden. Wie dies in Abbildung 4.6 deutlich wird.

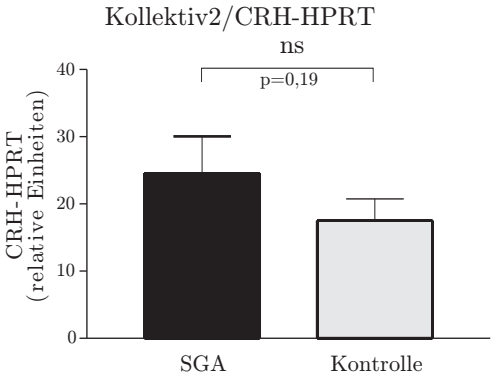


Abbildung 4.6: Kollektiv 2: CRH- Expression im Vergleich von SGA- und Kontrollgruppe; *HPRT:p=0,2; MG: p=0,12*

Kollektiv 3

Im Vergleich von IUGR- mit SGA-Plazenten zeigte sich auf HPRT bezogen eine Tendenz (p=0,09), auf MG bezogen eine klare Signifikanz (p=0,0046), einer niedrigeren Expression von CRH bei SGA-Plazenten, wie dies in Abbildung 4.7 gezeigt ist.

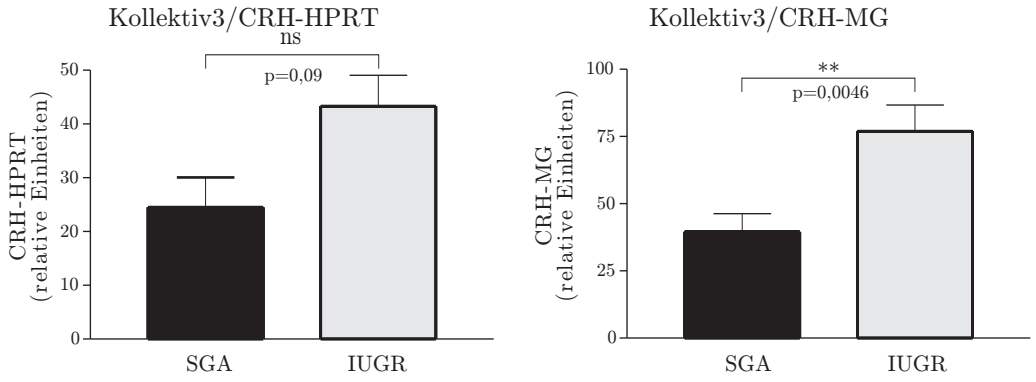


Abbildung 4.7: Kollektiv 3: CRH- Expression im Vergleich von IUGR- und SGA- Gruppe; *HPRT:p=0,09; MG: p=0,0046*

Kollektiv 4

Beim Vergleich der Präeklampsiegruppe mit der Kontrollgruppe kann in allen Messungen eine signifikant erhöhte Expression von CRH in der Präeklampsiegruppe festgestellt werden. In Bezug zu beiden Houskeepinggenen beträgt der P-Wert <0.005. Somit ist sowohl im einzelnen, als auch gesamt (P-Werte: HPRT:p=0,003; MG:p=0,0002) eine statistischen Signifikanz gezeigt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.8 dargestellt.

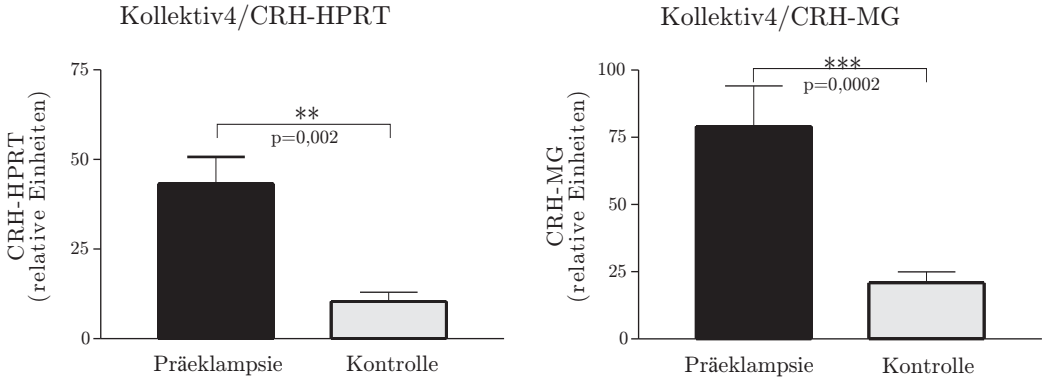


Abbildung 4.8: Kollektiv 4: CRH- Expression im Vergleich von Präeklampsie- und Kontrollgruppe; *HPRT:p=0,002; MG: p=0,0002*

Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Kollektiven 1 bis 4

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die erwähnten statistischen Ergebnisse bei Genarray-Untersuchungen auch auf Taqmen-PCR-Ebene nachgewiesen werden können. Eine erhöhte Expression von CRH in IUGR-Plazenten konnte als signifikant bestätigt werden. Die Ergebnisse der Untersuchung zwischen Kontrollen und SGA machen einen Zusammenhang zwischen Expression von CRH und Entstehung von SGA unwahrscheinlich. Der Vergleich zwischen SGA und IUGR mit tendenzieller, bis signifikanter Hochregulation bei IUGR-Plazenten lässt nocheinmal die besondere Rolle von CRH bei pathologischen Formen von Wachstumsrestriktionen deutlich werden. Die Ergebnisse im Vergleich von Präeklampsie- und Kontrollplazenten zeigen Zusammenhänge zwischen CRH und der Entstehung von Präeklampsie.

4.2.3 Korrelationen zwischen 11HSD-Expression und Geburtsdaten

Von Interesse für das Gesamtverständnis bestimmter pathogenetischen Faktoren und deren Einfluss auf die Ausprägung gewisser Veränderungen schienen auch mögliche Korrelationen zwischen Genexpression und bestimmten individuellen Geburtsdaten, wie Geburtsgewicht, Geburtslänge und Plazentagewicht, deren Untersuchugsergebnisse in den folgenden Abschnitten dargestellt sind. Auch hier wurden die Rohdaten zunächst auf beide Houskeepinggenen bezogen und anschliessend die gesammelten Daten miteinander auf Korrelation getestet.

Untersuchungen zur Korrelation zwischen 11β HSD2-Expression und Geburtsgewicht

In vorangegangenen Studien wurden klare Zusammenhänge zwischen Geburtsgewicht und 11β HSD2- Expression in der Plazenta beschrieben. In unsere Studie sollten vor allem Zusammenhänge auch innerhalb gewisser Krankheitskollektive untersucht werden.

Geburtsgewichtsverhalten in Korrelation zur 11β HSD2-Expression innerhalb der IUGR-Patienten-Gruppe Bei der Untersuchung einer möglichen Korrelation zwischen 11β HSD2-Expression und Geburtsgewicht in SDS konnten mit P-Werten von p(HPRT) = 0,56 und dazugehörigem r-Wert von r(HPRT)= 0,13 sowie p(MG) = 0,4 mit r(MG)= 0,18 keine signifikanten Korrelationen eruiert werden. Ein Teil der Ergebnisse ist in Abbildung 4.9. graphisch dargestellt.

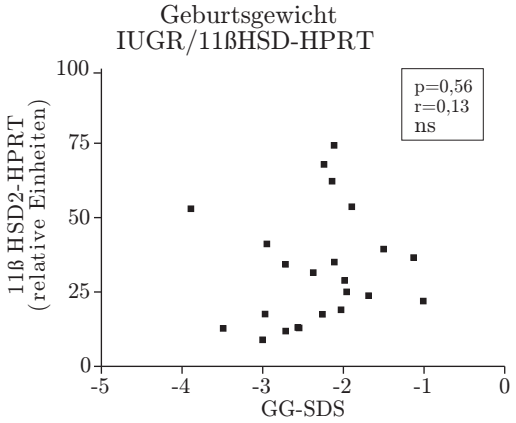


Abbildung 4.9: Korrelation von Geburtsgewicht in SDS und 11ßHSD2-Expression, hier auf HPRT bezogen, bei IUGR-Plazenten; *p=0,56; r=-0,15*

Geburtsgewichtsverhalten in Korrelation zur 11β HSD2-Expression innerhalb der SGA-Patienten-Gruppe Auch in dieser Gruppe kann mit statistischen Werten von p(HPRT) = 0,17 und dazugehörigem r-Wert von r(HPRT)= -0,39 sowie p(MG)= 0,3 mit r(MG)= -0,30 keine Signifikanz festgestellt werden. Siehe auch Abbildung 4.10.

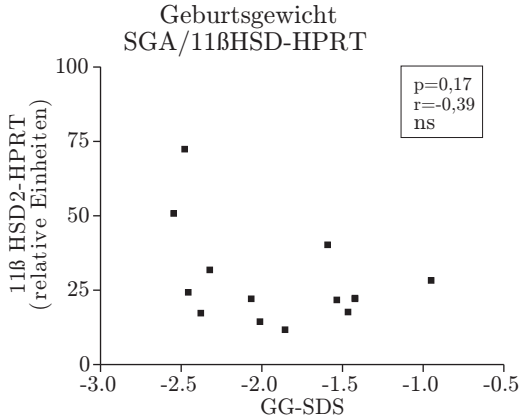


Abbildung 4.10: Korrelation von Geburtsgewicht in SDS und 11ßHSD2-Expression, hier auf HPRT bezogen, bei SGA-Plazenten; *p=0,17; r=-0,39*

Geburtsgewichtsverhalten in Korrelation zur 11β HSD2-Expression innerhalb der Kontroll-Patienten-Gruppe In der Kontroll-Plazenten-Gruppe, zeigten sich ebenfalls keine statistisch signifikanten Korrelationenen. Wobei die statistischen Werte hier p(HPRT) = 0,16 und r(HPRT)= 0,25 sowie p(MG)= 0,04 mit r(MG)= 0,81 betrugen. Siehe auch Abbildung 4.11

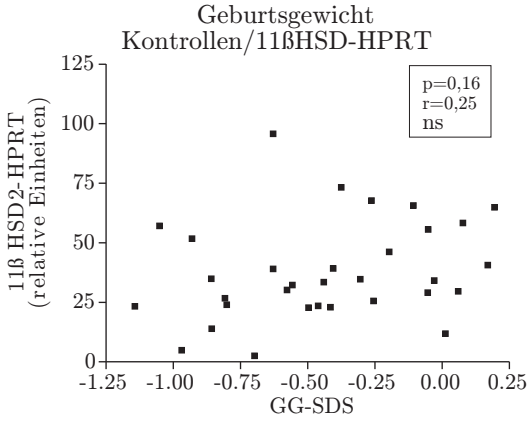


Abbildung 4.11: Korrelation von Geburtsgewicht in SDS und 11ßHSD2-Expression, hier auf HPRT bezogen, bei Kontroll-Plazenten; *p= 0,16; r= 0,25*

Zusammenfassung der Ergebnisse zum Geburtsgewicht In Tabelle 4.2 sind nochmals alle statistischen Werte zusammengefasst dargestellt.

	Expression auf HPRT bezogen	Expression auf MG bzogen
IUGR	p= 0,56 r= 0,13 ns	p= 0,4 r= 0,19 ns
SGA	p= 0,17 r= -0,4 ns	p= 0,3 r= -0,3 ns
Kontrolle	p= 0,25 r= 0,16 ns	p= 0,81 r= 0,04 ns

Tabelle 4.2: Zusammenfassung der ermittelten Daten zu möglichen Korrelationen zwischen 11β HSD2-Expression und Geburtsgewicht

Untersuchungen zur Korrelation zwischen 11β HSD2-Expression und Geburtslänge

Untersuchungen, die sich mit dem Einfluss von plazentarer 11ßHSD2-Expression, und damit explizit mit der Längenentwicklung des Fetus beschäftigen, waren bisher in der hier liegenden Form noch nicht durchgeführt worden. In unserer Studie sollte auch dieser Aspekt genauer untersucht werden. Die Ergebnisse der Untersuchung bzgl. einer Korrelation zwischen Geburtslänge und Expression sind in den folgenden Abschnitten aufgeführt.

Geburtslängenverhalten in Korrelation zur 11β HSD2-Expression innerhalb der IUGR-Patienten-Gruppe Bei der Untersuchung nach möglichen Korrelation zwischen 11β HSD2-Expression und Geburtslänge in SDS konnten mit P-Werten von p(HPRT)= 0,28 und dazugehörigem r-Wert von r(HPRT)= 0,23 sowei p(MG)= 0,24 mit r(MG)= 0,25, keine signifikanten Korrelationen festgestellt werden. Die auf HPRT bezogenen Ergebnisse sind in Abbildung 4.12 dargestellt.

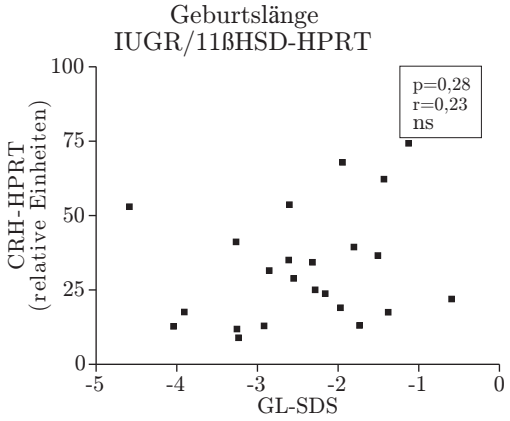


Abbildung 4.12: Korrelation von Geburtslänge in SDS und 11ßHSD2-Expression, hier auf HPRT bezogen, bei IUGR-Plazenten; *p=0,28; r=0,23*

Geburtslängenverhalten in Korrelation zur 11β HSD2-Expression innerhalb der SGA-Patienten-Gruppe Die Untersuchung nach möglichen Korrelationen innerhalb der SGA-Gruppe war ebenfalls ohne signifikante Ergebnisse. Statischtisch ermittelte Werte sind hier p(HPRT)= 0,22 und r(HPRT)= -0,35 sowie p(MG)= 0,61 mit r(MG)= -0,35. Ein Teil davon ist in Abbildung 4.13 dargestellt.

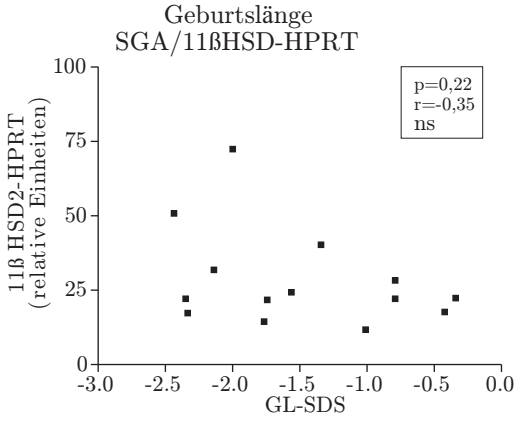


Abbildung 4.13: Korrelation von Geburtslänge in SDS und 11ßHSD2-Expression, hier auf HPRT bezogen, bei SGA-Plazenten; *p=0,22; r=-0,35*

Geburtslängenverhalten in Korrelation zur 11β HSD2-Expression innerhalb der Kontroll-Patienten-Gruppe Auch Untersuchungen zur Korrelation von 11β HSD2-Expression und Geburtslänge innerhalb der SGA-Gruppe zeigten keine Signifikanz. P- und r-Werte sind hier p(HPRT)= 0,7 mit r(HPRT)= 0,07 sowie p(MG)= 0,45 mit r(MG)= -0,14. Siehe Abbildung 4.14

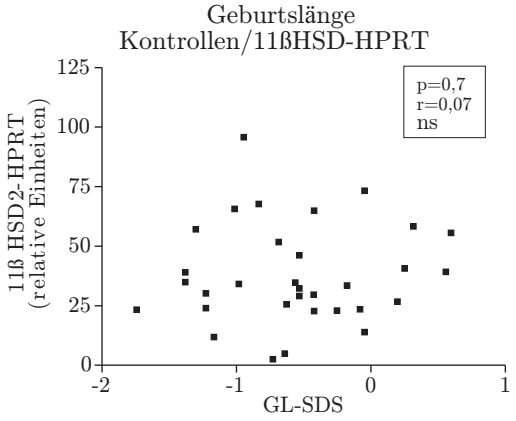


Abbildung 4.14: Korrelation von Geburtslänge in SDS und 11ßHSD2-Expression, hier auf HPRT bezogen, bei Kontroll-Plazenten; *p=0,7; r=0,07*

Zusammenfassung der Ergebnisse zum Geburtslänge In Tabelle 4.3 sind noch einmal alle statistischen Werte zusammengefasst.

	Expression auf HPRT bezogen	Expression auf MG bezogen
IUGR	p= 0,28 r= 0,23 ns	p= 0,24 r= 0,25 ns
SGA	p= 0,22 r= -0,35 ns	p= 0,61 r= -0,35 ns
Kontrolle	p= 0,7 r= 0,07 ns	p= 0,45 r= -0,14 ns

Tabelle 4.3: Zusammenfassung der ermittelten Daten zu möglichen Korrelationen zwischen 11β HSD2-Expression und Geburtslänge

Untersuchungen zur Korrelation zwischen 11β HSD2-Expression und Plazentagewicht

Für 11β HSD2 als plazentares und intraplazentar reguliertes Hormon, scheint die Möglichkeit, dass 11β HSD2 und seine Expression in der Plazenta Einfluss auf die Ge-

wichtsentwicklung haben, kann durchaus plausibel zu sein. Auch dieser Aspekt sollte in Korrelationsuntersuchungen zwischen 11β HSD2-Expression und Plazentagewicht in meiner Arbeit untersucht werden. Die Ergebnisse, wieder bezogen auf die einzelnen zu untersuchenden Gruppen, sind im Folgenden aufgeführt.

Plazentagewicht in Korrelation zur 11β HSD2-Expression innerhalb der IUGR-Patienten-Gruppe Mit p-Werten von p(HPRT)= 0,09 und p(MG)= 0,12, sowie r-Werten von r(HPRT)= 0,35 und r(MG)= 0,31 zeigte sich auch in dieser Untersuchung keine statistische Signifikanz. Allerdings können gewisse Tendenzen hin zu einer positiven Korrelation, v.a. der auf HPRT bezogenen Werte, interpretiert werden. Die Graphische Darstellung ist der Abbildung 4.15 zu entnehmen.

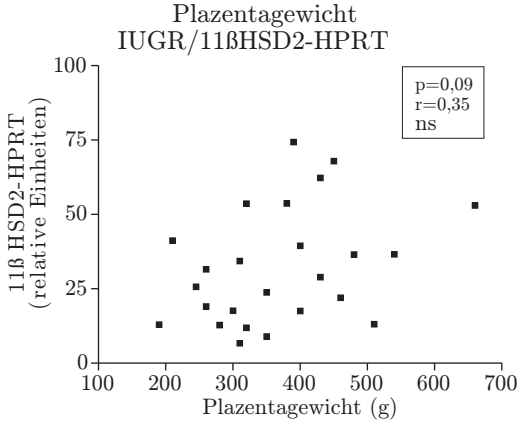


Abbildung 4.15: Korrelation von Plazentagewicht und 11ßHSD2-Expression, hier auf HPRT bezogen, bei IUGR-Plazenten; *p=0,09; r=0,35*

Plazentagewicht in Korrelation zur 11β HSD2-Expression innerhalb der SGA-Patienten-Gruppe Auch die Korrelation innerhalb der SGA-Gruppe zeigte keine statistische Signifikanz. Lediglich in der auf HPRT bezogenen Probe könnte eine Tendenz gesehen werden (p(HPRT)= 0,07, r(HPRT)= -0,48), die jedoch keinerlei Bestätigung durch die auf MG bezogene Probe findet (p(MG)= 0,31, r(MG)= -0,28). Abbildung 4.16 zeigt einen Teil der Ergebnisse.

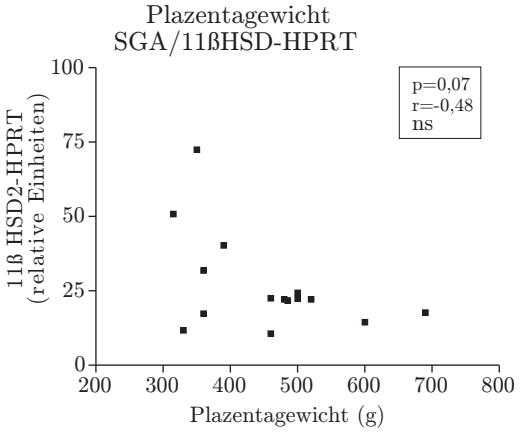


Abbildung 4.16: Korrelation von Plazentagewicht und 11ßHSD2-Expression, hier auf HPRT bezogen, bei SGA-Plazenten; *p=0,07; r=-0,48*

Plazentagewicht in Korrelation zur 11β HSD2-Expression innerhalb der Kontroll-Patienten-Gruppe Der Korrelationsversuch innerhalb der Kontroll-Gruppe ergab auf MG bezogen eine statisch signifikante, positive Korrelation.

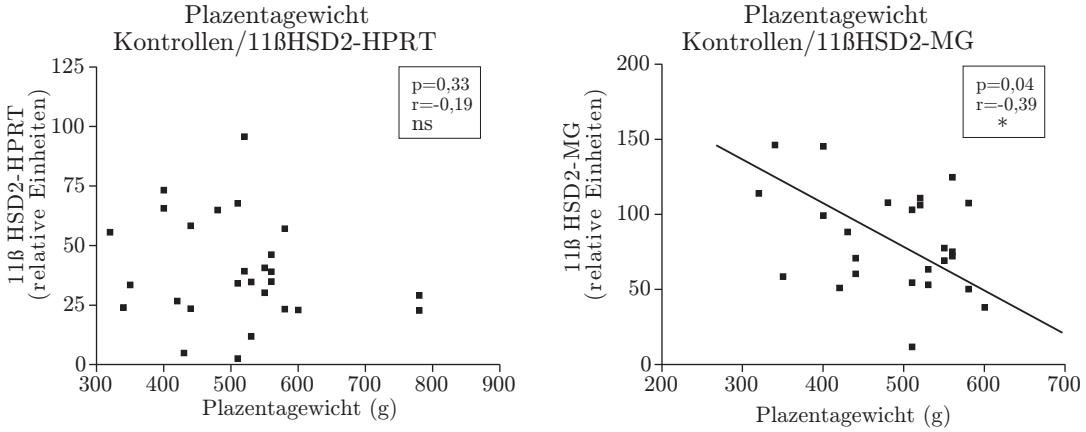


Abbildung 4.17: Korrelation von Plazentagewicht und 11ßHSD2-Expression, mit HPRT und MG korreliert, bei Kontroll-Plazenten; *p(HPRT)=0,33; r(HPRT)=-0,19; p(MG)=0,04; r(MG)=-0,39*

Die Werte liegen hier bei p(MG)= 0,04 und r(MG)= -0,39. Diese Signifikanz findet in der auf HPRT bezogenen Probe jedoch keine Bestätigung. Die Werte hier liegen bei p(HPRT)= 0,33 und r(HPRT)= -0,19. Beide Ergebnisse sind in Abbildung 4.17 dargestellt.

Zusammenfassung der Ergebnisse zum Plazentagewicht In Tabelle 4.4 sind nochmals alle statistischen Werte zusammengefasst.

	Expression auf HPRT bezogen	Expression auf MG bezogen
IUGR	p= 0,09 r= 0,12 ns	p= 0,35 r= 0,31 ns
SGA	p= 0,07 r= -0,48 ns	p= 0,31 r= -0,28 ns
Kontrolle	p= 0,04 r= -0,39 *	p= 0,33 r= -0,19 ns

Tabelle 4.4: Zusammenfassung der ermittelten Daten zu möglichen Korrelationen zwischen 11β HSD2-Expression und Plazentagewicht

4.2.4 Korrelationen zwischen CRH-Expression und Geburtsdaten

Geburtsgewichtsverhalten in Korrelation zur CRH-Expression innerhalb der verschiedenen Patienten-Gruppe

Geburtsgewicht in Korrelation zur CRH-Expression innerhalb der IUGR-Patienten-Gruppe Bei der Untersuchung zu möglichen Korrelationen zwischen CRH-Expression und Geburtsgewicht in der IUGR-Gruppe zeigten sich mit Werten von p(HPRT)= 0,19 und p(MG)= 0,48 sowie r(HPRT)= -0,28 und r(MG)= -0,15 keine signifikanten Korrelationen. Ein Teil der Ergebnisse ist in Abbildung 4.18 graphisch dargestellt.

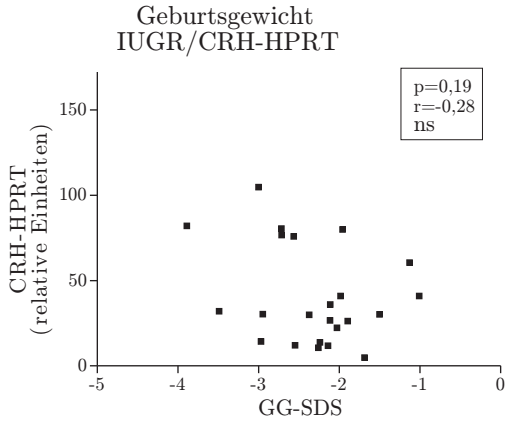


Abbildung 4.18: Korrelation von Geburtsgewicht in SDS und CRH-Expression, hier auf HPRT bezogen, bei IUGR-Plazenten; *p=0,19; r=-0,28*

Geburtsgewicht in Korrelation zur CRH- Expression innerhalb der SGA-Patienten-Gruppe Auch in der SGA-Gruppe zeigte sich keine statistische Signifikanz.

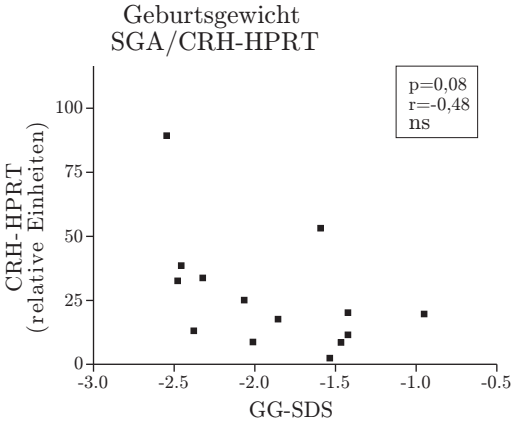


Abbildung 4.19: Korrelation von Geburtsgewicht in SDS und CRH-Expression, hier auf HPRT bezogen, bei SGA-Plazenten; *p=0,08; r=-0,48*

Jedoch kann man aus den ermittelten Werten p(HPRT)= 0,08 und p(MG)= 0,05, sowie r(HPRT)= -0,48 und r(MG)= -0,53, eine Tendenz dahingehend entnehmen. In Abbildung 4.19 ist ein Teil der Ergebnisse graphisch dargestellt.

Geburtsgewicht in Korrelation zur CRH- Expression innerhalb der Kontroll-Patienten-Gruppe Die Korrelationsuntersuchung zwischen Genexpression und Geburtsgewicht in der Kontrollgruppe blieb mit Werten von p(HPRT)= 0,34 und p(MG)= 0,50, sowie r(HPRT)= 0,17 und r(MG)= -0,12 ebenfalls ohne statistische Signifikanz. Die Abbildung 4.20 zeigt die Ergebnisse graphisch.

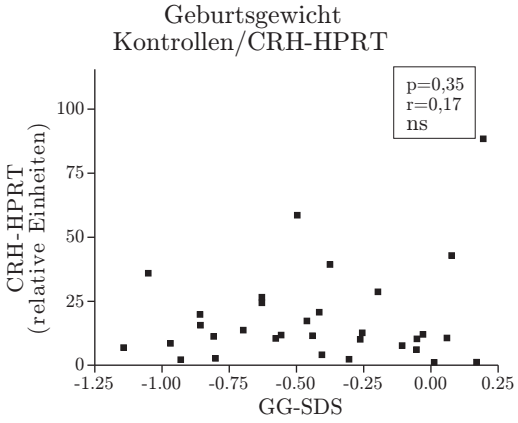


Abbildung 4.20: Korrelation von Geburtsgewicht in SDS und CRH- Expression, hier auf HPRT bezogen, bei Kontroll-Plazenten; *p=0,34; r=0,17*

Zusammenfassung der Ergebnisse zum Geburtsgewicht In Tabelle 4.5 sind nochmals alle statistischen Werte zusammengefasst.

	Expression auf HPRT bezogen	Expression auf MG bezogen
IUGR	p= 0,19 r= -0,28 ns	p= 0,48 r= -0,15 ns
SGA	p= 0,08 r= -0,48 ns	p= 0,05 r= -0,53 ns
Kontrolle	p= 0,34 r= 0,17 ns	p= 0,50 r= -0,12 ns

Tabelle 4.5: Zusammenfassung der ermittelten Daten zu möglichen Korrelationen zwischen CRH- Expression und Geburtsgewicht

Untersuchungen zur Korrelation zwischen CRH-Expression und Geburtslänge

Auch die Geburtslänge ist ein Faktor, der bei Wachstumsrestriktionen modifiziert sein kann. Ob innerhalb einer der Untersuchungsgruppen und der CRH- Expression eine Korrelation besteht, soll in folgenden Abschnitten dargestellt werden.

Geburtslänge in Korrelation zur CRH- Expression innerhalb der IUGR-Patienten-Gruppe In der IUGR-Gruppe brachten die Untersuchungen keine statistisch signifikanten Ergebnisse.

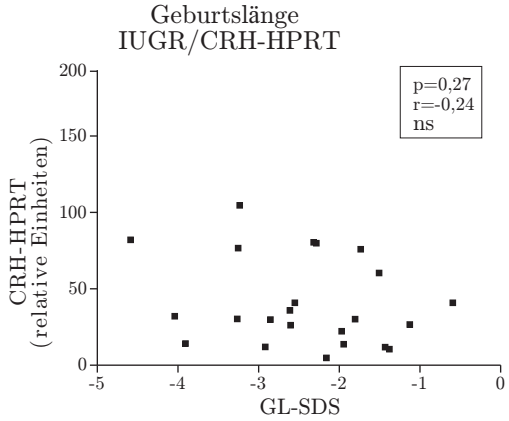


Abbildung 4.21: Korrelation von Geburtslänge in SDS und CRH- Expression, hier auf HPRT bezogen, bei IUGR-Plazenten; *p=0,27; r=-0,24*

Die Werte p(HPRT)= 0,27 und p(MG)= 0,24, sowie r(HPRT)= -0,24 und r(MG)= -0,26 sprechen gegen einen Zusammenhang. In Abbildung 4.21 sind die Ergebnisse dargestellt.

Geburtslänge in Korrelation zur CRH- Expression innerhalb der SGA-Patienten-Gruppe Auch innerhalb der SGA-Gruppe korrelieren Genexpression und Geburtslänge nicht. Die ermittelten Werte sind p(HPRT)= 0,15 und p(MG)= 0,27, sowie r(HPRT)= -0,40 und r(MG)= -0,31. Teile der Ergebnisse sind in Abbildung 4.22 dargestellt.

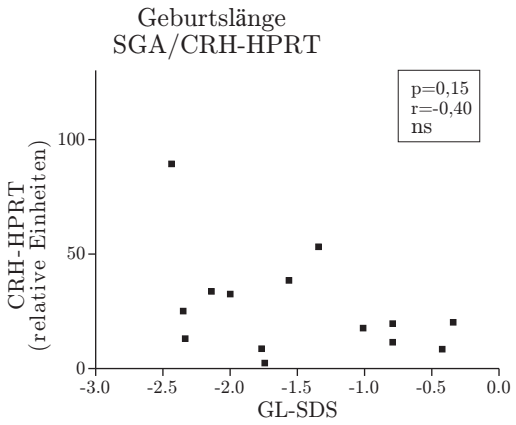


Abbildung 4.22: Korrelation Plazentagewicht und CRH- Expression, hier auf HPRT bezogen, bei SGA-Plazenten; *p=0,15; r=-0,40*

Geburtslänge in Korrelation zur CRH- Expression innerhalb der Kontroll-Patienten-Gruppe Die Werte beim Korrelationsversuch zwischen Kontrollgruppe und CRH- Expression, sprechen gegen statistische Signifikanz.

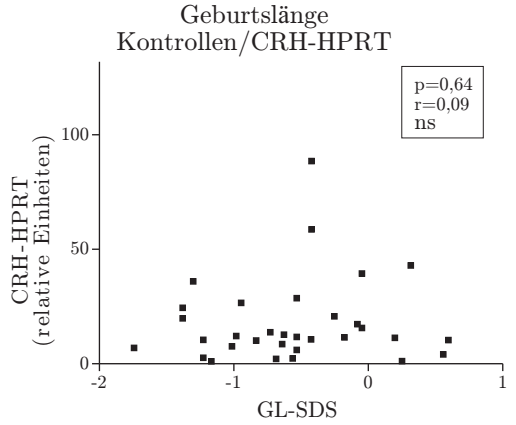


Abbildung 4.23: Korrelation von Geburtslänge in SDS und CRH- Expression, hier auf HPRT bezogen, bei Kontroll-Plazenten; *p=0,64; r=0,09*

Die Ergebnisse hier sind P(HPRT)= 0,64 und p(MG)= 0,81, sowie r(HPRT)= 0,09 und r(MG)= -0,04. Abbildung 4.23 zeigt dies graphisch.

Zusammenfassung der Ergebnisse zum Geburtslänge In Tabelle 4.6 sind nochmals alle statistischen Werte zusammengefasst.

	Expression auf HPRT bezogen	Expression auf MG bezogen
IUGR	p= 0,27 r= -0,24 ns	p= 0,24 r= -0,26 ns
SGA	p= 0,15 r= -0,40 ns	p= 0,27 r= -0,31 ns
Kontrolle	p= 0,64 r= 0,09 ns	p= 0,81 r= -0,04 ns

Tabelle 4.6: Zusammenfassung der ermittelten Daten zu möglichen Korrelationen zwischen CRH- Expression und Geburtslänge

Untersuchungen zur Korrelation zwischen CRH-Expression und Plazentagewicht

CRH, das u.a. auch in der Plazenta reguliert wird, ist möglicherweise auch ein Faktor, der zu einer veränderten Entwicklung der Plazenta führen kann. In den folgenden Abschnitten möchte ich die Ergebnisse von Untersuchungen dazu erläutern.

Plazentagewicht in Korrelation zur CRH- Expression innerhalb der IUGR-Patienten-Gruppe Bei der Untersuchung der Proben nach möglichen signifikanten Korrelationen zeigte sich keine statistische Bestätigung. Die ermittelten Werte sprechen gegen statisische Signifikanz. P(HPRT)= 0,36 und p(MG)= 0,42, sowie r(HPRT)= 0,19 und r(MG)= 0,17. Graphische sind die Ergebnisse in Abbildung 4.24 dargestellt.

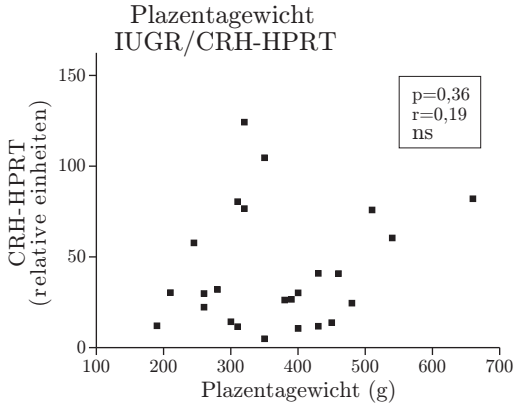


Abbildung 4.24: Korrelation Plazentagewicht und CRH- Expression, hier auf HPRT bezogen, bei IUGR-Plazenten; *p=0,36; r=0,19*

Plazentagewicht in Korrelation zur CRH-Expression innerhalb der SGA-Patienten-Gruppe Innerhalb der SGA-Gruppe zeigte sich mit HPRT-korelliert eine klar signifikante negative Korrelation, mit einem p-Wert von 0,047 und dazugehörigem r-Wert von r= -0,52. Die auf MG bezogene Probe ergab statistisch keine Signifikanz, deskriptiv betrachtet, kann man jedoch auch hier von tendenziell negativer Korrelation ausgehen. P(HPRT)= 0,07 und r(MG)= -0,48. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.25 dargestellt.

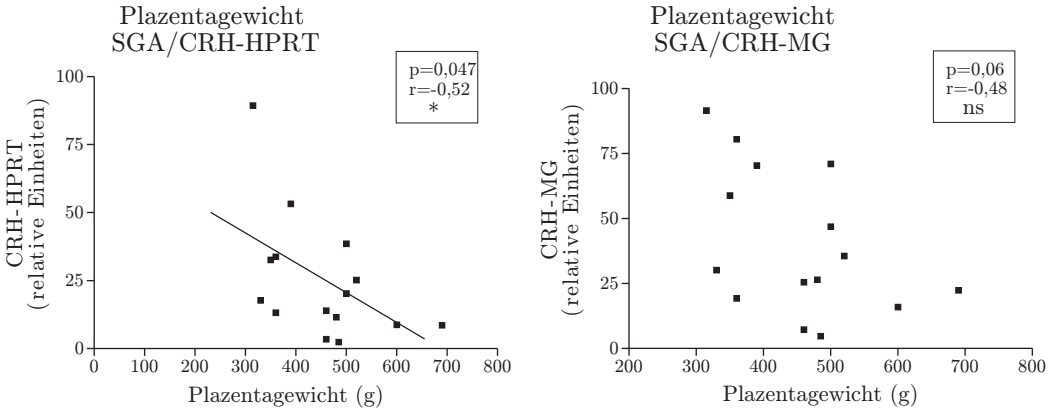


Abbildung 4.25: Korrelation von Plazentagewicht und CRH-Expression, auf HPRT und MG bezogen, bei SGA-Plazenten; *p(HPRT)=0,047; r(HPRT)=-0,52; p(MG)=0,06; r(MG)=-0,48*

Plazentagewicht in Korrelation zur CRH-Expression innerhalb der Kontroll-Patienten-Gruppe Die Untersuchung der Korrelation zwischen Plazentagewicht und CRH-Expression, ergabe keine Hinweise auf Korrelation. Werte von p(HPRT)= 0,42 und p(MG)= 0,93,

sowie r(HPRT)= 0,16 und r(MG)= 0,02 sprechen klar gegen eine statistische Signifikanz. Die Ergebnisse können der Abbildung 4.26 entnommen werden.

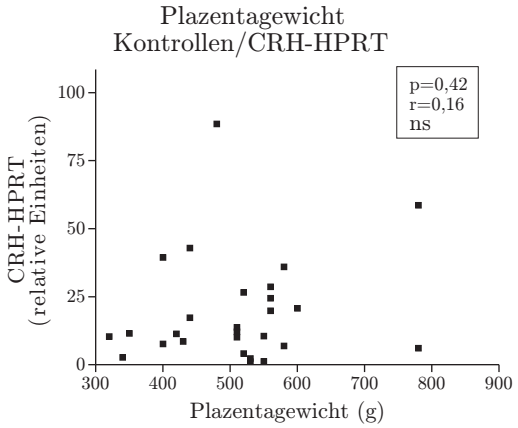


Abbildung 4.26: Korrelation Plazentagewicht und CRH-Expression, hier auf HPRT bezogen, bei Kontroll-Plazenten; *p=0,56; r=-0,15*

Zusammenfassung der Ergebnisse zum Plazentagewicht In Tabelle 4.7 sind noch einmal alle statistischen Werte zusammengefasst.

	Expression auf HPRT bezogen	Expression auf MG bezogen
IUGR	p= 0,36 r= 0,19 ns	p= 0,42 r= 0,17 ns
SGA	p= 0,047 r= -0,52 ns	p= 0,07 r= -0,48 ns
Kontrolle	p= 0,42 r= 0,16 ns	p= 0,93 r= 0,02 ns

Tabelle 4.7: Zusammenfassung der ermittelten Daten zu möglichen Korrelationen zwischen 11β HSD2-Expression und Plazentagewicht

4.2.5 Korrelationen zwischen 11ßHSD2- und CRH-Expression

Sowohl 11βHSD2 als auch CRH greifen in ihrer Funktion als Steuerungshormone in den plazentaren Kreislauf, v.a. in den Glukokortikoidhaushalt der Plazenta ein. Der komplette Regelkreis dieses Hormonsystems in der Plazenta, mit allen Feedback-, Inhibitions- und Stimumlationssystemen ist zu großen Teilen noch ungeklärt. Sichergestellt ist, dass die beiden hier betrachteten Gene per se sicher einen Anteil am Gesamtsystem haben. Es

stellt sich jedoch die Frage, ob und wie sich die beiden Genexpressionen untereinander beeinflussen, sowie in welchem Maß die beiden in ihrer Regulation von verschiedenen Umständen verändert werden. Im folgenden Abschnitt möchte ich die Ergebnisse zu möglichen Korrelationen der beiden Gene darstellen.

11βHSD2 in Korrelation zur CRH-Expression innerhalb der IUGR-Patienten-Gruppe Die Untersuchung der Expression zwischen den beiden Genen innerhalb der IUGR-Gruppe ergab keinerlei statistische Signifikanz. Als Werte wurden p(HPRT)= 0,83 und p(MG)= 0,87, sowie r(HPRT)= -0,04 und r(MG)= 0,03 erzielt. Graphisch dargestellt sind Teile der Ergebnisse in Abbildung 4.27.

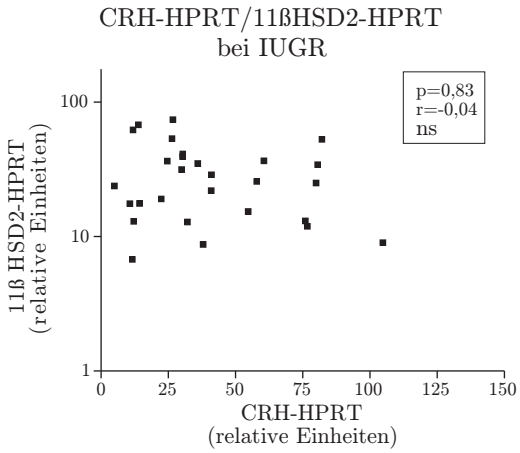


Abbildung 4.27: Korrelation 11ßHSD2- und CRH-Expression, beide auf HPRT bezogen, bei IUGR-Plazenten; *p(HPRT)=0,83; r(HPRT)=-0,04*

11βHSD2 in Korrelation zur CRH-Expression innerhalb der Kontroll-Patienten-Gruppe Innerhalb der Kontroll-Gruppe zeigte sich für HPRT eine statistische Signifikanz. Die Werte waren hierbei p= 0,04 und r= 0,36. Dieses Ergebnis wurde allerdings durch die auf MG bezogenen Probe nicht bestätigt.Im Gegenteil, die hier gewonnenen Ergebnisse sprechen gegen eine Signifikanz. Die Werte lagen bei p= 0,74 und r= 0,06. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.28 graphisch dargestellt.

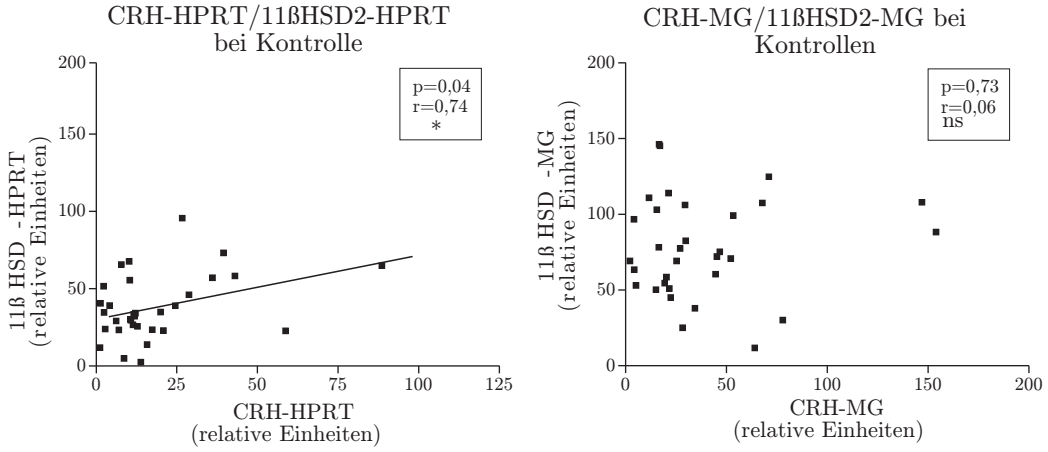
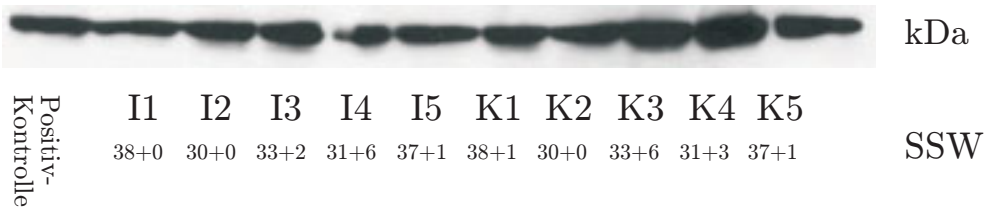


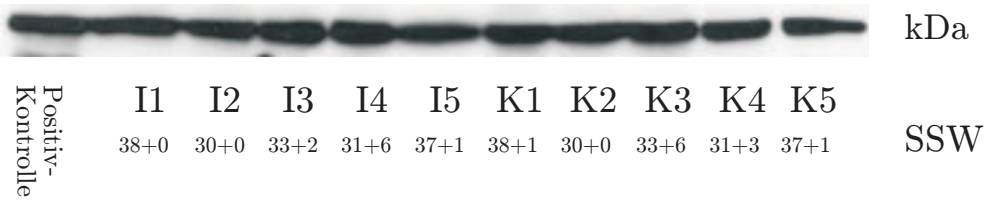
Abbildung 4.28: Korrelation 11ßHSD2- und CRH-Expression, hier beide auf HPRT bezogen, bei Kontroll-Plazenten; *p(HPRT)=0,04; r(HPRT)=0,36; p(HPRT)=0,74; r(HPRT)=0,06*

4.3 Ergebnisse der Western-Blot-Untersuchung bei 11β HSD2

Im Western-Blot können die Konzentrationsunterschiede der synthetisierten Proteinmenge von 11β HSD2, zwischen den zu untersuchenden Patientenkollektiven, hier IUGR- versus Kontrollplazenten semiquantitativ bestimmt werden. Das in Abbildung 4.29 A dargestellte Stripping dient zur Validitätskontrolle der Messung. Wie die Abbildung zeigt ist das Ergebnis verwertbar.
Abbildung 4.29 B ist ein vergrößerter Ausschnitt der Proteinbanden von 11β HSD2 bei repräsentativen IUGR-, sowie Kontrollplazenten im Wetsternblot. Wie vorbeschrieben zeigen sich die Proteinbanden von 11β HSD2 in den Proben sowie in der Positivkontrolle auf Höhe von 40/41 kDa [53][25].
Beim Vergleich der Proteinbanden, können weder zwischen IUGR- (I1-I5) und Kontrollplazenten (K1-K5), noch zwischen Plazenten unterschiedlichen Schwangerschaftsalters (vgl. I1-K1; I2-K2; I3-K3; I4-K4; I5-K5) Unterschiede der Proteinmenge von 11β HSD2 festgestellt werden. Die mittels Taqmen-PCR ermittelten signifikanten, bzw. deskriptiv signifikanten Expressionsunterschiede können folglich auf Proteinebene nicht bestätigt werden.



A: Stripping mit ß- Actin



B: 11ßHSD2

Abbildung 4.29: **Westernblot:** Die vergrößerten Ausschnitte der Westernblotbanden zeigen den Vergleich zwischen IUGR (I)- und Kontrollplazenten (K). In der zweiten Zeile stehen die jeweilige Gestationswoche(SSW) der Proben, zum SSWabhängigen Vergleich;
A: Stripping mit ß-Actin: U: 50V, Belichtungszeit: 2 min.
Die Banden werden in allen Proben auf Höhe von 43kDa sichtbar;
B: 11ßHSD2: U: 50V, Belichtungszeit: 5 sec.
Die Banden werden in allen Proben auf Höhe von 40/41kDa sichtbar.

5 Diskussion

5.1 Ergebnisse zu 11βHSD2

In der Literatur früherer Studien wird ein Zusammenhang zwischen IUGR und 11βHSD2 beschrieben. Demnach führt eine unausgewogene maternale Ernährung, sowie andere Stressfaktoren möglicherweise zu reduzierter Expression bestimmter Enzyme, wie z.B. 11βHSD2. Eine Folge davon ist, dass vermehrt mütterlichen Glukokortikoiden der Übertritt in den fetalen Kreislauf ermöglicht ist, was die Entstehung von IUGR zur Folge hat. Hinzu kommen genetische Einflüsse auf die Expression von 11βHSD2, so dass Stressoren auch auf fetaler Seite per se zu einer Erhöhung von Cortisol führen. In Studien von McTernan et al. und Schoof et al. [37][51] wurde eine erniedrigte Expression von mRNA von 11βHSD2 in Planzenten von Kindern mit erniedrigtem Geburtsgewicht nachgewiesen. Andere Studien z.B. eine Studie von Rogerson et al. bestätigte dies nicht [49]. In Plazenten von IUGR-Geborenen Kindern wird von Benediktsson et al. eine erhöhte Aktivität von 11βHSD2 beschrieben [10]. Auch in dieser Arbeit wird der Zusammenhang zwischen mRNA-Expression, des 11βHSD2-Gens und der Entwicklung von zu niedrigem Geburtsgewicht untersucht. Im Gegensatz zu den erwähnten Studien differenziert diese Arbeit jedoch die Genese, die jeweils zu geringerem Geburtsgewicht führt näher und untersucht die Expression von 11βHSD2 in SGA-, IUGR- und Präeklampsieplazenten im Vergleich zu Kontrollplazenten gesunder Säuglinge. Meinen Untersuchungen ist es bei keiner der erwähnten Formen von Wachstumsrestriktion gelungen, eine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigte Expression von 11βHSD2 nachzuweisen. Tendenziell zeigen alle Formen eine verminderte Expression auf. Im Vergleich zwischen der Expression in Präeklampsie- und in Kontrollplazenten rückt dieser Vergleich in die Nähe statistischer Signifikanz. Ergebnisse früherer Studien von Shams et al., Mc Ternan et al. und Schoof et al. zur Expression von 11βHSD2 bei IUGR-Plazenten wurden entgegen der Erwartung nicht bestätigt, jedoch lassen die tendenziell verminderten Expressionsergebnisse von 11βHSD2 in Kombination mit den Ergebnissen vorangegangener Studien dennoch die Vermutung offen, dass 11βHSD2 in der Pathogenese von IUGR eine Rolle spielt.
Zusammenhänge zwischen 11βHSD2- Expression und SGA wurden in dieser Differenzierung in unserer Studie erstmalig untersucht. Auch hier zeigte sich zwar keine Signifikanz, jedoch eine Tendenz hin zur niedrigeren Expression von 11βHSD2 bei SGA-Plazenten. Interessant in diesem Zusammenhang ist vor allem, dass auch der Vergleich zwischen IUGR- und SGA-Plazenten auf MG bezogen mit einem p-Wert von p=0,05 eine gewisse Tendenz hin zu verminderter Expression auf Seiten der SGA Plazenten zeigt. Dies kann an der Zusammensetzung des Kollektivs liegen. Mit einer Probenanzahl von n=16 bei

den SGA-Proben und n=29 bei den IUGR Proben sind die Werte der SGA-Gruppe sehr anfällig für Werteschwankungen innerhalb der Gruppe. Ein weiterer Aspekt innerhalb des Kollektivs, der eine Begründung für dieses Ergebniss gibt, ist der hochsignifikante Unterschied des Schwangerschaftsalters zwischen SGA- und IUGR-Gruppe. 11βHSD2 ist ein Hormon, das im Schwangerschaftsverlauf, vorallem zwischen SSW38 und SSW40 in seiner Expression stark abnimmt [39][52]. Die SSWs der SGA-Gruppe sind in ihren SSW signifikant höher als die IUGR-Proben des Kollektivs 3, so dass allein diese Tatsache zu einer tendenziell erniedrigten Expression von 11βHSD2 geführt haben kann. Eine weitere Erklärung dafür wäre, dass die Expression von 11βHSD2 zwar Einfluss auf das Wachstum des Feten nimmt, nicht aber in besonderer Weise bei pathologischen Entwicklungen wie z.B. von IUGR.
Mit den nahezu signifikanten Ergebnissen auf HPRT bezogen, bestätigt das Ergebniss in Kollektiv 4, also beim Vergleich zwischen Präeklampsie- und Kontrollgruppe, Ergebnisse früherer Studien von Murphy et al. [40] , sowie Schoof et al. [51]. In diesen Studien konnte eine im Vergleich zur Kontrollgruppe tendenziell verminderte Expression von 11βHSD2-RNA bei Präeklampsieplazenten gezeigt werden. Auch wenn in unserer Untersuchung keine Signifikanz nachgewiesen werden konnte, kann, unter Betrachtung der p-Werte und der tendenziell verminderten Expression auch in dieser Untersuchung, eine Bestätigung der Ergebnisse erwähnter Studien gesehen werden. Ein Grund für die fehlende Signifikanz ist möglicherweise die relativ geringe Probenanzahl. Mit N=10 ist die Auswertung anfällig für einzelne abweichende Werte.
Als weiteren Schritt wurden in meiner Arbeit Zusammenhänge zwischen 11βHSD2-Genexpression und Geburtsgewicht in SDS, Geburtslänge in SDS und Plazentagewicht untersucht. Auch Korrelationen zwischen 11βHSD2-Expression und Geburtsgewicht wurden in früheren Studien untersucht. Peter J. Burton et al. fasst in seinem Review: "Dual Function of 11β-Hydroxysteroid Dehydrogenase in Placenta: Modulating Placental Glucocorticoid Passage and Local Steroid Action" [15], Ergebnisse einiger Forschergruppen rund um die Expression von 11βHSD2 in der Plazenta zusammen. So beschreibt er dort Einflüsse von HSD-Expression in der Plazenta auf das fetale Wachstum. Burton zitiert u.a. Benediktsson, der postuliert, dass gesteigerte Aktivität von 11βHSD2 zu erniedrigtem fetalen Geburtsgewicht führt. So beschreibt er wie auch andere Autoren eine positive Korrelation zwischen HSD-Aktivität und Geburtsgewicht [20]. Benediktsson et al. und Steward et al. fanden in ihren Studien eine positive Korrelation zwischen Geburtsgewicht und Genexpression. Im Gegensatz zu erwähnten Studien untersuchten wir, unabhängig von Unterschieden zwischen den Gruppen, das Korrelationsverhalten von Geburtsgewicht und Genexpression innerhalb von IUGR-, SGA- und Kontrollgruppe, mit dem Ziel den Einfluss von 11βHSD2 bei der Gewichtsentwicklung, innerhalb spezieller Patientenkollektive zu untersuchen. In keinem der genannten Kollektive zeigte sich eine signifikante Korrelation. Dennoch können aus ermittelten Werten einige Aussagen getroffen werden. Zum einen sind die r-Werte durchwegs positiv, so dass davon ausgegangen werden kann, dass tendenziell ein positiver Zusammenhang zwischen Gewicht in SDS und Genexpression besteht. Mit steigender Genexpression steigt also auch tendenziell das Geburtsgewicht in jeder der untersuchten Gruppen. Des Weiteren finden sich in

der SGA-Gruppe die p-Werte, die im Vergleich zu den anderen Gruppen, statistischer Signifikanz am nähesten liegen, so dass vermutet werden könnte, dass der Einfluss von 11βHSD2-Expression auf die Gewichtsentwicklung hier am grössten ist. Diese Aussagen müssten jedoch in Studien mit größeren Kollektiven weiterverfolgt werden.
In bisherigen Studien wurde, bezüglich Wachstum von Feten vorwiegend auf die Entwicklung des Geburtsgewichtes eingegangen. Weitere Größenparameter wurden in den Untersuchung bisher eher vernachlässigt, obwohl auch hier ein Zusammenhang mit Genexpression durchaus denkbar ist. In meinen Untersuchungen war ein weiteres Ziel auch die Geburtslänge in Abhängigkeit von der 11βHSD2-Expression innerhalb der Patientengruppen zu untersuchen und somit mögliche Einflüsse von 11βHSD2 auf die Längenentwicklung der Feten zu eruieren. Die Ergebnisse brachten in keiner der untersuchten Gruppen statistisch signifikante Ergebnisse. Zudem sprechen auch die unterschiedlichen Vorzeichen der r-Werte eher gegen direkte Zusammenhänge zwischen 11βHSD2-Expression und Geburtslänge. Eine fehlende Gleichheit der Vorzeichen, spricht auch gegen eine einheitlich positive oder negative Korrelation und somit auch gegen einen statistischen Zusammenhang.
Schließlich sollten innerhalb der einzelnen Probengruppen noch Zusammenhänge von 11βHSD2-Expression und Plazentagewicht untersucht werden. Benediktsson et al. veröffentlichten in ihrem Paper 1993: „Glucocorticoid exposure in utero: new model for adult hypertension“ [10] Ergebnisse, in denen eine signifikant negative Korrelation zwischen 11βHSD2-Expression und Plazentagewicht bei Ratten nachgewiesen wurde. Die Untersuchung auf Korrelation innerhalb der IUGR-Gruppe blieb ohne statistische Signifikanz. Betrachtet man jedoch die p-Werte, kann vor allem auf HPRT-bezogen ein nicht weit von der Signifikanz abweichender Wert gefunden werden. tendenziell zeichnet sich eine positive Korrelation ab. Entgegen der Erwartung und Benediktssons Studie an Raten, scheint demnach bei IUGR-Plazenten das Plazentagewicht mit steigender Genexpression zuzunehmen.
Ebenfalls ohne statistisch signifikante Ergebnisse blieb die Untersuchung der SGA-Gruppe. Auch hier weicht der auf HPRT bezogene p-Wert mit 0,07 nicht stark von signifikanter Korrelation ab. Mögliche Tendenzen werden jedoch durch MG bezogene Werte nicht bestägigt. Eine tendenziell negative Korrelation bei negativem r-Wert halte ich deswegen für eher unwahrscheinlich.
Signifikanz zeigte nur der Korrelationsversuch bei der Kontrollgruppe auf Mikroglobulin bezogen. Eine Bestätigung durch die auf HPRT bezogene Probe blieb aus. P- und r-Wert sprechen hier nicht für tendenzielle Zusammenhänge. Mit negativem r-Wert scheint durch diese Untersuchung lediglich eine mögliche negative Korrelation bestätigt zu werden. Zusammenfassend machen meine Untersuchungen eine Korrelation zwischen Plazentagewicht in jeder der untersuchten Gruppen eher unwahrscheinlich. Ergebnisse von Untersuchungen an Ratten werden demnach nicht bestätigt.
In meiner Arbeit ging ich in einem weiteren Schritt auf die Expression auf Proteinebene ein. Wir untersuchten Plazenten von IUGR- und Kontrollkindern mittels Western Blot, mit der Frage nach möglichen Synthesedefiziten oder -unterschieden. Bereits frühere Arbeitsgruppen versuchten differentielle Regulierungen der Proteinexpression von

Plazenten unterschiedlicher Schwangerschaftsbedingungen ausfindig zu machen. Durch Versuche mit Mäusen bewiesen Bertram et al. bei Mäusen, die während der Schwangerschaft unter Low-Protein Diät standen, eine signifikant kleinere Menge an 11βHSD2 auf Proteinebene, als bei Mäusen mit normaler Proteinzufuhr [11]. Die Entstehung von IUGR steht in engem Zusammenhang mit Mangelversorgung der Mutter während der Schwangerschaft. Im Vergleich von humanem Plazentagewebe gesunder, mit Präeklampsie Schwangerschaften konnte eine Forschergruppe unter Alfaidy ebenfalls eine signifikant verminderte Proteinsynthese bei Präeklampsie nachweisen [2]. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Untersuchungen bei einer Studie, die Plazenten von mit Dexamethason behandelten trächtigen Affen untersuchte. Auch hier konnten signifikante Unterschiede auf Proteinebene ausgemacht werden. Meine Untersuchungen konnten eine vermutete Proteinexpressionsverminderung nicht bestätigen. Im Western Blot zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen IUGR-Plazenten und schwangerschaftsaltersabhängig gepaarten Kontroll-Plazenten. Die erhöhte mRNA-Expression scheint nicht auf Proteinebene übertragen zu werden. Ein möglicher Einfluss von 11βHSD2 auf das intrauterine Wachstum des Kindes muss demnach aus einer veränderten Aktivität des Enzyms resultieren und nicht aus einer erhöhten Proteinexpression. Für diese Theorie sprechen auch Beobachtungen von McMullen, der in seiner Studie an Ratten verminderte Aktivität von NAD+-abhängiger HSD bei Wachstumrestriktion nachweisen konnte [36][15].

5.2 Ergebnisse zu CRH

Über zahlreiche Rezeptoren nimmt CRH Einfluss auf viele Steuermechanismen des maternalen, fetalen und plazentaren Kreislauf. So hat es großen Anteil an Gefäßtonusregulation, sowie Einfluss auf Glukokortikoidkreislauf und die Entwicklung von HPAchse und NNR des ungeborenen Kindes. Vor allem der Einfluss auf den Glukokortikoidhaushalt, plazentar und fetal, gibt ihm an der zeitgerechten Gewichtsentwicklung des Feten einen großen Anteil. So bewirkt plazentares CRH einen positiven Feedbackmechanismus, der in einen kontinuierlichen Anstieg von CRH und folglich von Glukokortikoiden mündet. O'Regan et al. ist es in einer Studie an Ratten gelungen, einen direkten Zusammenhang zwischen intrauteriner Glukokortikoidexposition des Feten und veränderten Größenwachstum zu zeigen. Er konnte durch Behandlung von trächtigen Ratten mit Glukokortikoidpräparaten beweisen, dass erhöhte intrauterine Glukokortikoidspiegel zu Wachstumsrestriktion der Nachkommen führt. In zahlreichen Studien wurden bereits direkte Zusammenhänge zwischen Veränderungen des CRH-Stoffwechsels beim Feten und der Entstehung von Wachstumsrestriktion untersucht und nachgewiesen.
Ziel meiner Untersuchungen war es, gewisse Veränderungen anhand spezieller Kollektive genauer zu untersuchen. Im Gegensatz zu anderen Studien differenzierten wir die Genese, die zu Wachstumsrestriktion führte, und untersuchten die Genexpression getrennt nach IUGR-, SGA- und Präeklampsieplazenten im Vergleich zu Kontrollplazenten.
Zunächst wurden mittels Genarray-Analyse von 9 IUGR und 7 Kontroll-Plazenten die

Gene ermittelt, welche auf Grund stark differentieller Regulation bei Entstehung oder Verlauf von IUGR und SGA eine wichtige Rolle spielen könnten. Mit 3.8 fach höherer Expression in Plazenten von IUGR-Geborenen war CRH potentiell interessant, so dass als nächster Untersuchungsschritt eine Taqman-PCR eines größeren Kollektivs durchgeführt wurde. Von Karteris vorbeschrieben findet man in der Plazenta von wachstumsretardierten Kindern eine hochregulierte Expression von CRH [26]. Dies bestätigten auch meine Untersuchungen zur Expression von CRH bei IUGR-Plazenten, gegenüber Kontrollplazenten. Sowohl auf HPRT, als auch auf MG bezogen zeigte sich statistische Signifikanz. Nicht so bei dem Vergleich von SGA-Plazenten mit Kontrollplazenten, tendenziell kann auch hier eine erhöhte Expression interpretiert werden, jedoch ohne statistische Bestätigung.
Erstmals wurde in meinen Untersuchungen der Vergleich zwischen CRH-Expression mit IUGR- und SGA-Plazenten untersucht. Auf MG als Houskeepinggen bezogen zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied, der sich tendenziell auch zu HPRT-bezogen abzeichnet. Das Ausbleiben einer statistischen Bestätigung durch auf HPRT bezogene Daten, hat eine mögliche Erklärung im Patientenkollektiv. CRH ist ein während der Schwangerschaft in seiner Expression kontinuierlich ansteigendes Hormon. Betrachtet man die Zusammensetzung der beiden Vergleichsgruppen, so fällt ein statistisch signifikanter Unterschied in der Schwangerschaftsdauer, also dem Entnahmezeitpunkt der Proben auf. Die Proben der IUGR-Plazenten sind demnach statisch gesehen früher entnommen worden als die Proben von SGA-Plazenten und haben folglich, auf Grund des niedrigeren Schwangerschaftsalters, niedrigere Expressionswerte. Bei Vergleich von Proben desselben Schwangerschaftsalters aus den beiden Kollektiven, wären demnach satistisch signifikantere Werte zu erwarten.
In Gesamtsicht aller Ergebnisse, der bisher aufgeführten Untersuchungen zur CRH-Expression, ergibt sich eine interessante Interpretation. CRH scheint demnach einen klaren Pathogenitätsfaktor auszumachen und vorallem Einfluss auf pathologische intrauterine Wachstumsentwicklungen zu haben. Zur eindeutigen, statistischen Bestätigung der, durch diese Arbeit gestützten These wäre ein Untersuchung mit möglicherweise größeren Kollektiven, sowie schwangerschaftsabhängig-gepaarten Proben sicher interessant.
CRH führt über Kalziumeinstrom u.a. zur Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur, mit konsekutiver Gefäßtonussteigerung. Des Weiteren führt eine chronisch erhöhte CRH-Exposition auf fetaler und maternaler Seite zu einer Downregulation von CRH-Rezeptoren auf fetaler, maternaler und plazentarer Seite. Als Folge kommt es zu verminderter Vasodilatation und bei folglich relativ erhöhtem Angiotensinspiegel zu verstärkter Vasokonstriktion. Klinische Folgeerscheinungen beider Wirkungen von CRH sind erhöhter intravasaler Druck auf maternaler und plazentarer Seite mit Mangelversorgung des Feten [35]. SIH und im Besonderen Präeklampsie sind z.T. schwerwiegende Schwangerschaftskomplikationen. So ist auch die CRH- Expression bei Präeklampsieplazenten von gesteigertem Interesse, da CRH einen möglichen Pathogenitätsfaktor für Präeklampsie darstellt. Vermutete Zusammenhänge konnten statistisch bestätigt werden. Im direkten Vergleich, zwischen Präeklampsie- und Kontrollplazenten konnte, bezogen auf beide

Houskeepinggene, eine statistische Signifikanz nachgewiesen werden. Auch bei der Entstehung dieser Pathologie spielt CRH demnach eine wichtige Rolle.
In meiner Arbeit konnte ich statistisch signifikante Expressionsunterschiede zwischen IUGR- und Kontrollgruppe nachweisen. CRH führt über verschiedene Mechanismen zu Wachstumsrestriktion. Nachdem ich eine mögliche unterschiedliche Gewichtung von CRH- Expression bei den unterschiedlichen, möglichen Formen von Wachstumsrestriktion anführen konnte, scheinen auch Untersuchungen innerhalb der einzelnen Probengruppen von Interesse.
So habe ich in meiner Arbeit erstmalig Untersuchungen zu Geburtsdaten, wie Geburtsgewicht in SDS, Geburtslänge in SDS und Plazentagewicht innerhalb einer Probengruppe mit spezieller Form von Wachstumsrestriktion gemacht.
Innerhalb der IUGR-Gruppe lies sich keine statistische Signifikanz nachweisen. Die einzige Interpretation, welche die statistischen Werte zulassen, ist ein tendenziell negativer Zusammenhang zwischen Geburtsgewicht von IUGR-Kindern und CRH- Expression. Auch in der SGA-Gruppe lies sich keine statische Bestätigung einer Signifikanz ausfindig machen. Die Werte der Proben zeigen jedoch auf beide Houskeepinggene bezogen p-Werte nahe an der statistischen Signifikanz. Möglicherweise wäre hier eine erneute Untersuchung mit größerer Probenanzahl hilfreich um statische Signifikanz zu erreichen. Auch hier zeichnet sich duch negative r-Werte eine negative Korrelation ab. Die Ergebnisse innerhalb der Kontrollgruppe sprechen klar gegen statistische Signifikanz. In Gesamtsicht zeigt dies noch einmal die Bedeutung von CRH bei v.a. pathologischen Entwicklungen.
Untersuchungen zu möglichen Korrelationen zwischen Geburtslänge und CRH- Expression blieben ohne statistische Signifikanz. Einzig mögliche Aussage ist hier eine einheitlich negativer Zusammenhang zwischen Expression und Geburtslänge bei wachstumsretardierten Kindern, sprich sowohl bei IUGR, als auch bei SGA, nicht aber bei Kontrollplazenten. Demnach nimmt bei wachstumsretardierten Feten tendenziell die Geburtslänge mit steigender CRH- Expression ab.
Chronisch erhöhte CRH-Exposition auf fetaler und maternaler Seite führt zu einer Suppression von CRH-Rezeptoren u.a. auch auf plazentarer Seite. Als Folge kommt es zu verminderter Vasodilatation und durch relativ erhöhten Angiotensinspiegel zu verstärkter Vasokonstriktion. Die Plazentagefäße werden konstringiert mit der Folge einer Mangelversorgnung der Plazenta und folglich des Feten. Von Interesse scheinen deswegen auch Untersuchungen zu möglichen Korrlationen zwischen Plazentagewicht und CRH-Expression. In dieser Arbeit wurden derartige Zusammenhänge erstmalig untersucht.
Die Auswertungen blieben bei IUGR- und Kontrollen ohne signifikantes Ergebniss. Die ermittelten Werte sprechen gegen statistische Signifikanz. In der SGA-Gruppe zeigte sich jedoch auf HPRT bezogen eine negatvie Korrelation. Erhöhte CRH-Spiegel führen demnach zu vermindertem Plazentagewicht innerhalb der SGA-Gruppe. Diese Ergebnisse lassen sich gut mit der Entwicklung einer Mangelversorgung der Plazenta in Zusammenhang mit erhöhten CRH-Spiegeln vereinbaren. Die Bestätigung durch auf das zweite Houskeepinggen bezogene Werte blieb aus. Jedoch zeigten auch hier die ermittelten Werte fast signifikante Zusammenhäge. Eine mögliche Ursache, die für das

Ausbleiben der Bestätigung anzuführen ist, ist eine zu geringe Probenanzahl.
Bei meinen Untersuchungen zeigte sich klar, dass CRH einen erheblichen Faktor für intrauterine modifizierte Wachstumsentwicklung darstellt, insbesondere bei der Entwicklung von IUGR und Präeklampsie. Seine Rolle innerhalb der IUGR-Gruppe, also bezogen auf die Schwere der Wachstumsrestriktion, scheint jedoch gering zu sein, so dass es zwar für die Entstehung von IUGR mitverantwortlich ist, jedoch keinen Einfluss auf die Schwere der Erkrankung hat. Diesbezüglich scheint es eher bei nicht-pathologischen Wachstumsrestriktionen wie SGA von Bedeutung zu sein. Sicherlich wäre es sinnvoll erbrachte Ergebnisse mit größeren Kollektiven auf mRNA-Ebene und durch ein geeignetes Proteinnachweisverfahren genauer zu untersuchen.

5.3 Ergebnisse zur Korrelation zwischen 11βHydroxysteroiddehydrogenase 2 und CRH

Die 11βHydroxysteroiddehydrogenasen und CRH spielen bei der Regulation des Glukokortikoidhaushalts eine wesentliche Rolle. Beide sind am Erhalt, Ab- und Aufbau der Glukokortikoide mitverantwortlich. Gegenseitige Einflüsse beider Hormone wurden bisher nicht untersucht. In meiner Arbeit wollte ich die beiden Systeme auch auf mögliche gegenseitige Korrelationen untersuchen. Statistisch signifikant war dabei nur das Ergebniss bei der Kontrollgruppe. Dort zeigte sich eine positive Korrelation. Die Ergebnisse auf das zweite Houskeepinggen zeigten deutlich keine statistische Signifikanz, so dass insgesamt nicht von einer Wechselwirkungen der beiden Hormone ausgegangen werden kann.

Literaturverzeichnis

[1] Albiston, A. ; Obeyesekere, V. ; Smith, R. ; Krozowski, Z. : Cloning and tissue dirstribution of the human 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzyme. In: *Mol. Cell. endocrinol* (1994), Nr. 105 (2), S. R11– R17

[2] Alfaidy, N. ; Gupta, S. ; DeMarco, C. ; Caniggia, I. ; Challis, J. : Oxygen regulation of placental 11 beta-hydroxysteroid-dehydrogenase 2: Physiological and pathological implications. In: *Journal of clinical endocrinology and metabolim* (2002), Nr. 87(10), S. 4797–4805

[3] Bamberg, C. ; Kalache, K. D.: Prenatal diagnosis of fetal growth restriction. (2004), Nr. 9, S. 387–394

[4] Barbazanges, A. ; Piazza, P. ; Moal, M. L. ; Maccari, S. : Maternal glucocorticoid secretion mediates long-term effects of prenatal stress. J. In: *Neurosci.* (1996), Nr. 16, S. 3943–9.

[5] Barker, D. J. P.: The fetal and infant origins of adult disease. In: *British Medical Journal* (1990), Nr. 301, S. 1111

[6] Barker, D. J. P.: In utero programming of cardiovascular disease. In: *Theriogenology* (2000), Nr. 53, S. 555–574

[7] Barker, D. J. P. ; Clark, P. M.: Fetal undernutrition and disease in later life. In: *Reviews of Reproduction* (1997), Nr. 2, S. 105–112

[8] Barker, D. J. ; Meade, T. ; Fall, C. ; Lee, A. ; Osmond, C. ; Phipps, K. ; Stirling, Y. : Relation of fetal and infant growth to plasma fibinogen and factor VII concentrations in adult life. In: *British Medical Journal* (1992), Nr. 304, S. 148–152

[9] Beek, J. P. ; Guan, H. ; Julan, L. ; Yang, K. : Glucocorticoids stimulate the expression of 11 beta-hydorxysteroid-dehydrogenase type 2 in cultured human placental trophoblast cells. In: *The journal of clinical endocrinology an metabolism* (2004), Nr. 89(11), S. 5614–5621

[10] Benediktsson, R. ; Lindsay, R. S. ; Noble, J. ; Seckl, J. ; Ewards, C. : Glucocorticoid exposure in utero: new model for adult hypertension. In: *Lancet* (1993), Nr. 341 (8841), S. 339–341

[11] Bertram, C. ; Trowern, A. ; Copin, N. ; Jackson, A. A. ; Whorwood, C. B.: The maternal diet during pregnancy programs altered expression of the glucocorticoid receptor and type 11β-hydroxysteroid dehydrogenase: potential molecular mechanisms underlying the programming of hypertension in utero. In: *Endocrinology* (2001), Nr. 7, S. 2841–2853

[12] Blair, E. ; Stanley, F. : Intrauterine growth and spastic cerebral palsy II. The association with morphology at birth. In: *Early human devises* (1992), Nr. 28 (2), S. 91–103

[13] Blasco, M. ; López Bernal, A. ; Turnbull, A. : 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase activity of the human placenta during pregnancy. In: *Hom Metab Res* (1986), Nr. 18 (9), S. 638–641

[14] Brown, R. W. ; Chapman, K. E. ; Edwards, C. R. W. ; Seckl, J. R.: Human placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase: Evidence for and Partial Purification of a Distinct NAD-dependent isoform. In: *Endocrinology* (1993), Nr. 132 (6), S. 2614–2621

[15] Burton, P. J. ; Waddell, B. J.: Dual function of 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase in placenta: modulating placental glucocorticoid passage and local steroid action. In: *BIOLOGY OF REPRODUCTION* (1999), Nr. 60, S. 234–240

[16] Byrne, C. D.: Programming other hormones that affect insulin. In: *British Medical Bulletin* (2001), Nr. 60, S. 153–171

[17] Cohen, W. ; Piasecki, G. ; Jackson, B. : Plasma catecholamines during hypoxemia in fetal lamb. In: *American journal of physiology* (1982), Nr. 243(5), S. 520–525

[18] Dickinson, H. ; Walker, D. W. ; Wintour, E. M. ; Moritz, K. : Maternal dexamethasone treatment at midgestation reduces nephron number and alters renal gene expression in the fetal spiny mouse. In: *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* (2007), Nr. 292, S. 453–461

[19] Durig, J. ; Nuckel, H. ; Huttmann, A. : Expression of ribosomal and translation-associated genes is correlated wih a favorable clinical course in chronic lymphatic leukemia. In: *Blood* (2003), Nr. 101, S. 2748–2755

[20] Fernandez-Twinn, D. ; Ozeanne, S. : Mechanisms by which poor early growth programs type-2 diabetes, obesity and the metabolic syndrome. In: *Physiology & Behavior* (2006), S. 234–243

[21] Hahn, T. ; Barth, S. ; Graf, R. ; Engelmann, M. ; Beslagic, D. ; Reul, J. ; Holsboer, F. ; Dohr, G. ; Desoye, G. : Placental glucose transporter expression is regulated by glucocorticoids. In: *The journal of clinical endocrinology an metabolism* (1999), Nr. 84/4, S. 1445–1452

[22] Hales, N. ; Barker, D. J. P.: The thrifty phenotype hypothesis. In: *The British Council* (2001), Nr. 60, S. 5–20

[23] Jansson, T. ; Ekstrand, Y. ; Björn, C. ; Wennergren, M. ; Powell, T. L.: Alterations in the activits of placental amino acid transporters in pregnancies complicated by diabetes. In: *Diabetes* (2002), Nr. 51, S. 2214–2219

[24] Jensen, A. ; Hohmann, M. ; Künzel, W. : Redistribution of fetal circulation during repeated asphyxia in sheep:effects on skin blood flow, transcutaneous PO2, and plasma catecholamines. In: *J Dev Physiol* (1987), Nr. 9(1), S. 41–45

[25] Johnstone, J. F. ; Bocking, A. D. ; Unlugedik, E. ; Challis, J. R.: The effects of chorioamnionitis and betamethasone on 11β hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 and the glucocorticoid receptor in preterm human placenta. In: *Society for Gynecologic Investigation.* (2005)

[26] Karteris, E. ; Goumenou, A. ; Koumantakis, E. ; Hillhouse, E. W. ; Grammatopoulos, D. K.: Reduced expression of corticotropin-releasing hormone receptor type-1 in human preeclamptic and growth-restricted placentas. In: *Journal of clinical endocrinology and metabolim* (2003), Nr. 88(1), S. 863–870

[27] King, B. R. ; Smith, R. ; Nicholson, R. C.: The regulation of human corticotrophin-releasing hormone gene expression in the placenta. In: *Peptides* (2001), Nr. 22(11), S. 1941–1947

[28] Kornel, L. ; Prancan, A. ; Kanamarlapudi, N. ; Hynes, J. ; Kuzianik, E. : Study on the mechanisms of glucocorticoid-induced hypertension: glucocorticoids increase transmembrane Ca++ influx in vascular smooth muscle in vivo. In: *Endocrine Response* (1995), Nr. 21, S. 201–203

[29] Krebs, C. ; Mascara, L. ; Leiser, R. ; Bowman, A. ; Greer, I. ; Kingdom, J. : Intrauterine growth restriction with absent end-diastolic flow velocity in the umbilical artery is associated with maldevelopment of the placental terminal villous tree. In: *Am J Obstet Gynecol* (1996), Nr. 175, S. 1534–1542

[30] Krozowski, Z. ; MaGuire, J. ; Stein-Oakley, A. ; Dowling, J. ; Smith, R. ; Andrews, R. : Immunohistochemical localization of the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II enzym in human kidney and placenta. In: *Journal of clinical endocrinology and metabolim* (1995), Nr. 80, S. 2203–2209

[31] Law, C. ; De Swiet, M. ; Osmond, C. ; Fayers, P. ; Barker, D. J. P. ; Cruddas, A. ; Fall, C. : Initiation of hypertension in utero and its amplification throughaut life. In: *British Medical Journal* (1993), Nr. 306, S. 24–27

[32] Levitt, N. ; Linsay, R. ; Holmes, M. ; Seckl, J. : Dexamethasone in the last week of pregnancy attenuates hippocampal glucocorticoid receptor gene expression

and elevates blood pressure in the adult offspring of rats. In: *Neuroendocrinology* (1996), Nr. 64(6), S. 412–418

[33] Lindsay, R. S. ; Linsay, R. ; Waddell, B. J. ; Seckl, J. : Prenatal glucocorticoid exposure leads to offspring hyperglycaemia in the rat: studies with the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor carbenoxolone. In: *Diabetologia* (1996), Nr. 39, S. 1299–1305

[34] McCalla, C. ; Nacharaju, V. ; Muneyyirci, D. ; Glasgow, S. ; Feldman, J. : Placental 11 b-hydroxysteroid dehydrogenase activity in normotensive and pre-eclamptic pregnancies. In: *Steroids* (1998), Nr. 63, S. 511–515

[35] McLean, M. ; Bisits, A. ; Davies, J. ; Woods, R. ; Lowry, P. ; Smith, R. : A placental clock controlling the length of human pregnancy. In: *Nat Med* (1995), Nr. 1(5), S. 460–463

[36] McMullen, S. ; Osgerby, J. ; Thurston, L. ; Gadd, T. ; Wood, P. : Alterations in placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase (11 betaHSD) activities and fetal cortisol: cortisone ratios induced by nutritional restriction prior to conception and at defined stages of gestation in ewes. In: *Reproduction* (2004), Nr. 127, S. 717–725

[37] McTernan, C. ; Draper, H. ; Nicholson, H. ; Chalder, S. ; Driver, P. ; Hewison, M. ; Kilby, M. ; Stewart, P. : Reduced placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 mRNA levels in human pregnancies complicated by intrauterine growth restriction: an analysis of possible maechanisms. In: *The journal of clinical endocrinology an metabolism* (2001), Nr. 86(10), S. 4979–4983

[38] Murphy, B. ; Clark, S. ; Donald, I. ; Pinsky, M. ; Vedady, D. : Conversion of maternal cortisol tu cortisone during placental transfer to the human fetus. In: *Am J Obstet Gynecol* (1974), Nr. 118(4), S. 538–541

[39] Murphy, V. ; Clifton, V. : Alterations in human placental 11β-hydroxysteroiddehydrogenase type 1 and 2 with gestational age and labour. In: *Placenta* (2003), Nr. 24, S. 739–744

[40] Murphy, V. ; Smith, R. ; Giles, W. ; Clifton, V. : Endocrine regulation of human fetal growth: the role of the mother, placenta, and fetus. In: *Endocrine Reviews* (2006), Nr. 27, S. 141–169

[41] Myatt, L. : Placental adaptive responses and fetal programming. In: *The Journal of Physiology* (2006), Nr. 572, S. 25–30

[42] Ortiz, L. ; Quan, A. ; Zarzar, F. ; Weinberg, A. ; Baum, M. : Prenatal dexamethasone programs hypertension and renal injury in the rat. In: *Hypertension* (2003), Nr. 41, S. 328–334

[43] Pepe, G. ; Burch, M. ; Albrecht, E. : Localization and developmental regulation of 11 beta-hydroxysteroid-dehydrogenase 1 and 2 in the baboon syncytiotrophoblast. In: *Endocrinology* (2001), Nr. 142, S. 68–80

[44] Phillips, D. I.: Fetal origins of adult disease. In: *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* (2001), Nr. 28, S. 967–970

[45] Plageman, A. : Tandem-Massenspektrometrie. In: *Physiology and Behaviour* (2005), Nr. 86, S. 661–668

[46] Power, M. L. ; Schulkin, J. : Functions of Corticotropin-Releasing hormon in Anthropoid primates:From brain to placenta. In: *American Journal of Human Biology* (2006), Nr. 18, S. 431–447

[47] Riley, S. C. ; Walton, J. C. ; Herlick, J. M. ; Challis, J. : The localization and distribution of corticotropin-releasing hormone in the human placenta and fetal membranes throughout gestation. In: *J. Clin. Endocrinol. Metab.,* (1991), Nr. 72, S. 1001–1007

[48] Robinson, J. ; Owens, J. ; Barro, T. d. ; Lok, F. ; Chidzanja, S. : Maternal nutrition and fetal growthEds RHT Ward, SK Smith and D Donnai. 317–334 , London. In: *Royal College of Obstetricians and Gynaecologists, London*

[49] Rogerson, F. M. ; Kayes, K. M. ; White, P. C.: Variation in placental type 2 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity is not related to birth weight or placental weight. In: *Mol. Cell. endocrinol* (1997), Nr. 128, S. 103–109

[50] Schneider, H. ; Husslein, P. ; Schneider, K. : *Geburtshilfe*. Deutschland : Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2000. – ISBN 3–540–64762–7

[51] Schoof, E. ; Girstl, M. ; Frobenius, W. ; Kirschbaum, M. ; Dörr, H. ; Rascher, W. ; Dötsch, J. : Decreased gene expression of 11beta hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase in human placenta of patients with preeclampsia. In: *The journal of clinical endocrinology an metabolism* (2001), Nr. 86(3), S. 1313–1317

[52] Schoof, E. ; Girstl, M. ; Frobenius, W. ; Kirschbaum, M. ; Repp, R. ; Knerr, I. ; Rascher, W. ; Dötsch, J. : Course of placental 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase mRNA expression during human gestation. In: *European Journal of Endocrinology* (2001), Nr. 145, S. 187–192

[53] Shams, M. ; Kilby, M. ; Somerset, D. ; Howie, A. ; Gupta, A. ; Wood, P. ; Afnan, M. ; Stewart, P. : 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human pregnancy and reduced expression in intrauterine growth restriction. In: *Human Reproduction* (1998), Nr. vol.13 no.4, S. 799–804

[54] Stewart, P. M. ; Murry, A. ; Mason, J. I.: Type 2 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human fetal tissue. In: *Clin Endocrinol Metab* (1994b), Nr. 78, S. 1529–1532

[55] Stewart, P. M. ; Rogerson, F. M. ; Mason, J. I.: Type 2 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase messenger ribonucleic acid and activity in human placenta and fetal membranes:Its relationship to birth weight and putative role in fetal adrenal steroidogenesis. In: *Journal of clinical endocrinology and metabolim* (1995), Nr. 80(3), S. 885–890

[56] Struwe, E. : *Veränderungen endokriner Parameter in der Plazenta bei intrauteriner Wachstumsrestriktion und bei Präeklampsie.* Erlangen, Friedrich-Alexander-Universität, Habilitationsschrift, 2006

[57] Struwe, E. ; Berzl, G. ; Schild, R. ; Beckmann, M. ; Dörr, H. ; Rascher, W. ; Dötsch, J. : Simultaneously reduced gene expression of cortisol-activating and cortisol-inactivating enzymes in placentas of small-for-gestational-age neonates. In: *American Journal of Obestetrics & Gynecology* (2007), S. 43e 1–6

[58] Struwe, E. ; Rascher, W. ; Dötsch, J. : *Final Report: Investigator initiated trial: SGA;identification of placental markers with possible relevance for intrauterine growth retardation and its sequelae.* Erlangen, 26.06.2006

[59] Sun, K. ; Adamsona, S. L. ; Yang, K. ; Challisa, J. R. G.: Interconversion of cortisol and cortisone by 11ß-hydroxysteroid dehydrogenases Type 1 and 2 in the Perfused Human Placenta. In: *Placenta* (1999), Nr. 20, S. 13–19

[60] Sun, K. ; Yang, K. ; Challis, J. R.: Differntial expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 in human placental and fetal membranes. In: *Journal of clinical endocrinology and metabolim* (1997), Nr. 82(1), S. 300–305

[61] Sun, K. ; Yang, K. ; Challis, J. : Regulation of 11ßhydroxysteroid dehydrogenase type 2 by progesteron, estrogen, and the cyclic adenosin 5monophosphate pathway in cultured human placental and chorionic trophoblasts. In: *BIOLOGY OF REPRODUCTION* (1998), Nr. 58, S. 1379–1384

[62] Tangalakis, K. ; Lumbers, E. ; Moritz, K. ; Towstoless, M. ; Wintour: Effect of cortisol on blood pressure and vascular reactivity in the ovine fetus. In: *Exp Physiol,* (1992), Nr. 77, S. 709–717

[63] Welberg, L. ; Seckl, J. ; Holmes, M. : Inhibition of 11 beta-hydroxysteroiddehydrogenase, the foeto-placental barrier to maternal glucocorticoids, permanently programs amygdala GR mRNA expression and anxiety-like behaviour in the offspring. In: *European Journal of Neurosience* (2000), Nr. 12 (3), S. 1047–1054

[64] Wintour, E. M. ; Johnston, B. ; Breier, B. ; Gluckman, P. : Reduced nephron number in adult sheep, hypertension as a result of prenatal glucocorticoid treatment. In: *The Journal of Physiology* (2003), Nr. 549, S. 929–935

[65] Xu, Y. ; Klein-Hitpass, L. ; Bagchi, M. : E1A-mediated repression of progesterone receptor-dependent transactivation involves inhibition of the assembly of a multisubunit coactivation complex. In: *Mol. Cell.Biol* (2000), Nr. 20, S. 2138–2146

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	**Beschreibung**
A	Absorption
A	Adenin
A.	Ateria
	Ateriae
Aa.	
Abb.	Abbildung
AGA	appropriate for gestational age, normalgewichtiges Neugeborenes
APGAR	Bewertungsindex für Neugeborene
APS	Amoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
BE	Base Excess
BFC	Blood flow class
BMI	Body Mass Index
BSA	bovines Serumalbumin
bzgl	bezüglich
bzw	beziehungsweise
β2-MG	beta2 Mikroglobulin
C	Cytosin
C	Grad celsius
CBX	Carbenoxolon
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
cm^2	Quadratzentimeter
cm^3	Kubikzentimeter
CMV	Cytomegalie Virus
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
CT	Treshold Cycle = Schwellenzyklus
CTP	Cytidin-Triphophat
CTG	Cardiotokograph
DEPC	Diethylpyrocarbonat in Aqua destillata
d.h.	Das heisst

DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ECL	Elektrochemilumineszenz
et al	et alii
Fa	Firma
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FAM	6-Carboxy-Fluorescein
g	Gramm
G	Guanin
GG SDS	Geburtsgewicht (standard deviation score)
GL SDS	Geburtslänge (standard deviation score)
Gly	
HELLP	Haemolysis, elevated liver enzyme levels, low platelet count
HPA-Achse	Hypothalamic-piturity-adrenal-Achse; Hypothalamus- & Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
HPLC	high performance liquid chromatography
HPRT	Human hypoxanthine phosphoribosyltransferase
H2O2	Wasserstoffperoxid
Hz	Hertz
βHSD2	βHydroxysteroiddehydrogenase2
IUGR	Intrauterine Growth Retardation; Intrauterine Wachstumsrestriktion
Jh.	Jahrhundert
kg	Kilogramm
kg/m2	Kilogramm pro Quadratmeter
KU	Kopfumfang
KU SDS	Kopfumfang (standard deviation score)
LDL	low densitiy lipoprotein
LGA	large for gestational age, hypertrophes Neugeborenes
M	Molarität
mA	Milliampere
mA/cm	Milliampere pro Quadratzentimeter
min	Minute
ml	Milliliter
ml/min	Milliliter pro Minute
mM	Millimol
mm	Millimeter

MmuLV	Molony Murine Leukosis Virus
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
n	Probenanzahl
nm	Nanometer
NNR	Nebennierenrinde
ns	nicht signifikant
NS	Nabelschnur
p	Wahrscheinlichkeit
PCR	Polymerase chain reaction ; Polymerasekettenreaktion
Perz.	Perzentile
PF 9601N	N(2-propynyl)-2-(5-benzyloxy-indolyl)methylamine
pH	pondus Hydrogenii
PI	pulsatility index
PLS	placental score
PMSF	Phenylmethylsulfonylflourid
PVC	Polyvinylchlorid
RE	relative Einheiten
RNA	Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung
SDS	Dodecylsulfat Natriumsalz
SDS	standard deviation score
SGA	small for gestational age; hypotrophes Neugeborenes
SS-induziert	Schwangerschaftsinduziert
SIH	Schwangerschaftsinduzierte Hypertonie
SSW	Schwangerschaftswoche
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Tac1	Preprotachykinin 1
Tac 3	Tachykinin 3
TAMRA	6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin
TN	Total nitrogen
TORCH	Toxoplasma gondii, other infectious microorganisms,Rubella virus, Cytomegalievirus, Herpes simplex
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trizol	Guanidin-Isothiocyanat-Acid-Phenol
Tween	Polyoxylethylen-Sorbit-Monoaurat
UAS	uterine artery score

U/min	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridin-Triphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	vorallem
ZNS	Zentrales Nervensystem
z.B.	zum Beispiel
l	Mikroliter
g	Mikrogramm
g/ml	Mikrogramm pro Milliliter
2-HMP	2-(Hydroximethyl)-piperidin

Danksagung

Ich möchte mich bei Allen bedanken, die mir diese Promotion ermöglicht oder mich bei der Durchführung auf irgendeine Weise unterstützt haben.

Einigen Menschen möchte ich jedoch besonders danken.
Herrn Prof. Dr. med Jörg Dötsch danke ich für die Überlassung des Themas, für die Betreuung als Doktorvater und für die Korrektur meiner Arbeit, er hatte immer ein offenes Ohr für Fragen und Anregungen und brachte stets Verständnis entgegen.
Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. med. Dr. hc. Wolfgang Rascher, der die Durchführung der Promotion an der Kinder- und Jugendklinik ermöglichte.
Frau Prof. Dr. med. Ellen Struwe möchte ich für die Betreuung zu Beginn der Arbeit danken, sie war stets offen für Fragen.
Meinen Dank möchte ich auch an Frau Dr. med. Anja Tzschoppe richten, sie war als Betreuerin und Ansprechpartnerin stets engagiert und nahm sich immer meiner Probleme an.
Für ihre tatkräftige Unterstützung im Labor der Kinderklinik möchte ich vor allem Tina, Jessica und Kathrin danken.
Danke auch an Frau Häfner, Monika Klewer und Stefan Söllner aus dem Labor der Pathologie, auch sie waren stehts aufgeschlossen und hilfsbereit.
Ein besonderer Dank geht an Barbara und Linda, die mit mir ihre Arbeit in der FIPS-Studie aufnahmen und ebenfalls dort promovierten. Unsere Zusammenarbeit hat vieles erleichtert, Danke euch für die Zusammenarbeit beim Sammeln der Proben und beim Auswerten.
Den größten und herzlichsten Dank möchte ich an meine Familie richten. An meine Geschwister Thomas, Martha, Brigitte und Elisabeth, die mich in jeder Phase der Promotion nach ihren individuellen Möglichkeiten und Fähigkeiten unterstützten und immer mit Rat und Tat zur Seite standen und an meine Eltern, meine Großeltern und Rosa, die immer für mich da waren.
Ohne sie könnte ich nie sein, wer und wo ich bin.

Lebenslauf

Name:	Martina Maria Weidinger
Beruf:	Ärztin
Geburtsdatum:	25.10.1982
Geburtsort:	Neumarkt i. d. OPf.
Familienstand:	Ledig
Eltern:	Martha Weidinger geb. Gottschalk und Franz Weidinger

Schulbildung

1989 – 1994	Grundschule Seubersdorf
1994 – 2002	Ostendorfer-Gymnasium Neumarkt i. d. OPf.
06/2002	Allgemeine Hochschulreife

Studium

10/2002 – 09/2004	Grundstudium der Humanmedizin an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
10/2004	Physikum
10/2004 – 07/2007	Klinischer Studienabschnitt an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
08/2007 – 07/2008	Praktisches Jahr
10/2008 – 11/2008	Staatsexamen Medizin